

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

**SZABAD GYÖKÖK SZEREPE NEONATOLÓGIAI  
KÓRKÉPEKBEN**

*Doktori (Ph.D.) értekezés*

**HRACSKÓ ZSUZSANNA**

Témavezető: Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilona  
*egyetemi docens*

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

**Szeged**

**2009**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b>	4
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	6
<b>2.1. Oxidatív stressz és antioxidáns védelem</b>	6
2.1.1. A reaktív oxigén származékok	8
2.1.2. Az oxidatív stressz okozta károsodás jellemző paraméterei	11
2.1.2.1. Lipidperoxidáció	11
2.1.2.2. Fehérjék oxidatív módosulásai	12
2.1.2.3. Oxidatív DNS-károsodás	13
2.1.3. Az antioxidáns védelmi rendszer	14
2.1.3.1. Kis molekulásúlyú antioxidánsok	14
2.1.3.2. A glutation és redox rendszerének elemei	15
2.1.3.3. Antioxidáns enzimek	18
<b>2.2. A nitrogén monoxid (NO) szerepe</b>	20
2.2.1. A NO-szintázok	21
2.2.2. Nitritek, nitrátok és peroxinitrit	22
<b>2.3. Szabad gyökök a neonatológiában</b>	23
2.3.1. A méhen belüli fejlődés és az intrauterin növekedési retardáció (IUGR)	23
2.3.2. A születés módja	25
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	27
<b>3.1. Köldökzsinórvérből vizsgált paraméterek</b>	27
3.1.1. Fehérje kvantitatív meghatározása	27
3.1.2. Glutationnal kapcsolatos vizsgálatok	28
3.1.3. A karbonil-protein-szint meghatározása	30
3.1.4. A lipidperoxidáció mérése	31
3.1.5. Enzimaktivitások mérése	32
3.1.6. Az össz-antioxidáns kapacitás meghatározása	37
3.1.7. Nitrit és peroxinitrit meghatározás	38

3.1.8. Filtrációs mérések	38
3.1.9. A DNS-károsodás és repair vizsgálata	39
<b>3.2. Az <i>arteria umbilicalis</i>ből történő vizsgálat</b>	40
<b>3.3. Statisztikai értékelés</b>	42
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	43
<b>4.1. A születés módja és az oxidatív stressz</b>	43
<b>4.2. Acidózis</b>	45
<b>4.3. IUGR újszülöttek antioxidáns státusza</b>	48
4.3.1. Antioxidáns enzimek és össz antioxidáns kapacitás	48
4.3.2. A glutation redox ciklus	50
4.3.3. A vörösvértestmembránok vizsgálata	53
4.3.4. Oxidatív fehérje- és DNS-károsodás	56
4.3.5. A nitrogén-monoxid szerepe	59
<b>5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE</b>	62
<b>6. LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK</b>	68
<b>7. ÖSSZEFOGLALÓ</b>	69
<b>8. Summary</b>	72
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b>	76
<b>10. RÖVIDÍTÉSEK</b>	84
<b>Köszönetnyilvánítás</b>	85

# 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az oxigén az aerob élet kialakulásának és létezésének feltétele, azonban káros hatása is ismert az élő szervezetre. Az életfolyamatok során az oxigénből fiziológias körülmények között is keletkeznek szabad gyökök, de patológias körülmények között képződésük fokozottabb mértékű. A reaktív oxigén intermedierek (Reactive Oxygen Species: ROS) oxidatív stresszt okozva megbontják a sejtek pro- és antioxidáns egyensúlyát, növelve azok érzékenységet, sérülékenységet.

Már a múlt század elején ismert volt, hogy a molekuláris oxigén párosítatlan elektronnal rendelkezik, így az érdeklődés a szabad gyökök iránt nem újkeletű dolog, és nem is korlátozódik csupán az élő szervezetben zajló folyamatok vizsgálatára. Minden élő szervezet és élettelen anyag érintkezik oxigénnel, ezáltal ki van téve a szabad gyökök támadásának, ez az aerob élet természetes velejárója.

Az emberi szervezetben egy komplex és nagyon effektív rendszer alakult ki, amely védelmet biztosít a gyökök káros hatásai ellen. Ez a rendszer az antioxidáns védelem. Az antioxidánsok, akár csak a különböző multivitamin készítmények a hétköznapi ember számára ártalmatlannak tűnnek, sokat közülük napi rendszerességgel fogyasztunk akár tableta formájában is. Mint minden hatóanyag, az antioxidánsok is különböző dózisokban máshogy viselkedhetnek, és túladagolás esetén akár a kívánttal ellentétes hatás következhet be, így terápiás alkalmazásuk gondos körültekintést, és alapos megelőző vizsgálatokat igényel. Számos betegség patomechanizmusában igazolták a szabad gyökök szerepét (pl.: daganatos betegségek, diabetes, ischaemiás szívbetegségek, gyulladási folyamatok stb.), így az ilyen rendellenességeknél az antioxidáns-terápia hatékony kezelést jelenthet, bár igazán effektívnek a megelőzés tekinthető.

A szülés során a magzat egy hipoxiás környezetből kerül át hirtelen normál oxigén koncentrációra, ami jelentős stresszhelyzetet jelent. Megfelelően fejlett szervezet azonban könnyedén alkalmazkodik a drasztikus változáshoz. Probléma akkor van, ha a méhen belüli fejlődés valamilyen okból nem teljes, vagy rendellenes. Tipikus példák erre a koraszülöttek, illetve a hozzájuk igencsak hasonlatos intrauterin növekedési retardációval (IUGR) küszködő újszülöttek. Az újszülött szervezetének érettségén túl a születés módja is meghatározó lehet egészségügyi szempontból.

Munkánk alapvető célja az IUGR patomechanizmusának részletesebb vizsgálata és megértése volt. A probléma forrása nagy valószínűséggel a magzati-placentáris

keringésben keresendő, ezért vizsgálatainkat köldökzsinóron végeztük. Paraméterek széles skáláját figyelembe véve vizsgáltuk az IUGR újszülöttek antioxidáns státuszát, illetve az oxidatív stressz indukálta károsodásokat, és összehasonlítottuk a normális és alacsony súlyú magzatok értékeit. Az antioxidáns státusz feltérképezésével, és a hiányosságok feltárásával lehetőség nyílt megfelelő terápiás javaslatra.

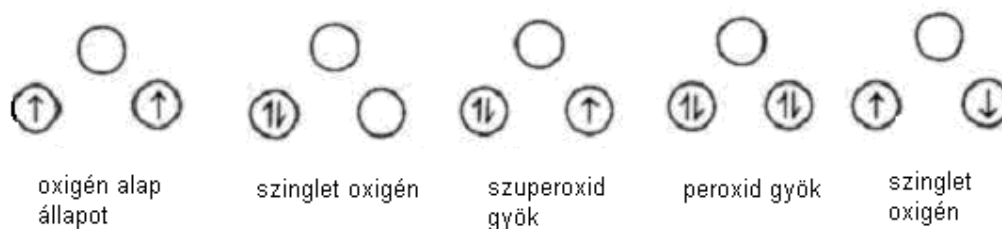
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Oxidatív stressz és antioxidáns védelem

A szabad gyökök [1], illetve a reaktív oxigén inetermedierek (ROS) az élő, aerob szervezetben keletkezhetnek endogén úton, valamint külső ágensek hatására exogén módon. A szabad gyökökre jellemző, hogy az atomok külső elektronhéján párosítatlan elektron található, vagyis egy elektron van egy orbitálon. Az elektronpályák akkor stabilak, ha az elektronok párokban helyezkednek el, ebből következik, hogy a szabad gyökök igen reaktívak és általában rövid élettartamúak.

A ROS (1. ábra) meghatározása általános, nemcsak a szabad gyököket, mint pl.: a szuperoxidiont és a hidroxilgyököt foglalja magába, hanem például a hidrogénperoxidot is, ami ugyan nem rendelkezik párosítatlan elektronnal, de reaktivitása a szabad gyökökhöz hasonló (2.ábra). Ilyen reaktív vegyület még a hipoklórsav (HOCl), amelyet a mieloperoxidáz hatására a neutrofil sejtek termelnek gyulladásos folyamatok során. Szuperoxidiontból hidroxilgyök is létrejöhet a neutrofil aktiváció során. Fontos megemlíteni a szerves alkoxi- és peroxigyököket is [2]. Ezek tipikus szerves oxigén szabad gyökök, amelyek elsősorban a lipidperoxidáció során keletkeznek, amikor a hidroperoxidokat az átmeneti fémek redukálják. A szén-tetrakloridból képződő gyök is ebbe a csoportba tartozik.

Halliwell és Gutteridge alapján



1. ábra Reaktív oxigén intermedierek elektronjainak eloszlása az egyes orbitálokon

Az élettani folyamatok során ROS termelődése elsősorban a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációhoz, és a normális celluláris aerob metabolizmushoz kötött. Szabad gyököket termelnek a mitokondriális elektrontranszportlánc enzimei: a xantin-oxidáz, a NADPH-oxidáz, a citokróm p450, továbbá a nitrogén-monoxid-szintáz, ciklooxigenáz izoenzimek, a lipoxigenázok, és a monooxigenázok. A szabad gyökök a szervezetben részt vesznek számos fiziológiás folyamatban, mint a kórokozók elleni nem specifikus védelemben vagy a szignál transzdukcióban. Ebből egyértelműen következik, hogy a gyökök nem csak károsak lehetnek, sőt bizonyos folyamatokhoz nélkülözhetetlenek. A szervezet ezért nem a ROS teljes eliminálására törekszik, hanem a megfelelő pro- és antioxidáns egyensúly fenntartására. Ha az egyensúly a prooxidánsok felé billen, oxidatív stresszről beszélünk. Ennek kivédésére a szervezet háromszintű antioxidáns védelemet alakított ki. Az első szintet képviselik az antioxidáns enzimek. Antioxidatív enzimek azok az enzimek, amelyek katalizálják a gyök-kioltó reakciókat, vagy maguk is képesek a ROS semlegesítésére. Így funkciójuk a kontrollálatlan gyökös láncreakció iniciációjának megelőzése.

	jele	Féléletidő 37°C, másodperc
Szuperoxid	$O_2^{\cdot-}$	$1 \times 10^{-6}$
Hidroxil	$\cdot OH$	$1 \times 10^{-9}$
Alkoxil	$RO\cdot$	$1 \times 10^{-6}$
Peroxil	$ROO\cdot$	$1 \times 10^{-2}$
Szinglet oxigén	$^1O_2$	$1 \times 10^{-6}$
Molekuláris oxigén	$O_2$	$> 10^2$

## 2. ábra Reaktív oxigén származékok féléletideje

A második védelmi vonalat képviselik a kis molekulásúlyú antioxidánsok, amelyek a gyökös láncreakciókat képesek megszakítani, terminálni. Antioxidáns minden olyan komponens, amely az oxidálható szubsztrátnál kisebb koncentrációban van jelen, és

szignifikánsan késlelteti, vagy gátolja a szubsztrát oxidációját. Ezek közül a kis molekulású redukálószeresek közül az aszkorbinsav és a glutation a legfontosabb.

A védekező rendszer harmadik vonala akkor lép működésbe, ha a károsodás már megtörtént, és feladata a már sérült részek eltávolítása, illetve a hibás részek javítása (pl.: chaperonok, hősokk-fehérjék, DNS repair-enzimek stb.).

Ezután a rövid áttekintés után szeretnék kicsit részletesebben is kitérni az egyes reaktív oxigén fajtákra, az antioxidáns védelem tagjaira, illetve az oxidatív stressz egyéb paramétereire.

## **2.1.1 A reaktív oxigén származékok**

### ***A szuperoxid anion ( $O_2^-$ )***

Az egyik legtöbbet emlegetett ROS a szuperoxidgyök. Számtalan folyamat eredményeképpen létrejöhet, melyek közül a legfontosabbak:

- Az elektron-transzportláncból felszabaduló elektronok a molekuláris oxigénnel lépnek kölcsönhatásba [3].
- A fagociták aktiválódásakor is keletkezhetnek [4].
- Az erek endothel rétege termeli konstitutívan, de kis mennyiségben [5].
- A NADPH-oxidáz enzimsalád a molekuláris oxigén redukálásával jelentős mértékben hozzájárul az endogén szuperoxidgyök termeléséhez [6]

Myoblastokat, granulocitákat károsít, a lipidperoxidációt iniciál, depolimerizálja a hialuronsavat, enzimeket inaktivál, károsítja a DNS-t. Sok esetben a károsító hatás függ a szimultán jelen lévő hidrogén-peroxid mennyiségétől.

### ***Szinglet oxigén ( $^1O_2$ )***

A szinglet oxigénnek ugyan nincs párosítatlan elektronja, így nem tartozik a szűkebb értelemben vett szabad gyökök közé, de reaktivitása miatt azokkal együtt érdemes tárgyalni (akárcsak a hidrogén-peroxidot). A szervezetben keletkezhet bőrben fotoszenzitivizáció során, szemlencsében, membrán lipidek peroxidációjakor [7]. Az aszkorbinsav-tokoferol rendszer teszi ártalmatlanná.



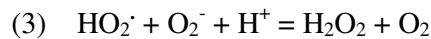
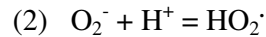
### ***A hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)***

Ha a szuperoxidanion egy második elektront is felvesz, akkor az eredmény a peroxidion. Nincs párosítatlan elektronja, így nem minősül gyöknek. A peroxidion fiziológiás pH-n azonnal protonálódik, és hidrogén-peroxidot képez. Vizes oldatban a szuperoxidanion átesik egy ún. dizmutáción, hogy hidrogén-peroxidot és O<sub>2</sub>-t képezzen.

A folyamatot az alábbi reakció összegzi:



Fiziológiás pH-n valójában így zajlik le a reakció:

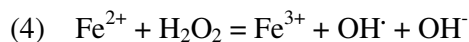


A dizmutációs ráta a pH-val fordítottan arányos.

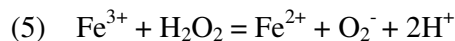
A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> károsíthatja a DNS-t és lipidperoxidációt idézhet elő, így az általa előidézett oxidatív stressz súlyos sejt- és szövetkárosodást okozhat, ami különböző betegségek kialakulásához vezet (jellemzően gyulladással járó folyamatok, illetve szív- és érrendszeri betegségek) [8].

### ***A hidroxilgyök (OH<sup>·</sup>)***

Citotoxicitása jelentősebb, mint a szuperoxidanioné. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relatíve gyenge O-O kötésének egyenlő felhasadásakor egy hidroxilgyök és egy hidroxilion keletkezik. Ez megtörténhet meleg vagy ionizáló sugárzás hatására, sőt, amint azt már a Fenton-reakció is leírja, a folyamat vassal kölcsönhatásba lépve is lejátszódik [9].



A keletkező Fe(III) tovább reagál a hidrogén peroxiddal:



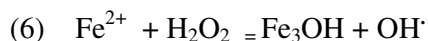
Természetesen egyéb gyökpárok is reagálhatnak a láncreakció során pl.: szuperoxid + Fe(III).

Míg a hidroxilgyök a legreaktívabb oxigén származék, addig a szuperoxidaniont és a hidrogén-peroxidot optimális körülmények között is nagy sebességgel szintetizálják a sejtek.

Nagyon fontos kérdés, amit a hidroxilgyök kapcsán érdemes áttekinteni, hogy vajon honnan van a vas a Fenton reakcióhoz?

Felnőtt emberben 4g vas van, ennek 2/3-a a hemoglobinban található. További 10% van a mioglobinban, és egy kisebb % enzimekben valamint a transferrinben található. A maradék az intracelluláris tér raktározó proteinjeiben található (pl.: ferritin) [10]. Ezek főleg a májban, lépben és a csontvelőben vannak jelen, de előfordulhatnak más szövetekben is (pl.: ferritin a plazmában). A nem hem vas Fe(III) formában van jelen, az abszorpciójához azonban redukálnia kell a szervezetnek. A gyomorsavban oldatba kerül, majd aszkorbinsav segítségével redukálódik, lehetővé téve az abszorpciót a felső jejunumban. A bélből egy szállítófehérje, a transferrin veszi fel. A transferrin egy glikoprotein, nagy affinitással a Fe(III)-ra. Mivel a transferrin a véráramban normálisan csak 30%-ban telített vassal, így a szabad vas sók jelenléte a plazmában elméletileg 0%. A transferrin receptorhoz kötve internalizálódik a sejtekbe, így kerül a vas a felhasználási helyére.

A másik fontos raktározó molekula a ferritin, 4500 molekulányi vasat képes megkötni. Fiziológias körülmények között tehát nem áll rendelkezésre vas a gyökképző láncreakció beindításához. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> azonban felszabadíthatja a nem proteinhez kötött vasat, és a vas beindítja a Fenton-reakciót.



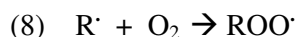
A Fenton-reakció réz jelenlétében is lejátszódhat. A vashoz hasonlóan a réz esetében is minimális a nem protein kötött raktár mérete.

## 2.1.2. Az oxidatív stressz okozta károsodás jellemző paraméterei

### 2.1.2.1. Lipidperoxidáció (LP)

A szervezetben képződő szabad gyökök a lipidperoxidációnak nevezett folyamatot képesek létrehozni. A lipidek peroxidációja a szervezetben lassú folyamat, mert az oxigén alapállapotban gyenge oxidálószer. Ha azonban a lipidet (RH) egy szabad gyök-képződést elősegítő anyag, vagy sugárzás segítségével, hidrogén elvonással lipid szabad gyök (R<sup>•</sup>) állapotba hozzuk, könnyebben képes reakcióba lépni a molekuláris oxigénnel [11]. A LP 3 lépése a következő: az iniciáció (a láncreakció indítása), propagáció (a láncreakció kiterjedése) és termináció (a láncreakció lezárása).

Iniciáció:



A reakció során peroxigyök (ROO<sup>•</sup>) keletkezik. A peroxigyök aktív, a szomszédos zsírsav oldallánchról hidrogént von el:

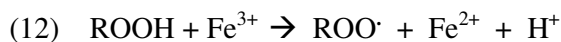
Propagáció:



A lipid-hidroperoxidok lebomlása során számos citotoxikus intermedier képződik.



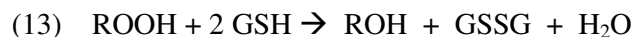
Peroxidációra főleg a többszörösen telítetlen zsírsavak hajlamosak, mivel a kettős kötések melletti szénatomjuk C–H kötése gyengébb, ezért a szabadgyök-reakciók kezdetét jelentő hidrogénelvonás könnyebben végbemegy. A lipidperoxidáció elnevezés félrevezető abban az értelemben, hogy a folyamat egyáltalán nem korlátozódik a lipidekre, hanem képes a keletkező szabad gyökök környezetében lévő összes alapvető biomolekulát (fehérjék, nukleinsavak, szénhidrátok) károsítani. A LP-t a vas és a réz jelenléte nagymértékben meggyorsítja (katalízis).



Mivel a fehérjék és a lipidek a membránok alkotórészei, érthető, hogy a lipidperoxidációs károsodás egyik fő helyszíne a membránok. A folyamat károsítja a membránokat, amelyek elveszítik fluiditásukat, csökken a membránpotenciáljuk, és megnő a permeabilitásuk. A fehérjék károsodása egyes enzimek aktivitásának csökkenését vagy elvesztését eredményezheti. A genetikai információt hordozó nukleinsavak károsodása, a mutagén, rákkeltő vagy sejtpusztító hatás alapját képezi.

A lánreakció lezárása az antioxidáns védelmi rendszer segítségével történik.

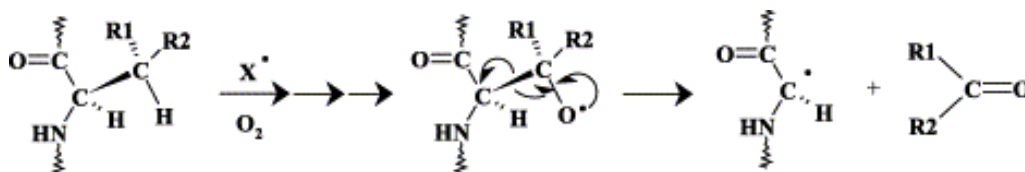
Termináció:



### 2.1.2.2. Fehérjék oxidatív módosulásai

A fehérjék számos módon oxidálódhatnak [12], a folyamatot általában a  $\text{H}_2\text{O}_2$  indítja el és az alábbi változásokat eredményezi:

- oxidáció, amely fragmentálódáshoz vezet
- fehérje-fehérje keresztkötések kialakulása
- aminosav oldalláncok oxidációja
- reaktív karbonil-származékok kialakulása (3. ábra)

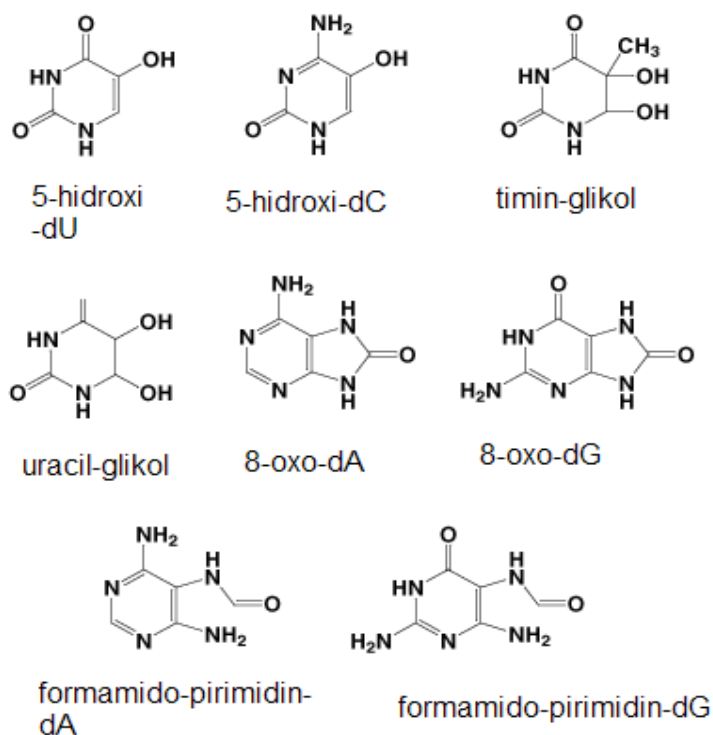


3. ábra Reaktív karbonil-származékok kialakulása

Az aminosavak közül az arginin, lizin, prolin aszparagin és glutamin oxidatív módosulása eredményezi a karbonil-proteinek kialakulását, amit dinitrofenilhidrazinnal (DNPH) lehet kimutatni. A karboniláció elterjedten használt markere az oxidatív fehérjekárosodásnak.

### 2.1.2.3. Oxidatív DNS-károsodás

A deamináció, a spontán hidrolízis és a nem enzimatis metiláció mellett a ROS-t tekintjük a DNS-károsodások fő forrásának. A szabad gyökök hatására számos oxidatív termék keletkezhet (4. ábra). A cukorfoszfát gyűrű károsodása fragmentálódáshoz, bázisvesztéshez és száltöréshez vezethet [13].



4. ábra Leggyakoribb, oxidatív stressz hatására létrejövő bázis modifikációk.

Számos oxidált bázis biológiai hatása ismert. A kijavíthatlan timin-glikol blokkolja a replikációt, így potenciálisan letális a sejtre nézve. A 8-oxoG-t könnyedén átugorja a DNS-

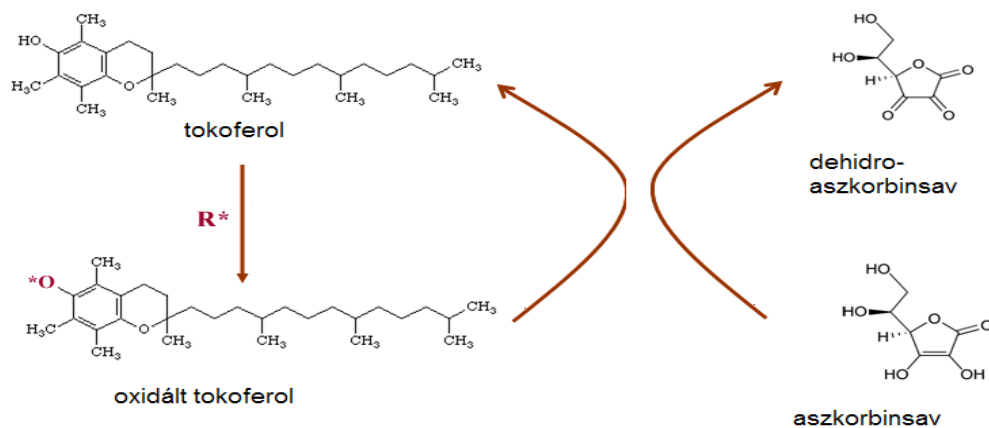
polimeráz és erősen mutagén, ha nincs repair a 8-oxoG adeninnel párosodik, ami G→T mutációk számát növeli.

### **2.1.3. Az antioxidáns védelmi rendszer**

Antioxidáns minden olyan komponens, amely az oxidálható szubsztrátnál kisebb koncentrációban van jelen, és szignifikánsan késlelteti, vagy gátolja a szubsztrát oxidációját. Az antioxidáns enzimek katalizálják ezeket a kioltó reakciókat, vagy maguk is képesek ROS semlegesítésére. Így az antioxidánsok és az antioxidáns enzimek funkciója az, hogy megszakítsák a kontrollálatlan láncreakciót.

#### **2.1.3.1. Kis molekulású antioxidánsok**

Ebbe a csoportba tartoznak azok a nem enzim típusú, kis molekulájú vegyületek, amelyek védenek az oxigénből keletkező reaktív intermedierek toxikus hatásával szemben. Az antioxidánsok köre tág, gyakorlatilag ide sorolható minden olyan anyag, amely az oxidálandó szubsztrátnál alacsonyabb koncentrációban van jelen, mégis szignifikánsan csökkenti, vagy megelőzi a szubsztrát oxidációját. Az antioxidáns vegyületek lehetnek vízdékok vagy lipiddékok. Ilyenek például a C, E, A, K vitamin, a cisztein, ciszteamin, glutation, urát, stb. Az antioxidánsok többféle hatásmechanizmussal működhetnek. Az E-vitamin az iniciációt gátolja, az aszkorbinsav láncmegszakító és segít regenerálni a tokoferolt [14]. A láncreakció megakadályozása során a tokoferol tokoferilgyökké alakul, melynek regenerációját az aszkorbinsavval a 5. ábra szemlélteti.



**5.ábra** A tokoferol regenerációja aszkorbinsavval

### 2.1.3.2. A glutation, és redox rendszerének elemei

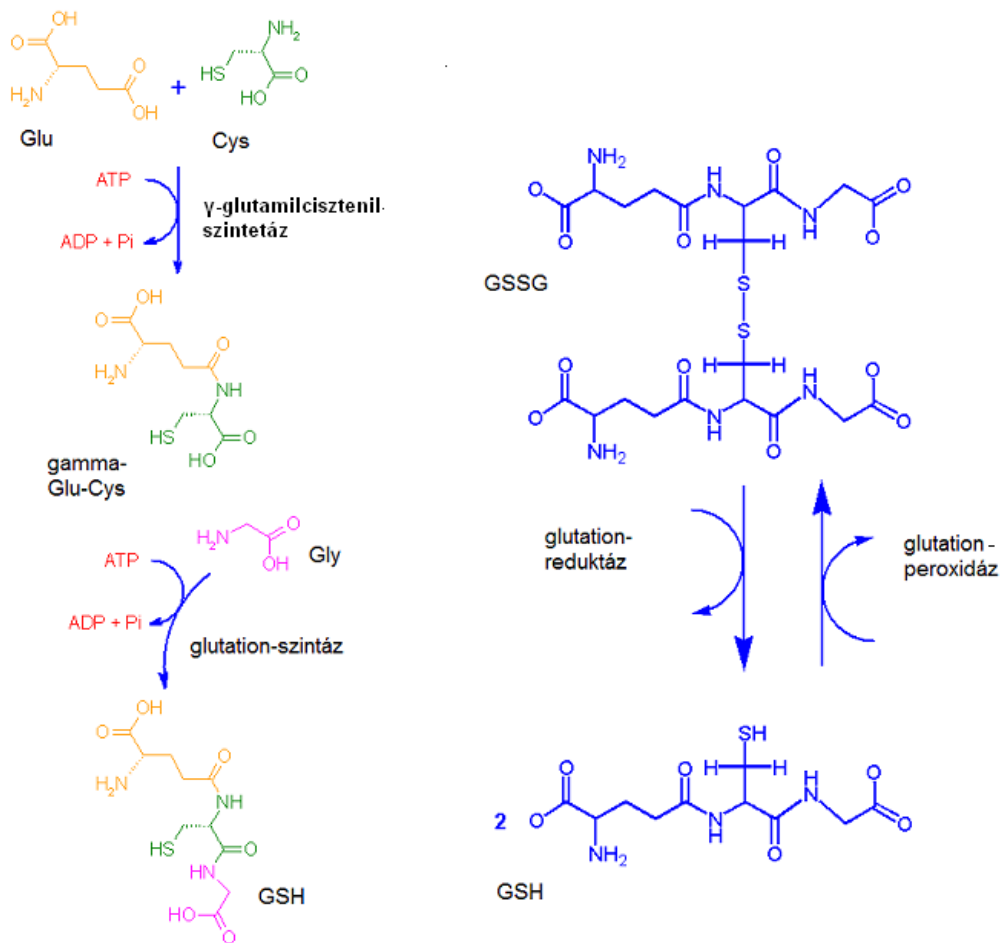
#### *Glutation*

Az egyik legfontosabb antioxidáns, a glutation [15] egy tripeptid molekula (Gly-Cys-Glu). Redukált formája (GSH) könnyebben oxidálódik, mint a sejtben működő SH-csoportot tartalmazó enzimek, így azokat megvédi az inaktiválástól. A GSH reakciója oxigénnel a glutation oxidált formáját adja (GSSG). A stresszhatások elleni védőreakciók fontos komponense, valamint a glutation-S-transzferáz szubsztrátja a xenobiotikumok detoxifikációja során.

A GSH szervezetünk egyik legjelentősebb antioxidánsa, mely a patológiás szabad gyökökkel szembeni védelem részét képezi. A szabad gyökök, lipidperoxidok eltávolítását a glutation-peroxidáz végzi redukált glutation felhasználásával. A reakcióban a glutation oxidálódik, redukálását, és így más folyamatokban történő újbóli felhasználásának lehetőségét a glutation-reduktáz enzim biztosítja. A glutation-reduktáz enzim ritka genetikai hibája alacsony redukált glutationszintet eredményez. Ez az állapot nemcsak azért veszélyes, mert jelentősen sérül a szervezet antioxidáns védeleme, hanem azért is mert felhalmozódik a citotoxikus GSSG. A megfelelő GSH hatáshoz tehát az egész redox rendszer épségére van szükség (6. ábra).

Azon túlmenően, hogy a GSH önmagában is hatékony a szabad gyökök kivédésében, számos más, az antioxidáns védelmet támogató hatása ismert. Részt vesz aszkorbinsav, és rajta keresztül az  $\alpha$ -tokoferol regenerálásában. Befolyásolja az antioxidáns enzimek expresszióját, és szerepe van a redoxpotenciál kialakításában. Öregedést késleltető és rák megelőző hatása van.

A GSH nem transzlációs folyamat során szintetizálódik. Két, ATP-függő lépésben képződik aminosavakból, mely folyamatokat a  $\gamma$ -glutamil-cisztein-szintetáz és a glutation-szintetáz katalizálja (6. ábra). A glutaminsav és a glicin a modern táplálkozási szokásokkal nagy mennyiségben kerül bevitelre, ezért a GSH előállításának egyetlen korlátja a megfelelő mennyiségű cisztein-bevitel. Márpedig a cisztein rész kulcsfontosságú a molekulában, hiszen SH csoportjának oxidációjával keletkezik a diszulfid-kötés.



**6.ábra** A GSH szintézise és redox ciklusa

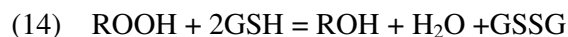


### ***Glutation-peroxidáz (GP)***

A GP [EC 1.11.1.9] felfedezése Mills nevéhez fűződik [16], aki a vörösvértestek oxidatív hemolízisének vizsgálata során írta le az enzimet. Jelenleg az enzimes család öt tagja, a citoplazmatikus, az extracelluláris, a foszfolipid, a gastrointestinális és a májban található citoszolikus izoforma ismert. Feltételezhető azonban további izoenzimek létezése is. Megkülönböztetnek szelén-függő GP-okat, és olyanokat amelyek működéséhez nincs szükség szelénre.

A szelén-dependens glutation-peroxidázok közös jellemzője, hogy szelén atomot tartalmaznak -szelenocisztein formájában- aktív centrumukban és szubsztrátként a hidrogén-peroxid mellett a szerves hidroperoxidokat is elbontják, beleértve a zsírsavak hidroperoxidjait is [17].

Az enzim által katalizált reakció általános képlete:



Fiziológias működése során a GSH oxidációja mellett a katalázzal együtt megtisztítja az eritrocitát a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -tól, mely vagy spontán, vagy SOD által katalizált dizmutációval képződik a szuperoxidanionból. Épp ezért a sejtekben azokon a területeken található nagy mennyiségben, ahol alacsony a kataláz enzim szintje. Így jelen van a citoszolban és a mitokondrium mátrixában, viszont gyakorlatilag nem mutatható ki a mikroszómákban, a sejtmagban és a peroxiszómákban, amelyek a sejt csaknem teljes katalázkészletét hordozzák.

### ***Glutation-S-transzferáz (GST)***

A GST [EC 2.5.1.18] hidrofób, elektrofil komponensek glutationnal való konjugációját közvetíti, ezáltal fontos szerepe van a xenobiotikumok átalakításában [18]. Glutation-függően képes redukálni a hidrogén-peroxidot, vagyis GP aktivitással is rendelkezik, szelén hiány esetén, ezért a szeléntől független glutation-peroxidázok közé sorolhatók.

### ***Glutation- reduktáz (GR)***

A GR [EC 1.6.4.2] egy NADPH-függő enzim, az oxidált glutationt (GSSG-glutation-diszulfid) redukálja vissza (6.ábra), így fontos szerepe van a GSH raktár regenerálásában [19, 20].

Az enzim genetikai hibája alacsony redukált glutation szintet eredményez. A kórkép autoszomális recesszív öröklésmentet mutat. Az enzim aktivitásának csökkenéséhez vezet a riboflavinban szegény táplálkozás is. A B<sub>2</sub>-vitamin a glutation-reduktáz (és számos más, a szervezet oxidoredukciós folyamataiban részt vevő enzim) kofaktora. A laboratóriumi paraméterekre az anaemia (alacsony vörösvérsejtszám, haemoglobintartalom, haematokrit), és vérsjeltoldódásra utaló paraméterek a jellemzőek. A vörösvérsejtekben alacsony, vagy hiányzó enzimaktivitás mérhető, és a glutation koncentrációja is alacsony.

### ***Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD)***

A G6PD [EC1.1.1.49] fontos eleme a pentóz-foszfát ciklusnak. A glükóz-6-foszfát felhasználása a NADPH, ribóz-5-foszfát és ATP-igénytől függ. A GSH regenerációja az oxidált formájából, NADPH jelenlétét igényli, amely a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim által katalizált reakcióban képződik. X-kromoszómához kötött örökletes hiányával született egyének akut hemolitikus anaemiában szenvednek [21].

### **2.1.3.3. Az antioxidáns enzimek**

#### ***A szuperoxid-dizmutáz (SOD)***

A SOD [22] [EC 1.15.1.1] minden oxigént fogyasztó organizmusban, némely aerotoleráns anaerob és néhány obligát anaerob élőlényben is megtalálható. Mindegyik izoformája metalloprotein. Attól függően, hogy aktív centrumukban milyen fém(ek) található(k), három osztályt különböztetünk meg: Cu,Zn-SOD; Mn-SOD; Fe-SOD.

Vörösvérttestben csak a Cu,Zn-SOD fordul elő, ami nem rendelkezik a másik két izoformával homológ szekvenciával. Az enzim egy homodimer, egy cink és egy réz atomot tartalmaz alegységként. A réznek katalitikus, míg a cinknek a struktúrát stabilizáló szerepe van.

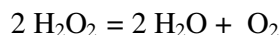
A réz segítségével az enzim közömbösíti a reaktív szuperoxidgyököket:



A képződő hidrogén-peroxidot további enzimek közömbösítik (kataláz, glutation-peroxidáz). A magas  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció és a nem enzimátikus glikoziláció az enzim fokozatos inaktivációjához vezet [23].

### ***Kataláz (KAT)***

Emlős eritrocitákban jelentős kataláz [EC 1.11.1.6] mennyiség található. A kataláz egy olyan enzim, amely  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t katabolizál. Fotoinhibícióra és degradációra érzékeny. A katalitikus aktivitása nagy, de a szubsztrát affinitása kicsi, mivel a reakció egy időben két hidrogén-peroxid molekula megkötődését igényli az aktív centrumban. Mivel a kataláznak nagyon alacsony az affinitása szubsztrátjára, úgy gondolják, hogy a  $\text{H}_2\text{O}_2$  nagy részét a glutation-peroxidáz enzim bontja. A hipotézis szerint a kataláz arra szolgál, hogy a szomatikus sejteket megvédje az exogén (nem eritrocita eredetű) hidrogén-peroxidtól (pl.: gyulladás esetén). A kataláz szubsztrátját vízre és oxigénre bontja:



A szuperoxid gyök [24], és a NO az enzimet gátolja [25]. A kataláz-védelem SOD, illetve GSH hiányában is működik, kataláz-gátlás esetén azonban a többi enzim működése esetén is megszűnik a védelem, de kataláz adásra visszaáll.

### ***Glutation-peroxidáz (GP)***

A szabad gyökök, lipidperoxidok eltávolítását a glutation-peroxidáz végzi redukált glutation felhasználásával (6.ábra). Az enzim a GSH redox ciklusának fontos eleme, ezért részletesebb ismertetésére a 2.1.3.1. fejezetben került sor.

## **2.2. A nitrogén-monoxid (NO) szerepe**

A nitrogén-monoxidot [26] az élő szervezet különböző típusú sejtjei szintetizálják, ami a képződés helyéről gyorsan a szomszédos sejtekhez áramlik, és ezzel számos élettani funkciót befolyásol. Kulcsszerepe van a szív működésében, az érrendszerben a vérnyomás regulációjában, és az egyes létfontosságú szervek vérellátottságának fő szabályozójaként. Hatására az erek simaizomzata elernyed, az erekben a vérrögök képződése csökken. Fehérvérsejtekben termelődve küzd a baktériumokkal, szervátültetéseknél pedig a szervkilökődés veszélyét csökkenti. A nitrogén-monoxid egy párosítatlan elektronnal rendelkezik a külső héjon, így szabad gyökként funkcionál.

A nitrogén-monoxid stimulálja a guanilat-ciklázt, ezáltal ciklikus 3', 5'-guanozin-monofoszfát jön létre, és a cGMP-dependens kináz a miozin könnyűlánc-defoszforizálását eredményezi. Így a miozin-aktin kapcsolat blokkolódik, kialakul az erős simaizomsejt-relaxáció. A blokkolás előfeltétele a szarkoplazmatikus retikulumból a kalciumionok kiáramlásának gátlása (ezt a folyamatot szintén a cGMP katalizálja).

Az NO<sup>•</sup> szintézisében egy enzimsalád vesz részt, amelyet közösen nitrogén-oxid-szintáznak (NOS) neveznek. Az NO a NOS segítségével képződik L-argininből, citrullin keletkezésén keresztül (7.ábra).

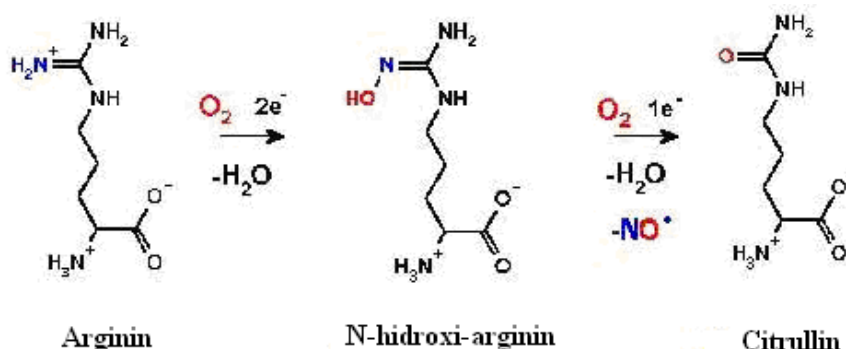
Az NO néhány tulajdonsága:

- Érelmeszesedésben az ér belső sejttrétege kevesebb nitrogén-monoxidot termel.
- Gyógyszerek (pl. nitroglicerín) juttathatnak NO-t az érbe.
- A súlyos bakteriális fertőzés szepszishez és általános vérkeringési elégtelenséghez (sokk) vezethet, mert a fehérvérsejtek és a baktériumtoxinok által termelt nagy mennyiségű NO káros értágulatot okoz. Ebben az esetben az NO szintézisének gátlása a megoldás.
- Az intenzív osztályokon életmentő lehet az NO belégzése. Ez különösen akkor hasznos, amikor a tüdőben uralkodó vérnyomás kórosan magas (pl. újszülötteknél).
- Egyes fehérvérsejtek nemcsak megölik a fertőző ágenseket, mint pl. baktériumokat, gombákat, parazitákat, hanem védik is a szervezetet a tumorok ellen. Feltételezik, hogy az NO megállítja a daganatok növekedését, apoptózist indukál.
- Az NO az impotencia kezelésére alkalmas.

- A gyulladásos betegségek (asztma, bélgyulladások, ízületi gyulladások) azon az alapon is diagnosztizálhatók, hogy mennyi NO képződik hatásukra a szervezetben.

## 2.2.1. Az NO-szintázok

Az emlős sejtekben az NO-szintázok katalizálják az NO szintézisét az L-arginin szubsztrát oxidációján keresztül citrullin képződése mellett (7. ábra).



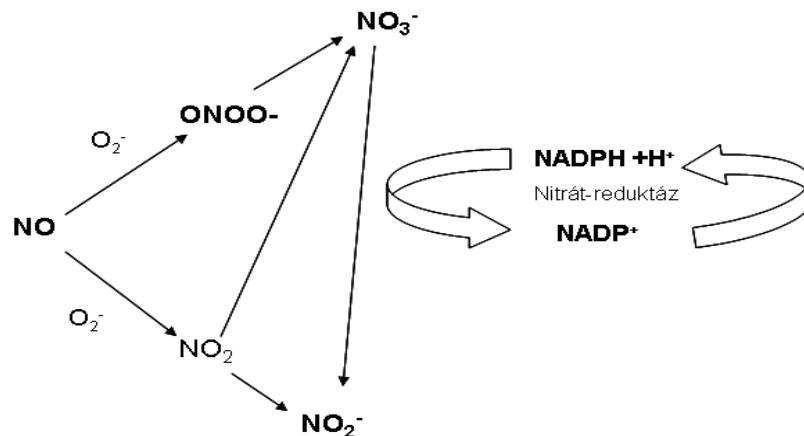
7. ábra A NO szintézis lépései

Ezek az enzimek lehetnek kalcium- és kalmodulin-függőek, vagy azoktól függetlenek [27]. Három izoformáját azonosították: neuronális (ncNOS), endotheliális (ecNOS) és makrofág típus (iNOS). Az egyes izoformákat azokról a szövetekről nevezték el, ahonnan először tisztították, de azóta már más szövetekben is azonosították, így például a ecNOS expresszálódik vázizomsejtekben, szívizomban, epitheliális sejtekben és neuronokban. Patológiai körülmények között, a kalciumfüggetlen, indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) enzim aktiválódásával is létrejön az NO-szintézis. Az interleukinek, bakteriális toxinok, NO-szintézist és reaktív szabad gyök képződést eredményezhetnek, amelyek szöveti károsodást okozhatnak.

A NOS-ok a P450 enzimszaládba tartoznak. Az aktív centrumban található hem komplexhez az elektron NADPH-ről FAD, FMN és  $BH_4$  kofaktorok segítségével jut.

## 2.2.2. Nitritek, nitrátok és peroxinitrit

A klinikai gyakorlatban a nitrátoknak elsősorban a vaszkuláris simaizomsejtekre kifejtett görcsoldó hatását használják ki. A vasodilatáció létrejöttéért főként a szervezetben termelődő, az endotheliumból származó szubsztrátum – EDRF, (endothelium-derived relaxing factor, endothelből származó relaxálófaktor) – tartották felelősnek. Ma már tudjuk, hogy az EDRF megfelel a nitrogén-monoxidnak (NO). Ischaemiás szívbetegségben az atherosclerosis jelentősen károsítja az endotheliumot, csökken a nitrogén-monoxid termelése. A nitrátoknak először metabolizálódniuk kell, hogy hatásukat kifejthessék. Az organikus nitrátok lebomlásának két útja ismeretes. Az enzimatis út során metabolizálódó nitrátból a GST segítségével glicerol dinitrát és mononitrátot át nitrit- és nitrátionok jönnek létre. A nem enzimatis lebomlásnál kulcsszerepet kapnak az intracelluláris tiolkészletek, amelyek cisztein vagy GSH formájában raktározódnak. Az így keletkezett NO indukálja a simaizomsejt-relaxációt eredményező folyamatot. A nitráthatás lényege a coronariadilatáció és a vénás rendszer tágítása. Növeli a szív teljesítményét, és csökkenti az artériás vérnyomást. További lényeges hatásuk, hogy gátolják a thrombocyták aggregációját és adhézióját, a neutrophil granulocyták kitapadását az endotheliumhoz, valamint a simaizomsejt-proliferációt.



8. ábra NO származékok

A peroxinitrit a NO-ból képződő egyik toxikus ROS (8. ábra) [28]. Termelik az aktivált alveoláris makrofágok, a neutrophil granulocyták és az endothelium. Az NO és a szuperoxid anion reakciójából keletkezik. A kialakult peroxinitrit elég stabil ahhoz, hogy legalább egy sejt-átmérőnyi távolságra diffundáljon. A citotoxikus oxidáns peroxinitrit fehérvérjék károsításán túl megtámadja a DNS-t, és képes aktiválni számos reakcióutat, köztük a peroxinitrit-poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) utat is, amely további szövethárosodáshoz vezet.

## **2.3. Szabad gyökök a neonatológiában**

### **2.3.1 A méhen belüli fejlődés és az intaruterin növekedési retardáció (IUGR)**

A magzat és az újszülött vérkeringése lényegesen különbözik egymástól. A magzat a placentán keresztül az anya véreből táplálkozik, és a légzési gázok cseréje is a placentán keresztül bonyolódik. A magzat vérenek oxigénfelvételét, szén-dioxidjának kiürülését, táplálékfelvételét, a víz és a vízben oldott anyagcseretermékek kiürülését a placenta közvetítésével az anyai szervezet végzi. A fejlődő tüdőben nincsen gázcsere, funkcionális vérkeringése, a kisvérkör, tehát nem működik. A magzat anyagcseretermékekkel telt, szén-dioxidban gazdag „vénás” vérének a köldökartéria, az *arteria umbilicalis* szállítja a placentába. Ott hajszálér-hálózatra oszlik. Az ív alakban görbült hajszálerek – ahol a gázcsere és a táplálékfelvétel folyik – a chorionbolyhokban posztkapilláris vénákba mennek át. A posztkapilláris vénák nagyobb gyűjtővénákba, majd a köldökvénába egyesülnek, azok a felfrissült, oxigénben gazdag vért a köldökzsinóron át a magzatba viszik. A placentában felfrissült vér keveredik a magzat vénás vérével, tehát a magzatban kevert vér kering.

A méhen belüli növekedés-visszamaradás vagyis az IUGR (intrauterine growth retardation) a koraszülöttség mellett az újszülött-halálozásért felelős leggyakoribb veleszületett rendellenesség. Méhen belül akkor beszélünk elégtelen fejlődésről, ha a magzat becsült súlya 10 percentilis érték alatt van, azaz gyengébben fejlett, mint az azonos korú magzatok 90%-a. Születéskor IUGR-nek tekintendő a kissúlyú -2500g alatti- magzat, ha normális időre születik.

A kissúlyú magzatok aránya 5-6% körül van, melyek körülbelül harmada IUGR, kétharmada valódi koraszülött. Az elégtelen fejlődés leggyakoribb oka a dohányzás,

alkoholizmus, túlzott koffeinfogyasztás, elégtelen táplálkozás, ikerterhesség, elégtelen mennyiségű magzatvíz, bizonyos gyógyszerek szedése, terhesség alatti kábítószer-fogyasztás terhességi toxémia, méhlepény-elégtelenség, idült idő előtti méhlepény-leválás, trombofília (Leiden-mutáció), az anya nemi szervi rendellenességei, betegségei (myoma, kettőzött méh, stb.). Bár az esetek jelentős részében az ok ismeretlen marad [29].

A normálisnál kisebb súlyú újszülöttek esetében a fejlődésbeli visszamaradás a baba testarányai szerint lehet arányos (proporcionált) és aránytalan (diszproporcionált). Ez utóbbi esetben a végtagok hosszúsága normális, de a fej-, mellkas- és haskörfogat kórosan kicsi, sovány benyomást kelt. A gyermek arca "öregesen" ráncolt, zsírpárnái erősen hiányosak.

A retardált gyermekek körében nagyarányú az anatómiai és/vagy genetikai rendellenességek (különösen az egyes triszómiák) gyakorisága, melyek a gyermekek sorsát alapvetően befolyásolják. A bölcsőhalál eseteinek jelentős része is IUGR újszülötteknél fordul elő. Az összes születés körüli megbetegedés és halálozás 8-10-szer gyakoribb, mint egészséges csecsemőknél [30]. Méhen belül retardált gyermekeknel nagyobb a kockázata a neurológiai és viselkedési zavaroknak. Az IUGR előfordulása egészséges életvitellel jelentősen csökkenthető. Ha mégis előfordul, a megelőzés célja a gyermek testi és értelmi fejlődésének biztosítása.

Az IUGR diagnózisa normális esetben már a terhesség során felismerhető, így a szülést olyan intézetben célszerű levezetni, ahol a gyermek intenzív ellátásához adottak a személyi és tárgyi feltételek. A magzati sorvadás kimutatásával azonban a diagnosztikai tevékenység csak elkezdődik. Azonosítani kell ugyanis az IUGR okát mind az anyánál, mind a magzatnál. Ki kell zárni minden olyan anyai betegséget, káros szenvedélyt, továbbá magzati genetikai rendellenességet, méhen belüli fertőzést, mely a fejlődés lassulását kiválthatta. Ezek célzott kezelése ugyanis előfeltétele a magzat egészséges fejlődésének, továbbá, a következő terhességnél az IUGR megelőzésének.

A méhen belül felismert IUGR esetén legfontosabb az anya teljes ágynyugalma, megfelelő táplálkozás, intravénás glükóz és magnézium infúzió, esetenként oxigén belelegeztetése orrszondán át. A gyermek állapotát kardiokardiográfiával és ultrahanggal folyamatosan nyomon kell követni. Fenyegető magzati fulladás esetén pedig be kell indítani a szülést; kellő érettség esetén hüvelyi szüléssel, lehetőleg epidurális érzéstelenítésben. A fájdalom ugyanis reflexesen csökkenti a méh vérkeringését, és rontja a magzat oxigénellátását. A reflex a fájdalom megszüntetésével teljesen kikapcsolható és epidurális érzéstelenítés mellett az esetleg szükségessé váló császármetszés azonnal



elvégezhető. A megfelelő ellátásban részesülő, anyatejjel helyesen táplált gyermek általában kétéves korára éri utol kortársait a testi és értelmi fejlődésben. Minden egyéb esetben a gyermek sorsát az alapbetegség (az IUGR oka), továbbá a gondozás helyessége határozza meg. Amennyiben a gyermek testi fejlődése elmarad a kívánatostól, kiegészítő táplálásra van szükség.

### **2.3.2. A születés módja**

Az utóbbi években világszerte növekszik a császármetszéssel (Caesarean section, CS) történő születek aránya. A műteti kockázat egyre kisebb, és ezért a fejlett világban egyre több nő választja ezt a természetes szülés helyett. Mivel ennek ellenére mégiscsak műteti beavatkozásról van szó, az altatás, a fertőzésveszély és a vérrögképződés eshetősége miatt összességében még mindig több, mint háromszoros az anyai elhalálozás veszélye a vaginális szüléshez (VSZ) képest [31]. Magyarországon CS-t nem végeznek kérésre, csakis orvosi javaslat alapján. A leggyakoribb okok, melyek császármetszést indukálnak:

1. medencevégű fekvés
2. harántfekvés
3. téraránytalanság
4. elhúzódo szülés
5. előlfevő lepeny (placenta praevia)
6. magzati oxigén hiány (asphyxia)
7. anyai betegség

A császármetszéshez is érzéstelenítésre van szükség. Ez legtöbbször epidurális vagy spinális gerincközeli érzéstelenítést jelent. Ekkor elérzéstelenedik a test alsó része, de az anya ébren marad. Ha a magzatot nagyon gyorsan kell világra segíteni, vagyis sürgősségi császármetszés esetén általános érzéstelenítést, altatást alkalmaznak. A műtét során a hason majd utána a méhen metszést ejtenek. Az érzéstelenítésnek köszönhetően ez fájdalommal nem jár. Amikor a méh nyitva van, az orvos leengedi a magzatvizet, majd a magzatot óvatosan világra segíti. A procedúra körülbelül 10 percet vesz igénybe, tehát lényegesen kevesebbet, mint a több óráig elhúzódo VSZ. A műtét után általában 1 héten belül engedik haza a páciens, a műtét utáni regenerálódás tehát sokkal lassabb, mint VSZ után.

Számos betegségről kiderült, hogy patomechanizmusában a szabad gyökök jelentős szerepet játszanak. Ilyenek például a diabetes [32], neurodegeneratív betegségek [33, 34], a cornea elváltozásai [35] vagy a különböző rákos megbetegedések [36, 37]. Újszülöttek esetében az oxigénnek különösen nagy a jelentősége, hiszen a születés során a magzat a hypoxiás környezetből egy számára hyperoxiás közegbe kerül. Így könnyű belátni, hogy bármilyen hiányosság az antioxidáns védelemben súlyos következményekkel járhat. Ezek a következmények a leglátványosabbak a koraszülötteknél; különösen a tüdő rendellenességei szembetűnőek [38, 39], de a dúsán vaszkularizált agy is károsodhat [40].

Az oxidatív stressz ugyan minden újszülöttet érint, de a mértéke egyáltalán nem elhanyagolható a baba egészsége és fejlődése szempontjából. Az oxidatív stressz mértékét legdrasztikusabban a születés körülményei befolyásolhatják. Vajon kíméletesebb a CS ebből a szempontból? A szakirodalomban igencsak nagy az ellentmondás. Egyes szerzők szerint az elektív CS kedvezőbb hatással van az oxidatív stressz paramétereire [41, 42]. Fogel és mtsai szerint viszont nem befolyásolja az oxidatív stressz mértékét a születés módja [43]. A születés módján kívül érdemes figyelembe venni az újszülött vérének pH értékét is, ha összehasonlító vizsgálatokat kívánunk végezni. A pH 7,2 alatti érték már erőteljes acidózisra, hypoxiás állapotra utal.

Az IUGR a koraszülöttekhez nagyon hasonló kórkép. Kialakulásában a magzati-placentáris vérkeringés rendellenessége valószínűsíthető, ebben viszont szabad gyökös mechanizmusok is szerepet játszhatnak. A szabad gyökök károsíthatják az érfalat, a vér elemeit, csökkentve ezzel a magzat vérellátását. A szabad gyökök szerepének tisztázása ezért különösen indokolt az IUGR magzatok esetében.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓSZEREK

#### Anyagok

A vizsgálatainkhoz használt vegyszerek analitikailag a legtisztább minőségűek voltak. A Folin-Ciocalteus reagenst és az adrenalinat a Merck cégtől, a DTNB-t (5,5-ditio-bis-nitrobenzoésav) és a TPTZ-t (2,4,6 tripyridil-s triazin) a Flukától szereztük be. A Griess reagens, 2-Thiobarbitursav, NADPH, redukált Glutathion (GSH), Guanindin-HCl, HEPES, 1-klor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) és EDTA Sigma gyártmányúak voltak. Az itt nem említett vegyszerek, puffer alapanyagok pedig Reanal termékek voltak.

#### A vizsgálatba bevont csecsemők

A minták a SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról származtak. A vizsgálatokhoz összesen 277 mintát vizsgáltunk. Kontrollnak (n=182) tekintettük azokat a mintákat, ahol az újszülött tömege  $3350 \pm 550$ g, születés utáni 5 perces Apgar értéke 8-10, és 37-40. gesztációs héten jött világra. Az IUGR csoportba (n=41) sorolt babák testtömege  $1950 \pm 450$ g, és a 37-40. gesztációs héten születtek. A CS és VD, és az epidurális érzéstelenítés összehasonlításban a kontrollcsoport mintái szerepeltek.

A maradék 54 minta koraszülött babáktól származott, ezek a minták az acidózis szerepének vizsgálatánál kerültek felhasználásra.

#### 3.1. Köldökzsinórvérből vizsgált paraméterek

Születés után néhány ml vért gyűjtöttünk a köldökzsinórvérből EDTA-s Vacutainer csövekbe. A plazmát és vörösvértestet centrifugálással szeparáltuk. A különböző meghatározásokhoz Thermo Spectronic Biomate 5 UV-VIS fotométert és 2 csatornás (Hansatech, King's Lynn, UK) fluorimétert használtunk.

##### 3.1.1. Fehérje kvantitatív meghatározása

A fehérjetartalom meghatározására azért volt szükség, mert az egyes vizsgált paramétereket a fehérjetartalomra vonatkoztattuk.

A mintából 10-szeres hígításban hemolizátumot készítettünk. Lowry és munkatársai [44] módszerét alkalmaztuk, melynek elve a következő: a fehérjék Folin reagenssel sötétkék színreakciót adnak. A keletkező színes terméknek 750 nm-en abszorpció maximuma van. Marha szérum albuminnal készített kalibrációs görbe alapján a fotométer beépített szoftvere segítségével meghatároztuk a fehérjetartalmat.

### 3.1.2. Glutacionnal kapcsolatos vizsgálatok

#### *A GSH szint meghatározása*

A mintából 10-szeres hígításban hemolizátumot készítettünk, majd Sedlak és Lindsay [45] módszerét alkalmaztuk, melynek során Ellman-reagenssel nem fehérjéhez kötött SH-csoport meghatározást végeztünk TCA-val fehérjementesített mintából. A DTNB (5,5-ditio-bis-nitrobenzoesav) egy diszulfid vegyület, melyet a GSH redukál. A redukált DTNB élénk sárga színű és 412 nm-nél abszorpció maximummal rendelkezik.

*Szükséges oldatok:*

5% TCA

10 mM DTNB (metanolban oldva)

0,4 M TRIS puffer pH 8,9

A hemolizátumot négyszeres mennyiségű TCA-val kicsaptuk. 10 perc 10.000 fordulat/perccel történő centrifugálás után a felülúszóból kivettünk 1 ml-t, majd ehhez 2 ml TRIS puffert adunk. A színreakciót 0,1 ml DTNB hozzáadásával indítjuk el. 412 nm-en fotometrálunk, és a koncentrációt az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$$[\text{GSH}] = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $131000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### ***A GSSG szint meghatározása***

A mintából 10-szeres hígításban hemolizátumot készítettünk, majd Tietze módszerét alkalmaztuk [46], melynek lényege, hogy a reakcióelegybe feleslegben adagoltunk glutation-reduktáz enzimet, illetve NADPH-t, így a minta GSSG tartalma visszaredukálódik GSH-ná. Kontrollként a Sedlak módszerrel kapott eredményeket (számítást ld. GSH szint meghatározásnál) vesszük, és a 2 eredmény különbségéből következtetünk a GSSG mennyiségére.

#### *Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:9 arányú hemolizátumot készítünk. 0.5 ml hemolizátumot inkubálunk 0,48 ml 0,05 M TRIS pufferben (pH 8,9), 10 µl (250 egység) glutation reduktáz enzimmal és 10 µl 100 µM-os NADPH-val, 30 percen át. Ezután GSH meghatározást végeztünk Sedlak szerint:

$$[\text{GSSG}] = \text{össz } [\text{GSH}] (\text{Tietze}) - [\text{GSH}] (\text{Sedlak}) / 2$$

### ***A GSH szintézis vizsgálata***

A vizsgálathoz a Raftos és mtsai módszerét alkalmaztuk némi módosítással [47]. A módszer elve, hogy mintáinkon szándékosan GSH depléciót idézünk elő, azáltal, hogy lekötöttük a szabad GSH jelentős részét, majd különböző időpontokban történő mintavétellel követtük a GSH szint emelkedését, és ebből következtetünk a szintézis intenzitására.

#### *Szükséges oldatok:*

A oldat: 80 mM KCl, 70 mM NaCl, 0,15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES-Na, 0,1 mM EDTA

B oldat: 80 mM KCl, 70 mM NaCl, 0,15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES-Na, 10 mM glukóz, 2 mM ditioneitol, 5 mM N-acetil-cisztein, 1 mM glicin, 1 mM glutamin

A vörösvértesteket háromszor mostuk A oldatban, 4°C-on. Ez után felszuszpendáltuk a B oldatban úgy, hogy 10%-os hematokrit értékű szuszpenziót kapjunk, majd 20 ml-hez 20 µl 2-vinilpiridint adunk. 1 órán át inkubáljuk 37°C-on. A mintákat továbbra is 37°C-on tartva óránként mintát vettünk és Tietze módszere szerint össz GSH meghatározást végeztünk.

### 3.1.3. A karbonil-protein-szint meghatározása

*Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:99 arányú hemolizátumot készítettünk. A mintában lévő DNS nyomok eltávolítására 10%-os streptomycin-szulfát oldatot használtunk, mert a DNS is tartalmaz karbonil-csoportokat [48].

*Szükséges oldatok:*

20% TCA

2 M HCl

10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin 2 M HCl-ban

2 M HCl

metanol:etil-acetát (1:1)

6 M guanidin-HCl, 20mM kálium-foszfát pufferben oldva

9 egység mintához 1 egység TCA-t adunk, majd centrifugáltuk 5 percen át 10.000 fordulat/percen. A keletkezett csapadékhoz 500µl 2,4-dinitrofenilhidrazint adunk, a vakhoz 500µl HCl-t. Az elegyet 60 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten 5-10 percenként vortexeltük. 500µl TCA-t adunk az elegyhez, majd 5 percig 10000 fordulat/perccel centrifugáltuk A csapadékot háromszor mostuk 1ml metanol:etilacetát eleggyel. A csapadékot 600 µl guanidin-HCl oldatba visszaoldottuk; 37°C-on 10-15 percen belül feloldódtak a fehérjék. 670 nm-en mértük az abszorbanciát.

A karbonil protein koncentráció számítása:

$$[\text{karbonil-protein}] = E \times V_{\text{össz}} \times 10^{-4} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### 3.1.4. A lipidperoxidáció mérése

A mintából 10-szeres hígításban hemolizátumot készítettünk majd Placer és munkatársai módszerét alkalmaztuk némi módosítással [49,50]. A többszörösen telítetlen zsírsavak oxidatív lebomlásakor keletkező malondialdehid (MDA) savas közegben, hőindukált reakcióban tiobarbitursavval (TBA) színes trimetint képez, mely 532 nm-en abszorpciós maximummal rendelkezik.

*Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:9 arányú hemolizátumot készítettünk.

*Reagens összetétele:*

15% TCA

0,375% tiobarbitursav

0,25 N HCl

A hemolizátumhoz tízszeres mennyiségű reagenst adtunk. Az elegyet forró vízfürdőn tartottuk 15 percen keresztül. Jégben lehűtöttük, majd 10 percen át 10.000 fordulat/perccel centrifugáltuk.

A felülúszót 532 nm-en fotometráltuk. Vak oldatként desztillált vizet használtunk a reagensben hemolizátum helyett. A kalibrációt malondialdehid-dietilacetáttal készítettük.

Az MDA koncentráció számítása:

$$[\text{MDA}] = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-2} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $152000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### 3.1.5. Enzimaktivitások mérése

#### *A SOD aktivitás*

Misra és Fridovich [51] által leírt módszert Matkovics és munkatársai módosítása szerint alkalmaztuk [52]. A vizsgálat alapja, hogy a szuperoxid-dizmutáz enzim koncentrációjától függően, lúgos közben az adrenalin-adenokróom spontán átalakulást gátolja. Az enzim nagyon stabil, így aktivitásában kloroform-etanolos kezelés hatására sem történik változás.

#### *Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:9 arányú hemolizátumot készítettünk. A hemoglobint kloroform: etanol (1:2) eleggyel kicsaptuk, mert a vérben lévő hemoglobin zavarta volna a mérést, majd 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 10 percig 10.000 fordulat/perccel centrifugáltuk a mintákat. Az így kapott felülúszót használtuk az enzimaktivitás meghatározására.

#### *Szükséges oldatok:*

0,05 M Na-karbonát puffer pH 10,2

0,009 M adrenalin pH 2

Mérési hullámhossz: 480 nm

Mérési hőmérséklet: 37°C

#### *A mérőelegy összetétele:*

	Vak ml	Kontroll ml	Minta ml
puffer	3	2,9	2,75
adrenalin	-	0,1	0,1
Felülúszó (hemolizátumból)	-	-	0,025



A kontrollmérés arra szolgál, hogy megfigyeljük az adrenalin spontán átalakulását, és meghatározzuk az 1 percre eső extinkcióváltozást ( $\Delta E/\text{perc}$ ). A minta enzimet tartalmaz (vörösvértest esetében csak a Cu,Zn-SOD izoformát), és ezáltal gátolja a spontán autooxidációt.

A gátlás %-ot a következő képlet alapján számítottuk ki:

$$\text{gátlás \%} = \frac{\Delta E_{\text{kontroll}} - \Delta E_{\text{minta}}}{\Delta E_{\text{kontroll}}} \times 100$$

Egységnyinek tekinthető az az enzimmennyiség, amely 50%-os gátlást eredményez.

### ***A KAT aktivitás***

A kataláz enzim aktivitásának meghatározásához Beers és Sizer [53] módszerét alkalmaztuk, amelynek elve a következő: a mérőelegyben lévő  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t a vizsgálni kívánt enzim bontja. A kataláz hatására végbemenő bomlást spektrofotometriásan 240 nm-en követjük.

#### *Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:99 arányú hemolizátumot készítettünk.

#### *Szükséges oldatok:*

0,05 M foszfát puffer pH 7

30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$

A reakcióelegy összetétele:

	Kontroll ml	Minta ml
puffer	3	1,995
hemolizátum	-	0,005
$\text{H}_2\text{O}_2$	-	1

Az extinkció változását 3 percen keresztül regisztráltuk. Egységnyinek tekintettük, ha az enzim 1 perc alatt 1 $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t bont 25°C-on:

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} / \varepsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

EU: enzimegység, E: extinkció,  $\varepsilon$ : moláris extinkciós koefficiens (43600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), V<sub>összes</sub>: mérőelegy térfogata ml-ben, V<sub>minta</sub>: minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben  
Bergmeyer (BU) egységre számítva:

$$\text{BU/ml} = \text{EU/ml} \times 38/10^{-6},$$

ahol 38 a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molsúlya, és 10<sup>-6</sup>, mivel a BU 1g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ra vonatkoztatja az enzimaktivitást.

### ***A GP aktivitás***

Ismert mennyiségű cumene-hidroperoxid (izopropilbenzén-hidroperoxid) és redukált glutation szubsztrát segítségével végeztük a meghatározást [54].

#### *Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:9 arányú hemolizátumot készítünk.

#### *Oldatok:*

0,05 M TRIS-HCl puffer pH 7,5

2 mM GSH

3,3 mM cumene-hidroperoxid

15% TCA

0,4 M TRIS puffer pH 8,9

1 mM DTNB (5,5-ditiobis-nitrobenzoesav, metil-alkoholban oldva)

Minden egyes mintához saját vak oldatot készítünk:

Vak	Minta
0,7 ml puffer (pH 7,5) 0,1 ml hemolizátum 0,1 ml GSH	0,7 ml puffer (pH 7,5) 0,1 ml hemolizátum 0,1 ml GSH 0,1 ml cumene-hidroperoxid
10 perc inkubálás, 37°C-on	
1 ml TCA 0,1 ml cumene-hidroperoxid	1 ml TCA
Centrifuga 10 perc, 10.000 fordulat	
2 ml puffer (pH 8,9) 1 ml felülúszó 0,1 ml DTNB	2 ml puffer (pH 8,9) 1 ml felülúszó 0,1 ml DTNB

Az extinkciókat 412 nm-en olvastuk le. Egységnyi enzim 1 perc alatt egy  $\mu\text{mol}$  szubsztrátot bont le:

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}} \times t$$

EU: enzimegység, E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $131000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben, t: a reakció ideje (perc)

### ***A GR aktivitás***

#### *Minta előkészítése:*

A mintából 10-szeres hígításban hemolizátumot készítettünk.

#### *A reakcióelegy összetétele:*

0,5 ml 0,25 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4

0,1 ml 25 mM EDTA

0,1 ml 7,5 mM NADPH

0,25 ml 0,25mM GSSG

0,05 ml minta

A mérési hullámhossz: 373 nm

1 GR egységnek tekintettük, amikor 1  $\mu$ mol GSSG redukálódott 1 perc alatt (37°C, pH 7,4) [55].

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

EU: enzimegység, E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $62200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### ***A G6PD aktivitás***

A mintából 10-szeres hígításban hemolizátumot készítettünk. Az enzim a glükóz-6-foszfát oxidációját katalizálja  $\text{NADP}^+$  jelenlétében:



A reakció során keletkező NADPH mennyisége arányos a G6PD aktivitással [56].

*Szükséges anyagok:*

0,1 M Trietanolamin puffer pH 7,4	2,59 ml
0,1 M $\text{MgCl}_2$	0,2ml
35 nM G-6-P	0,1ml
11 nM $\text{NADP}^+$	0,1ml

Fél perc késleltetés után 3 percen át mértük a fényelnyelés változását 37°C-on. Egy egységnek azt az enzimmennyiséget definiáltuk, amely egy perc alatt 1  $\mu$ mol piridin nukleotidot képes redukálni.

A keletkező NADPH-t 340 nm-en mérjük.

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

EU: enzimesség, E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $62200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### ***A GST aktivitás***

#### *Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 1:9 arányú hemolizátumot készítettünk.

#### *Szükséges oldatok:*

0,2 M foszfát puffer,	2,5 ml
1 mM EDTA	0,1 ml
20 mM GSH	0,15 ml
20 mM CDNB (1-klór-2,4-dinitrobenzol)	0,15ml

3 percen át mérjük az abszorbcio változást  $37^{\circ}\text{C}$ -on, 340 nm-en [57]:

$$\text{EU/ml} = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-3} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

EU: enzimesség, E: extinkció,  $\epsilon$ : moláris extinkciós koefficiens ( $96000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $V_{\text{összes}}$ : mérőelegy térfogata ml-ben,  $V_{\text{minta}}$ : minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### **3.1.6. Az össz-antioxidáns kapacitás meghatározása**

Benzie és Strain módszerét [58] alkalmaztuk. (FRAP= Ferric Reducing Ability of Plasma). A  $\text{Fe}^{3+}$  ionok –antioxidáns tulajdonságú vegyületek hatására–  $\text{Fe}^{2+}$  ionná redukálódnak, alacsony pH értéken színes ferro-tripiridil-tiazin terméket ad triazinnal (TPTZ=2,4,6 tripiridil-s triazin). A FRAP értéket úgy kaptuk, ha ismert Fe(II) koncentrációjú oldat segítségével kalibrációt készítettünk 593 nm-en. A méréshez a szeparált plazmát használtuk.

#### *Oldatok:*

- 20 mM  $\text{FeCl}_3$
- 10 mM TPTZ
- 300 mM Na-acetát puffer pH 3,6

Reagens: 10 ml acetát puffer + 1 ml TPTZ + 1 ml  $\text{FeCl}_3$

Mérőelegy: 1,5 ml reagens + 50 µl plazma

593 nm-en fotometráltuk az elegyet 5 percen keresztül.

### 3.1.7. Nitrit és peroxinitrit meghatározás

A NO<sub>2</sub> meghatározást Griess reagenssel végeztük [59]. A reagens és a plazma 1:1 arányú elegyét 15 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 540 nm-en fotometráltuk. A vak oldatba desztillált vizet mértünk plazma helyett. A kalibrációt NaNO<sub>2</sub>-al végeztük.

A peroxinitrit jellemző tulajdonsága, hogy magas pH értéken stabil, neutrális pH értéken pedig gyorsan bomlik [60]. 5 µl vörösvértestet mértünk 3 ml 1 M NaOH-ba, és 302 nm-en követtük az extinkció növekedést 3 percen át.

Kontrollként 5 µl vörösvértestet mértünk 100 mM kálium-foszfát pufferbe (pH 7,4), és 3 percen át követtük az extinkció csökkenését.

A számítás menete:

$$[\text{peroxinitrit}] = E \times V_{\text{összes}} \times 10^{-4} / \epsilon \times l \times V_{\text{minta}}$$

E: extinkció,  $\epsilon$ : a termék moláris extinkciós koefficiense (1670 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), V<sub>összes</sub>: mérőelegy térfogata ml-ben, V<sub>minta</sub>: minta térfogata ml-ben, l: fényút hossza cm-ben

### 3.1.8. Filtrációs mérések

*Minta előkészítése:*

A vörösvértestből 5% hematokrit értékű szuszpenziót készítettünk PBS pufferben. (122 mM NaCl, 0,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/l humán szérum albumin pH 7,4).

A méréseket M-100 –as filtrométerrel végeztük. A készülékben lévő kapilláris síkjára merőlegesen 5 mikron pórusátmérőjű membránt helyeztünk fel (Nucleopor Corp., USA). A folyadék áramlása hidrosztatikai nyomáskülönbség hatására indul meg a kapillárisban, a membránon keresztül. A folyadék mozgását száloptikás detektorok érzékelik. A szenzorok 3 egymást követő 20 µl-es térfogatú folyadékrész áramlási idejét mérik, ezek a tranzitidők. Szoftveres kiértékelés után a következő deformabilitás jellemzésére használatos paraméterek állnak rendelkezésre:

1. Kezdeti relatív filtrációs sebesség ( $F_i$ ) (1/s)
2. Átlagos sejt tranzitidő ( $T_c$ ) ( $\mu\text{l/s}$ )
3. Dugulási ráta (CR) (pórusdugulás/ $\mu\text{l}$ )

### 3.1.9. A DNS-károsodás és repair vizsgálata

#### *Genomiális DNS preparálás*

100  $\mu\text{l}$  PBS pufferben átmosott vért 1 ml pufferben (100 mM TRIS-HCl, pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 100  $\mu\text{g}$  proteináz K) inkubáltunk 55°C-on egy éjszakán át. Az emésztés befejezése után 150  $\mu\text{L}$  NaCl-t (6M) adtunk a mintákhoz, és erőteljes szuszpendálást kövözően centrifugáltuk (15 perc 3000 ford./perc), a felülúszóból 0,75 térfogatnyi izopropanollal precipitáltuk a DNS-t [61]. A csapadékot 75%-os etanollal mostuk (egy éjszaka állni hagytuk -20°C) és centrifugáltuk. Az alkohol eltávolítása után a csapadékot desztillált vízben oldottuk fel, és -80°C-on tároltuk.

#### *DNS száltörés meghatározása fluorimetriás módszerrel*

A DNS mintákat három részre osztottuk ( $F$ ,  $F_{\min}$  és  $F_{\max}$  minta).  $F$  méréséhez a DNS-t jéghideg pH 12,4-es pufferban tartottuk, ami a részleges kicsavarodáshoz megfelelő pH érték.  $F_{\min}$  méréséhez a DNS-t jéghideg pH 12,4 es pufferben 1 percig ultrahanggal szonikáltuk, így teljes kicsavarodást értünk el. Az  $F_{\max}$  méréséhez a DNS-t jéghideg pH 10,8-as pufferben tartottuk, ilyenkor nem csavarodott ki a DNS. Az inkubálás minden esetben 30 perc volt 0°C-on, majd 15 perc 15°C-on. Ezután 1  $\mu\text{l}$  ethidium-bromidot adtunk a mintákhoz, és megmértük a fluoreszcenciájukat 520 nm-es excitációs, és 590 nm-es emissziós hullámhosszokat használva [62].

A különböző módon kezelt minták segítségével meghatároztuk a kettős szálú DNS százalékos arányát, a következő képlet szerint:

$$\text{ds DNS}\% = (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min}) \times 100$$

## *DNS repair vizsgálat*

A repair mechanizmusok vizsgálatához a fluorimetriás száltörések mérése előtt a mintákat 3 részre osztottuk. Az első részen nem végeztünk kezelést. A második részt 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-al kezeltük, és azonnal DNS-t preparáltunk belőle. A harmadik részt a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés után 2 órával dolgoztuk fel, időt hagyva a reparációra. A kezeléseket után meghatároztuk a száltörések arányát a fluorimetriás módszerrel.

## **3.2. Az *arteria umbilicalis*ből történő vizsgálat**

### **Az endotheliális NO szintáz (eNOS) enzim expressziójának vizsgálata**

#### *A minta előkészítése:*

Az SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról kapott köldökzinór darabokból  $\approx$ 100 mg tömegű érszakaszt metszettünk ki. A szövetdarabot 1 ml TRI reagensben homogenizáltuk. A reagens kiválóan alkalmas szövetek feltárására, és az RNS tisztítás előkészítésére, DNáz használata nélkül is.

#### *Az RNS tisztítás lépései*

A homogenizátumhoz 200  $\mu$ l kloroformot adtunk, 10 percig állni hagytuk, rázogattuk, majd 20 percig centrifugáltuk 13.500 ford./perccel 4°C-on. A kicsapást kétszer ismételtük. A felső fázishoz 0,75 térfogatnyi izopropanolt adtunk, majd centrifugáltuk 5 percig 13.500 fordulat/perc 4°C-on. A csapadékot 75%-os etanollal mostuk, minimum 1 órán át állt -20°C-on. Az alkohol eltávolítása után a mintát dietil-pirokarbonáttal kezelt, steril desztillált vízben oldottuk fel, és a PCR célú felhasználásig -80°C-on tároltuk.

#### *Ellenőrzés:*

Koncentráció és fehérjetartalom mérést nanodroppal végeztük, majd 1,2%-os agaróz gél elektroforézis segítségével meggyőződünk az RNS minta állapotáról. Az elektroforézist 0,1  $\mu$ g/ml ethidium-bromid jelenlétében, TRIS-acetát puffert használva (40 mM TRIS-acetát, 10 mM EDTA, pH 7,5) kiviteleztük. A mintát akkor tekintettük



megfelelőnek, ha az  $A_{260}/A_{280}$  arány nagyobb volt 1,8-nél, és a gélképen nem tapasztaltuk az RNS sávok elmosódását, tehát a minta degradációját.

#### *Reverz- transzkriptáz PCR*

A reakcióban random hexamerek segítségével az izolált össz RNS-t írtuk át ismét DNS-re, reverz-transzkriptáz enzimet használva. A cDNS szintézis 5µg RNS-ből kiindulva történt 20 µl végtérfogatban. A templát RNS-t 500 pmol random hexamer primer (Promega) jelenlétében 95°C-on denaturáltuk, majd 200 egység reverz transzkriptáz, 20 pmol dNTP keverék és a gyártó (Fermentas) által biztosított reakció puffer jelenlétében 10 percig 37°C-on tartottuk, majd ezt követte egy 42 °C-os 45 perces inkubálás a PCR berendezésben.

#### *A PCR reakció*

Az ecNOS fehérjét kódoló génre tervezett primer szekvenciák a következők voltak:

Forward: 5'gacattgagagcaaggctg 3'

Reverse: 5'tcggctgtcacctcctgg 3'

A belső kontrollként használt β-aktin specifikus primerek szekvenciái:

Forward: 5'gcaagagaggtatcctgacc 3'

Reverse: 5'ccctcgtagatgggcacagt 3'

#### *A PCR reakcióelegy összetétele:*

- 1 µl DNS templát (a RT reakció termékéből)
- 5 egység (1 µl) Taq polimeráz enzim
- 5 µl Taq puffer
- 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM
- 1 µl dNTP, 0,2 mM
- 1 µl forward primer, 0,5 nM
- 1 µl reverse primer, 0,5 nM
- 32,5 µl steril desztillált víz

1 perces 95°C-os elő-denaturációt követően 32-szer ismételtük az alábbi PCR ciklust:

Denaturálás: 95°C, 30 másodperc

Hibridizáció: 60°C, 40 másodperc

Elongáció: 72°C, 30 másodperc

A PCR amplifikációt PTC 150-16 Minicycler-ben (MJ Research) és PTC-200 Peltier Thermal Cyclersben (MJ Research) végeztük. A reakciók során keletkező fragmentek detektálását 1,8%-os agaróz gélen végeztük elektroforézissel.

Az ethidium-bromidos festéssel detektált géleket GDS 7500 gél-dokumentációs rendszerrel digitalizáltuk. Az analízist GelBase/GelBlot™ Pro Gel Analysis Software (UVP) segítségével végeztük.

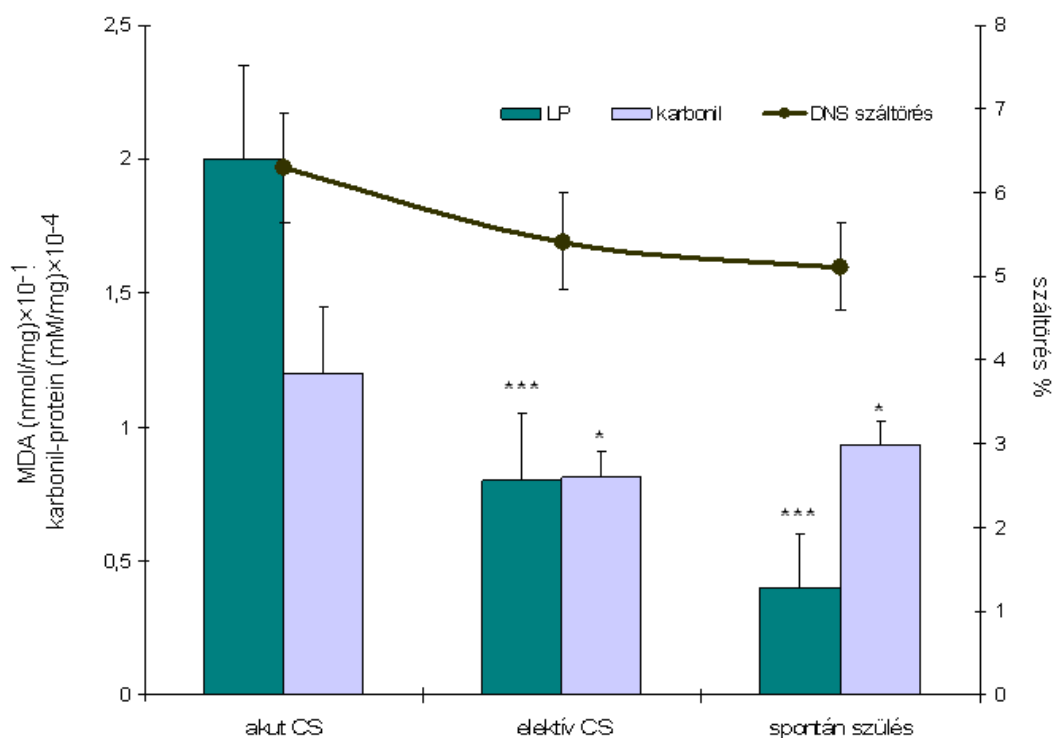
### **3.3. Statisztikai értékelés**

A statisztikai értékeléséhez MedCalc 7.0.1. szoftvert használtunk. Az adatok eloszlásának meghatározása után t-próbát, illetve ANOVA tesztet használtunk, a paraméterek közötti korrelációt Pearson-teszttel vizsgáltuk. Adatainkat, mint átlagot és standard hibát tüntettük fel. Szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket fogadtuk el.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A szünetés módja és az oxidatív stressz

A császármetszés (CS), sokak szerint a sürgősségi esetektől eltekintve kíméletesebb eljárás az oxidatív stressz szempontjából, mint a spontán vaginális szüetés (VSZ). Másfelől viszont a CS egy műtéti eljárás, amely egyben kockázatokat is rejt magában. A vizsgálathoz érett, 37-40 gesztációs héten szüetett újszülöttek köldökzsínór véréet használtuk. Mérési eredményeinket a 8. ábrán illetve az 1. táblázatban mutatjuk be.



**8. ábra Oxidatív károsodás a szüetés módjának függvényében.**

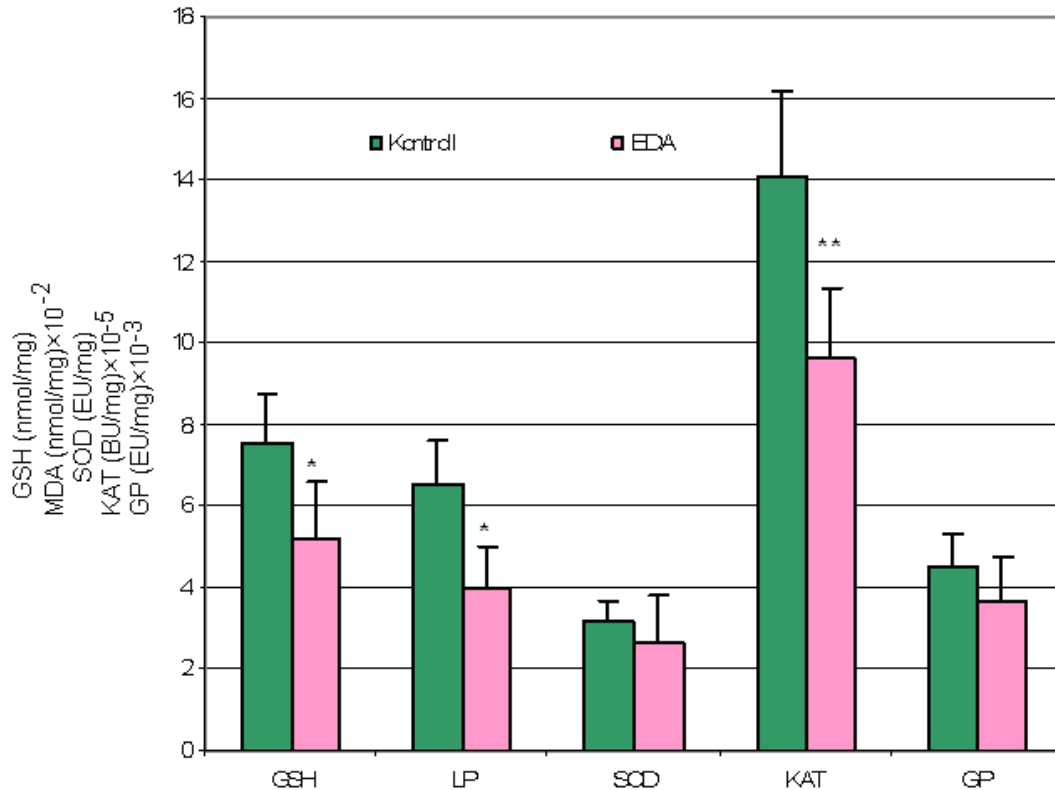
Oxidatív lipid-, fehérje- és DNS- károsodás értékek sürgősségi (n=16) és elektív (CS) császármetszés (n=28), illetve spontán vaginális szüetés (n=46) esetén (\*p<0,5; \*\*\*p<0,01)

	Akut CS n=16	Elektív CS n=28	VSZ n=46
GSH (nmol/mg)	5,22 ± 0,97	2,77 ± 0,71 *	4,18 ± 0,48
SOD (EU/mg)	1,89 ± 0,36	1,12 ± 0,25	1,49 ± 0,28
KAT (BU/mg) × 10 <sup>-4</sup>	9,01 ± 2,23	7,2 ± 2,19 *	8,13 ± 0,95
GP (EU/mg) × 10 <sup>-3</sup>	2,75 ± 0,73	1,73 ± 0,42 *	1,91 ± 0,33
FRAP (nmol/l)	338,7 ± 32,1	306,4 ± 25,4 *	323,5 ± 18,3

**1. táblázat Császármetszés és normál vaginális szülés során fellépő oxidatív stressz a kis molsúlyú antioxidánsok és az enzimek aktivitásának tükrében** (GSH-redukált glutation, SOD-szuperoxid dizmutáz, KAT-Kataláz, GP- glutation peroxidáz, FRAP- össz-antioxidáns kapacitás) Szignifikáns különbség csak az akut CS csoportban mutatkozott (p<0,05)

Az eredményekből azt láttuk, hogy a szignifikáns eltérés csak a sürgősségi CS esetekben adódik, így ezeket az eseteket kizártuk a további vizsgálatokból.

Fontos megjegyezni, hogy az IUGR-s babák többsége CS-el születik, a VSZ-el születőknél pedig epidurális érzéstelenítés ajánlott. Vizsgálataink megerősítik, hogy a fájdalom kiiktatása nemcsak a főtális keringést serkenti, hanem nagymértékben csökkenti az oxidatív stressz mértékét is (9. ábra).



### 9.ábra Az epidurális érzéstelenítés (EDA) hatása az újszülött antioxidáns státuszára

A redukált glutation (GSH) szintje, a lipidperoxidáció (LP) mértéke és a szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (KAT), glutation-peroxidáz (GP) aktivitások epidurális érzéstelenítés hatására ( $n_{EDA}=37$ ;  $n_{kontroll}=50$ )

(\* $p<0,5$ )

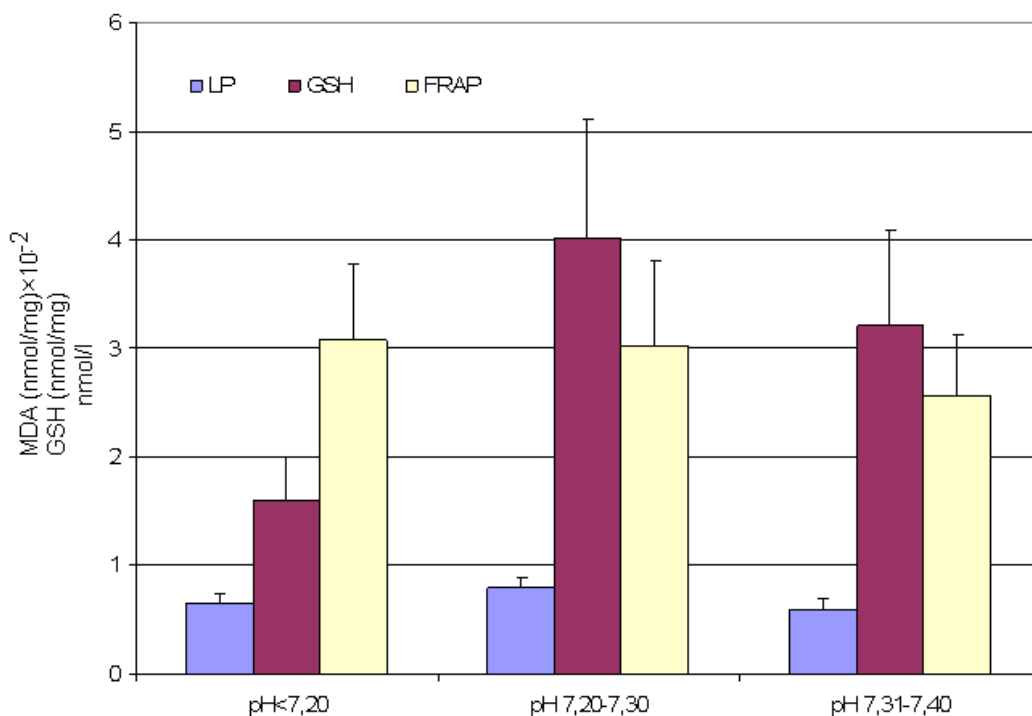
## 4.2. Acidózis

Megszületés után mérik az újszülött vérének pH-értékét. Ennek normális értéke 7,31 és 7,40 közé esik, azonban előfordulhat (koraszülöttekben és IUGR esetén pedig jelentős százalékban előfordul), hogy ez az érték ennél lényegesen alacsonyabb. Ezt a kóros állapotot nevezik acidózisnak.

Az acidózis a szervezet sav-bázis egyensúlyának zavara: az alkáli rezerv csökken, a sav felhalmozódik, a szérum pH értéke 7,35 alá csökken. A *metabolikus acidózis* oka lehet fokozott savképződéssel járó anyagcserezavar, a szervezetben képződő vagy oda bejutó

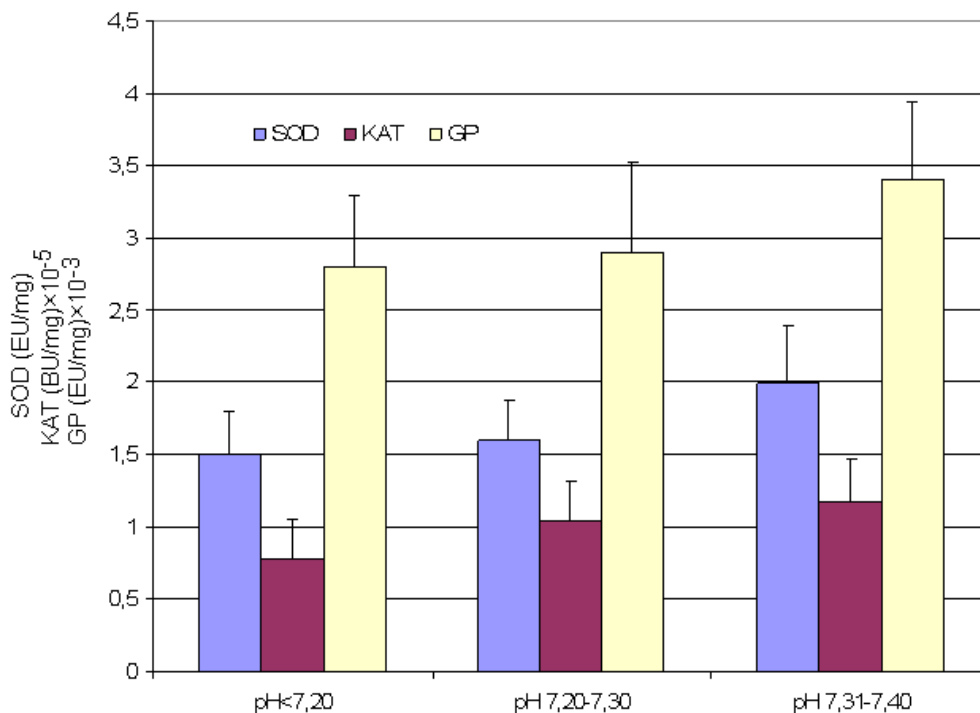
savak csökkent lebontása, fokozott bélnedv-vesztés, vagy renális ok. *Respiratorikus acidózis* akkor jön létre, ha a tüdő gázcsere elégtelensége következtében a CO<sub>2</sub> kiválasztás kisebb, mint a CO<sub>2</sub> termelés, ami hypoxiát eredményez. Kísérleteink során vizsgáltuk az antioxidáns paraméterek változását a pH-érték függvényében.

Vizsgálatainkhoz az eddigiektől eltérően koraszülött babák köldökvérét használtuk. Ennek a választásnak praktikus okai voltak. Az acidózis nagyobb arányban fordul elő IUGR és koraszülött magzatoknál, mint normális súlyú társaiknál. A koraszülések aránya pedig lényegesen nagyobb, mint az IUGR-é. Hozzájárult még az is, hogy a méhen belüli sorvadással küszködő magzatok az esetek jelentős százalékában idő előtt jönnek világra, és ezzel is csökken a vizsgálatainkhoz felhasználható minták száma. Az elégséges mennyiségű mintához tehát egyszerűbben és gyorsabban tudunk hozzájutni úgy, hogy koraszülöttek vérért használtuk.



**10/A. ábra Antioxidáns paraméterek változása a köldökzsínórvér pH-értékének függvényében.**

( LP: lipidperoxidáció, GSH: glutation, FRAP: össz-antioxidáns kapacitás)



**10/B. ábra Antioxidáns enzimek aktivitásának változása a pH-érték függvényében**

(SOD: szuperoxid-dizmutáz, KAT: kataláz, GP: glutation-peroxidáz)

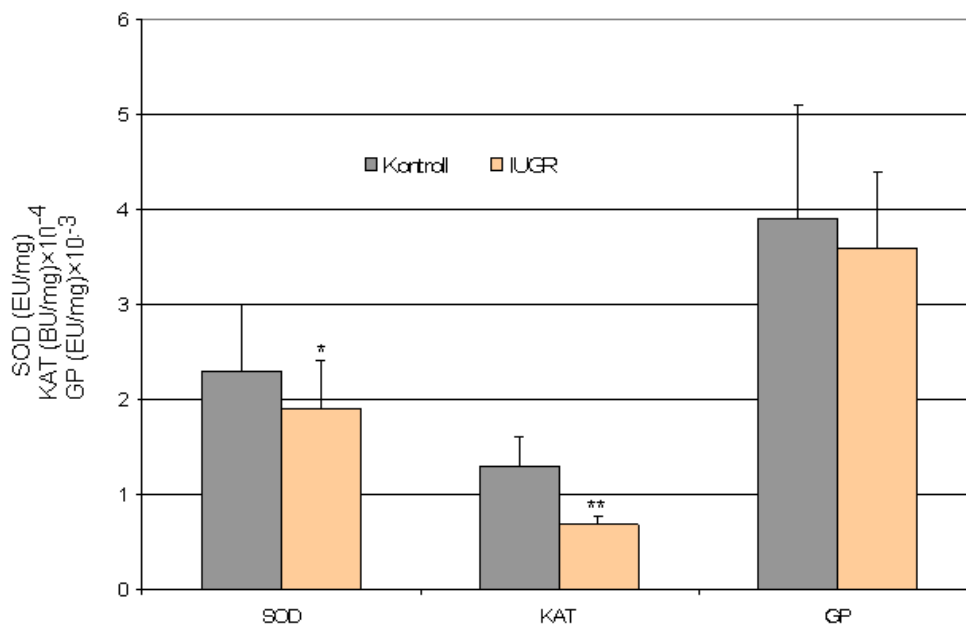
Amint az a 10. ábrán jól látszik a különböző pH-tartományba tartozó csoportok között jelentős különbségek mutatkoznak acidotikus állapot esetén, vagyis alacsony pH-nál. Itt az oxidatív stresszel kapcsolatos paraméterek is alacsonyabbak, ami valószínűleg az erősen hypoxiás környezetnek tudható be. Habár első ránézésre kedvezőnek hat a csoportban tapasztalható alacsony LP érték, de nem szabad megfelekedezni a reperfüziós hatásról. Figyelembe véve az igencsak alacsony GSH szintet, és a mérsékelt enzimaktivitás értékeket, a hypoxiás állapot megszűnése után valószínűleg az LP érték drasztikus növekedésével kell számolni.

A pH 7,2-7,3 tartomány ugyan nem jelez komoly rendellenességet élettani szempontból, ennek ellenére igen jelentős eltérések mutatkoznak oxidatív stressz paraméterek szempontjából a kontrollnak is tekinthető pH 7,31-7,4 csoporthoz képest. Figyelembe véve ezeket a különbségeket, további vizsgálataink során igyekeztünk mintáinkat úgy szelektálni, hogy az ne lehessen szignifikáns befolyással a vizsgálatok eredményeire.

### 4.3. IUGR újszülöttek antioxidáns státusza

#### 4.3.1. Antioxidáns enzimek és össz-antioxidáns kapacitás

A szervezet szabad gyökökkel szembeni védekezésében az antioxidáns enzimek képezik az első védelmi vonalat. Feladatuk a megelőzés. A SOD közömbösíti a szuperoxidaniont, a KAT és a GP pedig a  $H_2O_2$ -t bontja. Méréseink azt mutatják, hogy szignifikáns hiány mutatkozik IUGR újszülöttek antioxidáns védelmében (11/A. ábra) A SOD és KAT enzimek esetében a különbség szignifikáns, míg a glutation-peroxidáz esetében az enzimaktivásbeli hiány IUGR babákban nem tekinthető statisztikailag szignifikánsnak.



**11/A. ábra Antioxidáns enzimek IUGR újszülöttek köldökvérében**

Az IUGR (n=37) és kontroll (n=168) köldökvérek szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (KAT) és glutation-peroxidáz aktivitása

(\*p<0,5; \*\*p<0,05)



	SOD	KAT	GP
GP	R= 0,510, p<0,01	R=-0,635, p<0,05	-
KAT	R=0,395, p<0,05	-	R=-0,635, p<0,01
SOD	-	R=0,395, p<0,05	R= 0,510, p<0,05

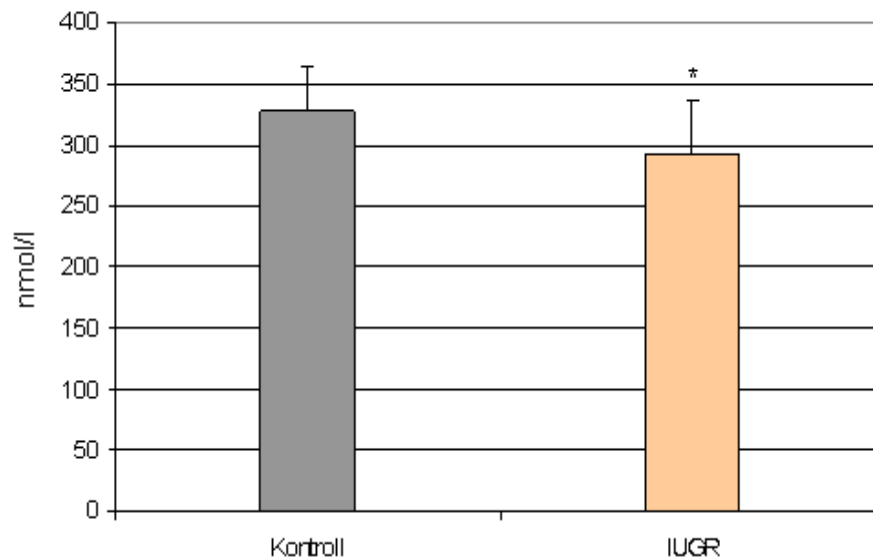
### 11/B. ábra Korreláció az antioxidáns enzimek aktivitásának változása között

(SOD: szuperoxid-dizmutáz, KAT: kataláz, GP: glutation-peroxidáz)

Közepesen erős negatív irányú korreláció tapasztalható az IUGR minták KAT és GP aktivitása között (11/B. ábra). Mivel mindkét enzim képes hidrogén-peroxidot bontani, a korreláció oka valószínűleg az, hogy a csökkent kataláz aktivitást a GP enzim igyekszik kompenzálni.

A védelem második vonalát képezik a kis molsúlyú antioxidánsok. Jelentőségük a ROS eliminálásán túl a gyökös láncreakciók terminálása, így például a membránkárosodás kiterjedésének megakadályozása. Az össz-antioxidáns kapacitás meghatározása is hasonló eredménnyel szolgált, mint az enzimek esetében: az IUGR babák FRAP értéke is alacsonyabb a kontrollcsoportot viszonyítva (12. ábra).

Érdeemes azonban megjegyezni, hogy a FRAP értéke önmagában nem elég egzakt paraméter, ugyanis nem tükrözi pontosan az újszülött állapotát. A magas bilirubin, glükóz és húgysav szint is járhat magas FRAP értékkel, hiszen ezek a molekulák is rendelkeznek gyökfogyó tulajdonsággal. Pontosabb képet kapunk tehát, ha kiragadjuk a talán legfontosabb antioxidáns molekulát, a GSH-t, és kicsit részletesebben megvizsgáljuk.



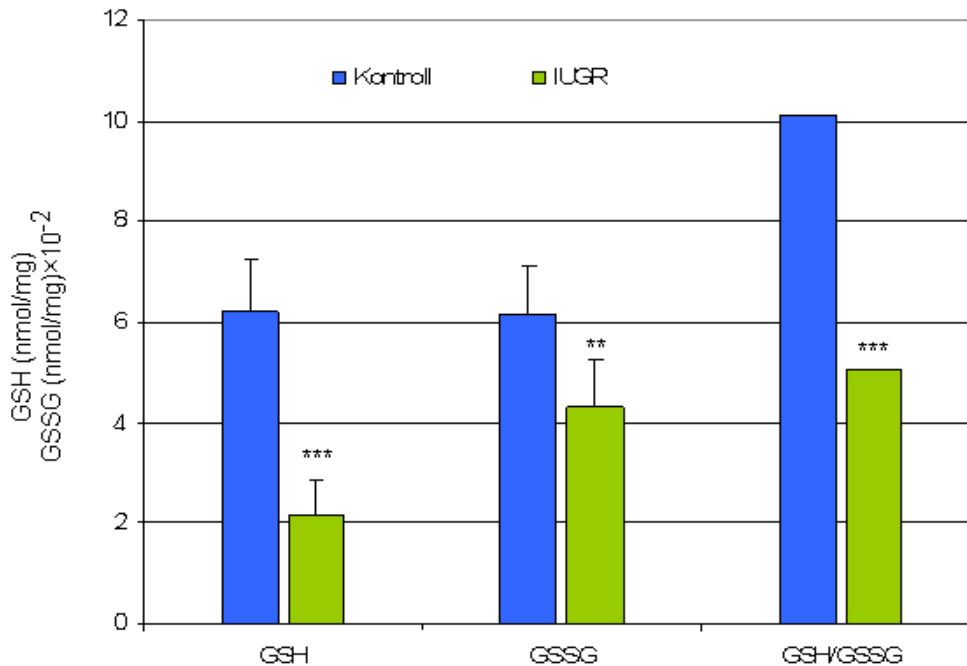
### 12. ábra Az össz-antioxidáns kapacitás

Az IUGR (n=27) és kontroll (n=137) plazmaminták össz-antioxidáns kapacitása  
 (\*p<0,5)

#### 4.3.2. A glutation redox ciklus

A glutation, az egyik legjelentősebb kis molsúlyú antioxidáns, a sejtekben nagy koncentrációban van rá szükség a fehérjék –SH csoportjainak védelme érdekében.

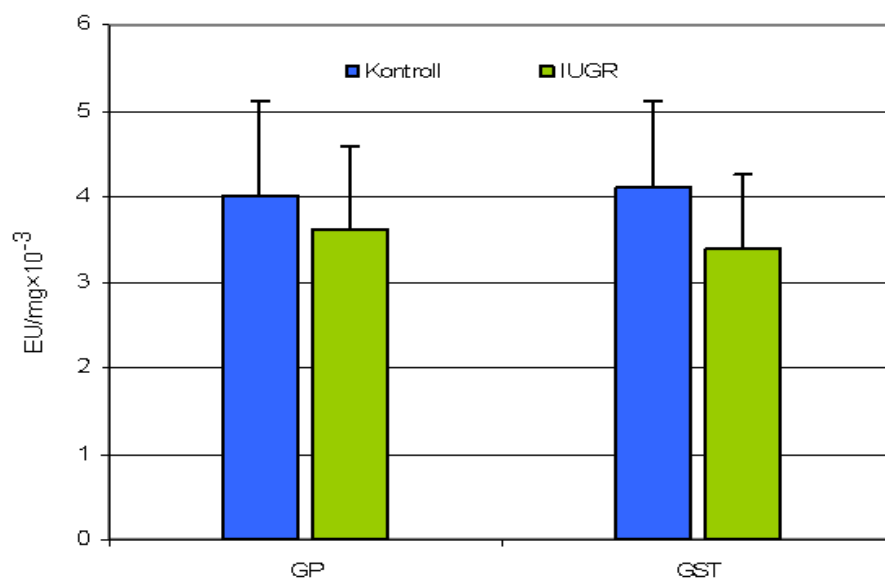
IUGR újszülötteknél szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollcsoportéhoz képest. (13. ábra). Az összes vizsgált paraméter közül a GSH szintje mutatta a legnagyobb eltérést az IUGR mintákban.



### 13. ábra A redukált és oxidált glutation aránya

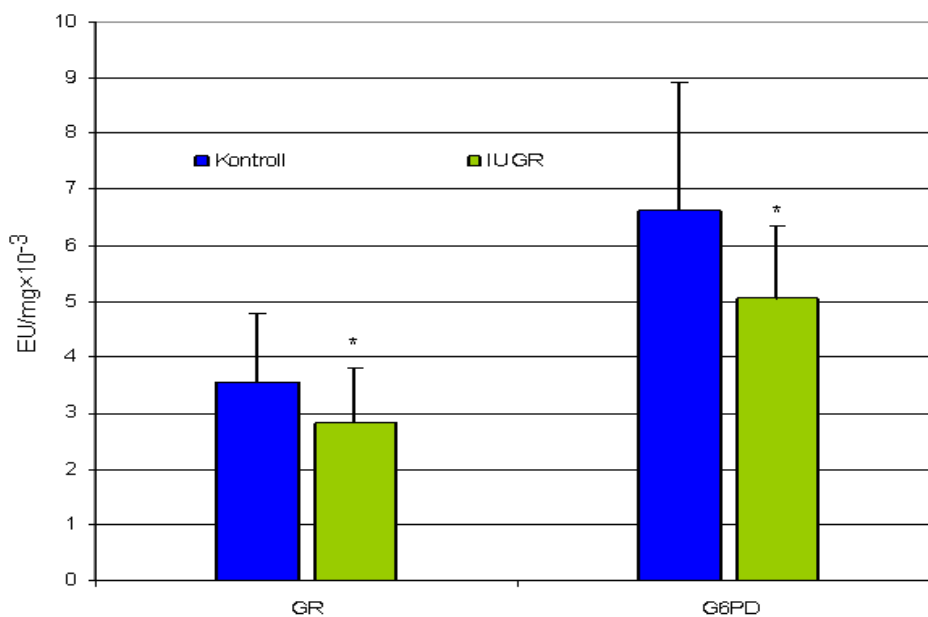
A glutation redukált (GSH) és oxidált formájának (GSSG) szintje, illetve ezek aránya IUGR (n=35) újszülötteknél kontrollokhoz (n=173) viszonyítva (\*\*p<0,05; \*\*\*p<0,01)

Az oxidált forma az alacsony GSH szint ellenére is viszonylag nagy mennyiségben van jelen az IUGR-s vérben. A GSH/GSSG arány is kedvezőtlen, jellemző a citotoxikus oxidált forma erőteljes jelenléte. Ha az össz-glutacion tartalmakat hasonlítjuk össze a két csoportban (GSH+GSSG), akkor azt látjuk, hogy ez az érték is alacsonyabb az IUGR mintákban. Ez az észrevétel szükségessé tette a GSH szintézisének vizsgálatát is (16.ábra).



**14. ábra A redukált glutationt felhasználó enzimek aktivitása**

A glutation-peroxidáz (GP) és a glutation-S-transzferáz (GST) enzimek kontroll- (n=112 )  
és IUGR (n=31) újszülöttek vérében

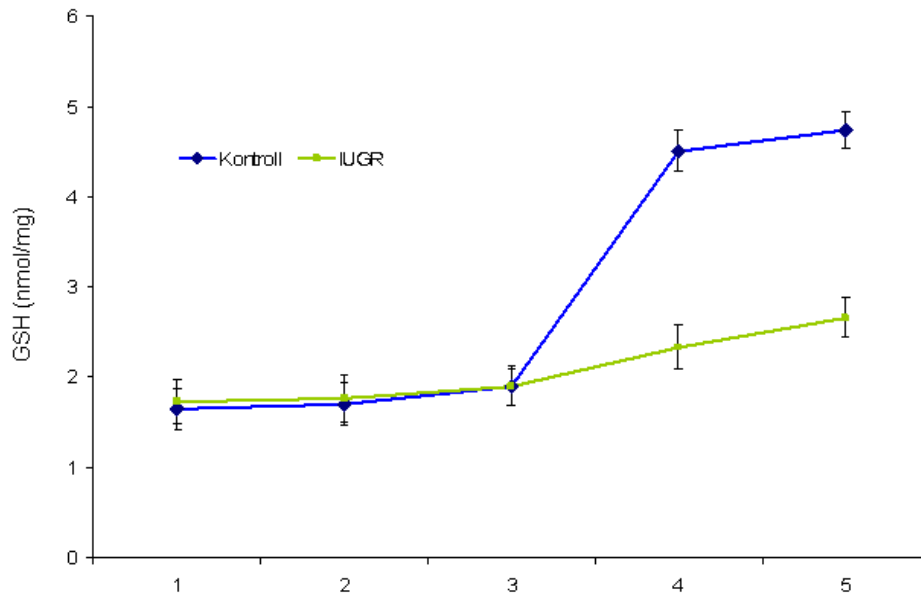


**15. ábra A glutation raktár regenerációjáért felelős enzimek aktivitása**

A glutation-reduktáz (GR) és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) enzimek kontroll-  
és IUGR újszülöttek köldökzsínórvérében

(\*p<0,5)

Az eredményeket összegezve azt látjuk, hogy míg a glutation felhasználásban nem mutatkozik különbség a 2 csoport között (14.ábra), az IUGR újszülöttek glutation-szintézise és regenerálása is szignifikáns mértékben csökkent a kontrollcsoportéhoz képest (15. és 16. ábra).



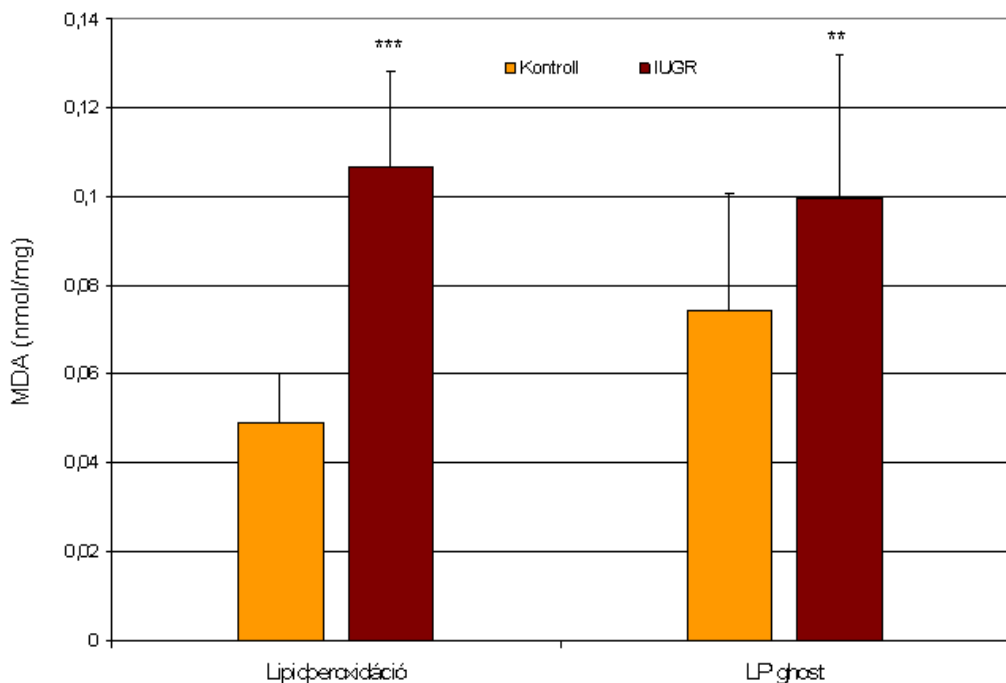
**16.ábra A glutation-szintézis**

A glutation koncentráció növekedése 2-vinilpiridin kezelést követően kontroll- (n=17) és IUGR (n=11) újszülöttek vérében

### 4.3.3. A vörösvértestmembránok vizsgálata

A vörösvértest átlagosan 7  $\mu\text{m}$  átmérőjű, mégis képes áthaladni a 4-5  $\mu\text{m}$ -es kapillárisokon is. A rájuk nehezedő hajtóerő és az erek falának ellenállása révén különböző alakokat kénytelenek felvenni, de átjutva a nagyobb átmérőjű kapillárisokba, azonnal képesek visszanyerni eredeti diszkoid formájukat. A lehetséges alakok közül ez a kitüntetett, mert fenntartásához a legkisebb energiát igényli. Intakt membrán nélkül az

eritrocita nem képes megfelelően deformálódni, a magas LP értékek pedig kiterjedt membránkárosodást sejtetnek (17. ábra).



### 17. ábra A lipidperoxidáció

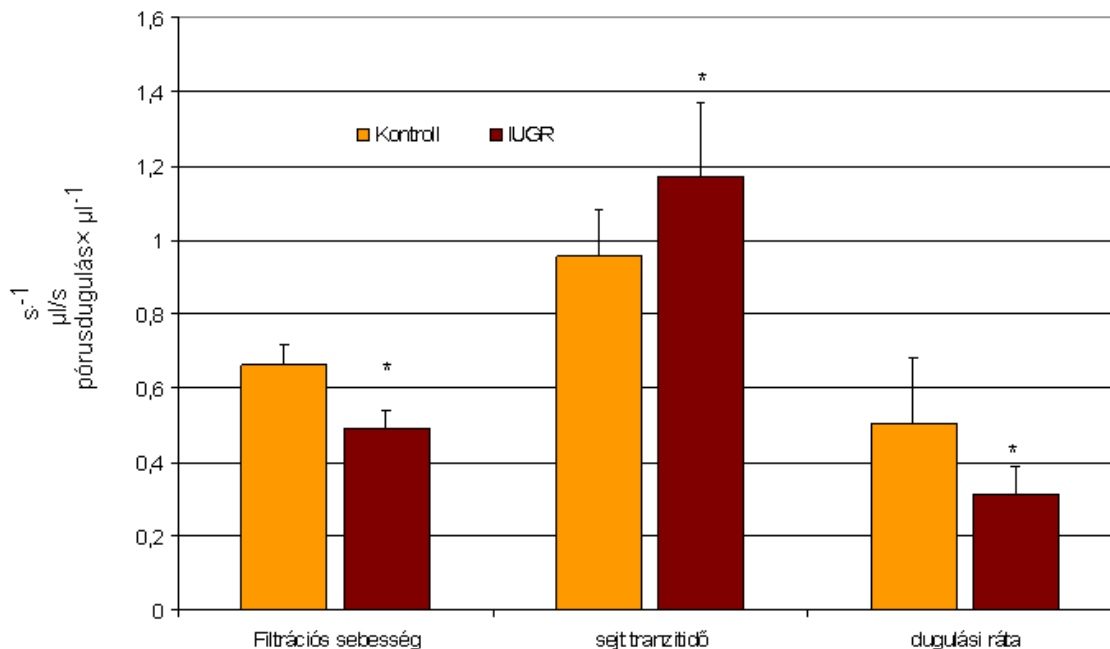
A lipidperoxidáció alakulása IUGR (n=28) és kontroll- (n=165) újszülöttek köldökvérében. Külön vizsgáltuk a lipidkárosodást egész sejteken, illetve a tisztított vörösvértestmembrán frakción (LP ghost).

(\*\*p<0,05; \*\*\*p<0,01)

Az eritrocitamembránokon történő méréseket, vagyis az LP ghost értékeket fontosnak tartottuk külön is vizsgálni, mivel a megfelelő eritrocita deformabilitást csak intakt membránok teszik lehetővé.

A filtrációs tesztek azt a folyamatot próbálják modellezni, amikor a 7 mikronos sejt egy átmérőjénél kisebb kapillárisba kényszerül. Intakt sejteknek nem okoz problémát az

átjutás, károsodott membránok esetében azonban az átjutás nehézkes, a filtrációs idő növekszik. IUGR esetben pontosan ezt tapasztaltuk (18. ábra).



### 18. ábra Hemorheologiai paraméterek

IUGR (n= 19) és kontroll (n=57) vörösvértestek rheologiai jellemzői.

(\*p<0,5)

A filtrációs sebesség alacsonyabb az IUGR csoportban, ami azt jelenti, hogy a membránok kevésbé intaktak, így deformációs készségük is kisebb. A sejt tranzitidő és a dugulási ráta a filtrációs időnek megfelelően alakult, tehát szintén a kontrollcsoportban mutat kedvezőbb értékeket.

A lipidperoxidáció és a filtrációs paraméterek között szoros negatív korreláció mutatkozik (2. táblázat). A korreláció elemzéséhez azokat a mintákat használtuk fel, amelyeken LP és filtrációs tesztet egyaránt végeztünk.

<b>Relatív filtrációs sebesség és lipidperoxidáció</b>		
	Kontroll	IUGR
<b>Korrelációs koefficiens (R)</b>	-0,752	-0,924
<b>Szignifikancia</b>	p<0,01	p<0,05

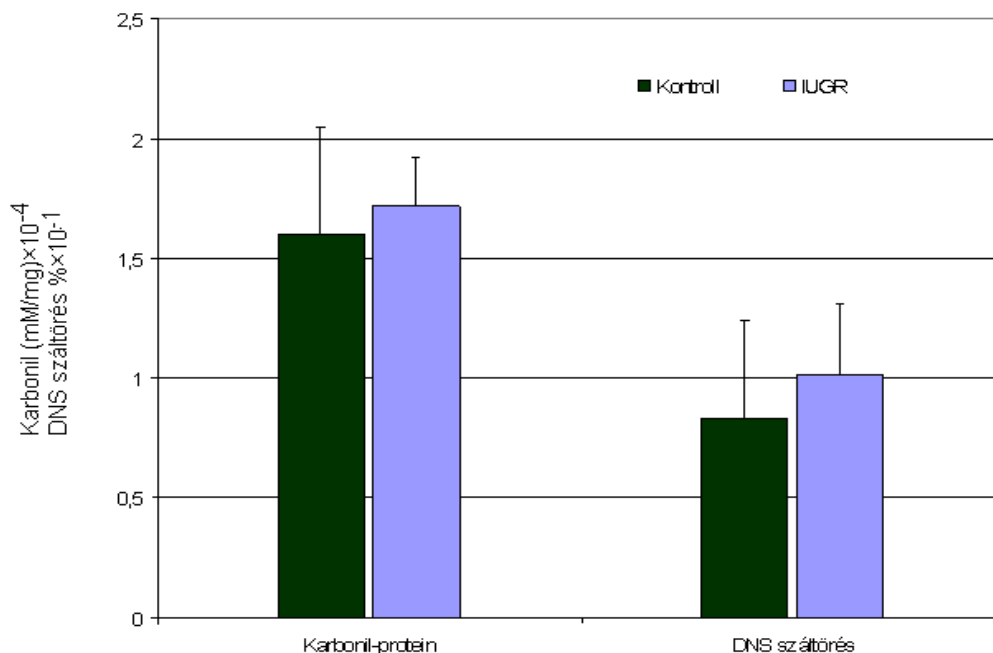
**2. táblázat Korreláció (R) a lipidperoxidáció mértéke és az eritrocita deformálódási képessége között**

Magas LP esetén a membránok veszítenek deformációs készségükből, ezért filtrálhatóságuk csökken. A kétfajta módszerrel mért eredmények tehát megerősítik egymást.

**4.3.4. Oxidatív fehérje- és DNS-károsodás**

A lipidek szerkezetükből adódóan különösen hajlamosak oxidatív támadást elszenvedni, azonban ez nem jelenti, hogy más biomolekulák nem károsodhatnak. A protein-karboniláció mértékének meghatározása elterjedten használt markere az oxidatív stressz által okozott fehérjekárosodás jellemzésének. A DNS-károsodás jellemzésére a száltörések arányát vizsgáltuk, amelyet fluorimetriás módszerrel határoztunk meg (19. ábra).





### 19. ábra Oxidatív fehérje- és DNS-károsodás

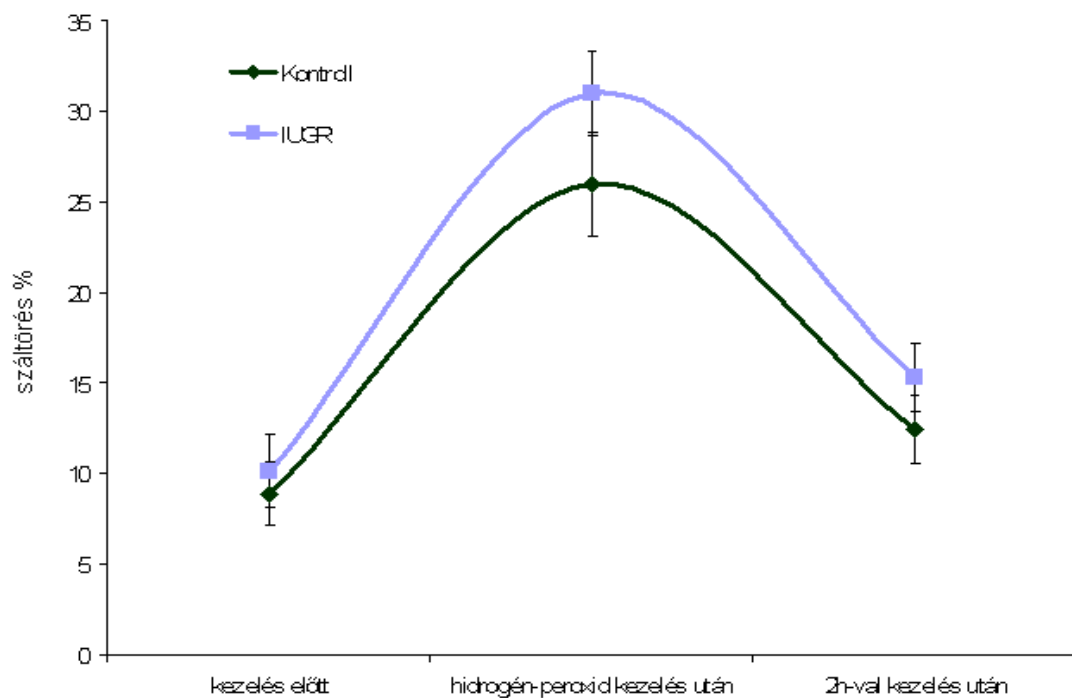
A karbonil-protein-szint és DNS-száltörés kontroll- ( $n_{\text{karbonil}}=122$ ;  $n_{\text{DNS}}=46$ ) és IUGR ( $n_{\text{karbonil}}=21$ ;  $n_{\text{DNS}}=11$ ) újszülöttek köldökvérében.

IUGR újszülötteknél kissé emelkedett DNS-száltörés és karbonil-protein-szintet tapasztaltunk, a különbség azonban egyik esetben sem szignifikáns.

DNS-károsodás esetén az eredmény egyrészt statisztikailag nem szignifikáns, másrészt a kontrollmintákon tapasztalt jelentős szórás miatt sem állíthatjuk, hogy lényeges eltérést tapasztaltunk IUGR esetben.

Mindezek ellenére kíváncsiak voltunk, vajon a DNS-repairt vizsgálva adódik-e lényeges különbség a két csoport között. Összeállítottunk egy *in vitro* rendszert, melyben azt vizsgáltuk, hogy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezelést követően milyen gyorsan csökken a DNS-en a száltörések aránya az egyes csoportokban, és az értékek változásából következtettünk a repair mechanizmusok aktivitására.

A kísérlet eredményét a 20. ábra szemlélteti.



## 20. ábra A DNS-repair vizsgálata

*In vitro* DNS repair vizsgálat 10-10 kontroll, illetve IUGR mintában

A 2 csoport között 1mM-os  $H_2O_2$  kezelés hatására mintegy 20%-al emelkedett a száltörések száma, viszont ha elég időt hagyunk a mintáknak a repair mechanizmusokhoz, ez az érték normalizálódott, és nem tapasztaltunk különbséget a 2 csoport eredménye között. A DNS-repair tehát mindkét csoportban megfelelően működik, így az IUGR mintákban tapasztalt kissé emelkedett DNS-károsodás a fokozott oxidatív stressz, és nem pedig a hiányos repair következménye.

### 4.3.5. A nitrogén-monoxid szerepe

#### *Az ecNOS expressziójának vizsgálata*

Az expressziós vizsgálatokhoz köldökszínór darabokat gyűjtöttünk. Az IUGR-s köldökszínór szemmel is jól láthatóan fejletlenebb, kisebb átmérőjű, mint a normál súlyú újszülötteké. A NO-nak jelentős szerepe van a vérnyomás, a megfelelő véráramlás szabályozásában, ezért feltételeztük, hogy expressziója IUGR esetekben eltérést mutathat.

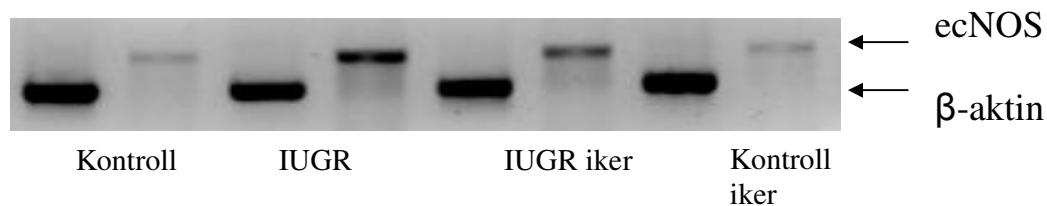
Köldökszínór artériából körülbelül 100 mg-os darabokat használtunk az RNS izoláláshoz. Az izolátumok tisztaságát és épségét agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk. A gélkép alapján a további vizsgálatokból ki kellett zárni azokat a mintákat, amelyek nem közvetlenül a születés után kerültek feldolgozásra. Ezeknél a mintáknál ugyanis a gondos  $-80^{\circ}\text{C}$ -os tárolás ellenére is erőteljes RNS degradációt tapasztaltunk, különösen a 18S RNS sávban. Így a kísérletben csak olyan mintákat használtunk fel, melyeknél az RNS izolálását közvetlenül a születés után, köztes tárolás nélkül végeztük.

Az ép mintákon RT-PCR-t végeztünk, hogy kiderítsük változik-e az ecNOS enzim expressziója IUGR esetben. A PCR reakciót  $\beta$ -aktinra specifikus primer párok segítségével is elvégeztük, és az általuk kijelölt amplikont használtuk belső kontrollként az ecNOS eredmények kvantitálásához. Az eredményeket a 21. ábra szemlélteti.

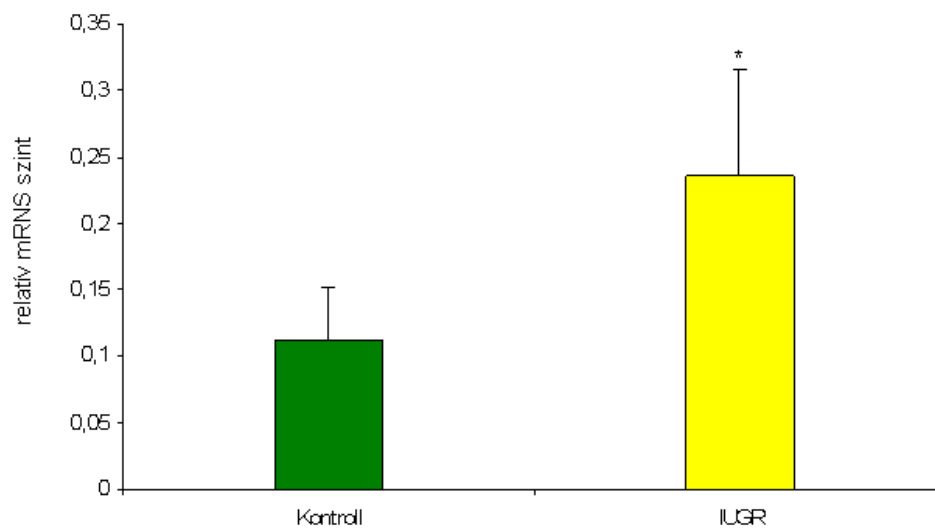
A reprezentatív minták mellett bemutattunk egy kiragadott esetet is. Egy vizsgált kétpetűjű ikerpárnál az egyik testvér IUGR-al született, míg a másik normál tömeggel jött világra. Így az IUGR-s babát nem a kontrollcsoporthoz érdemes hasonlítani, hanem saját ikertestvéréhez (21/A.ábra).

Az eredményeket elemezve, és az RNS relatív ( $\beta$ -aktinhoz viszonyított) mennyiségét meghatározva lényeges eltérést tapasztaltunk az IUGR minták ecNOS expressziójában a kontrollcsoporthoz képest. A különbség több, mint kétszeres (21/B.ábra).

A)



B)



### 21. ábra

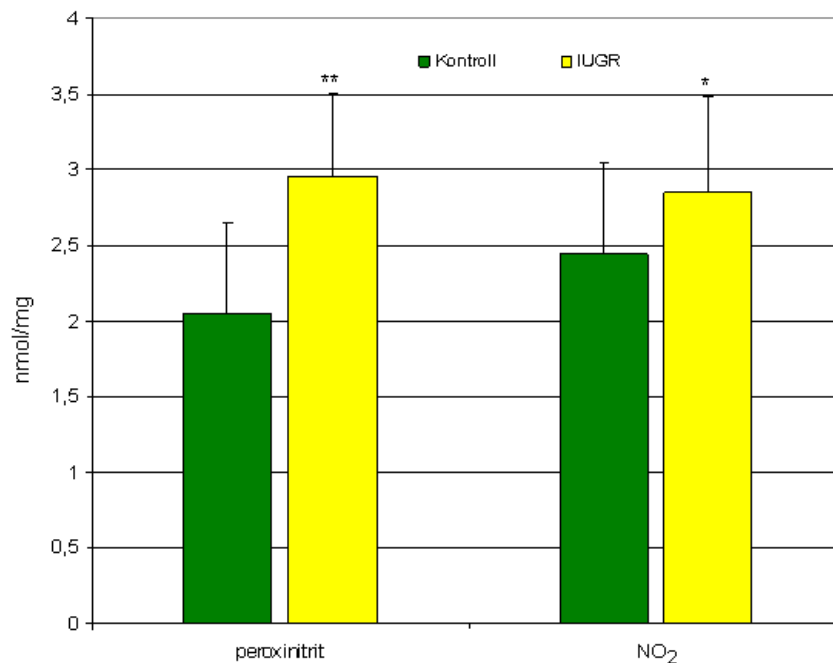
(A) RT-PCR-t követően ecNOS-ra IUGR esetben (2. sáv) lényegesen erősebb jelet kaptunk, mint kontroll- (1. sáv) esetben. A 3. és a 4. sávban egy ikerpár eredményeit láthatjuk, az erősebb jel az IUGR, míg a gyengébb a normális súlyú babához tartozik.

(B) Az egyes ethidium-bromiddal festett gélek digitalizálásával és denzitometriás összehasonlításával számított értékek. Belső kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk, és az értékeket ecNOS/  $\beta$ -aktin arányban fejeztük ki

(\* $p < 0,5$ )

### Nitrit- és peroxinitrit- koncentráció

Az ecNOS expressziós vizsgálatokhoz tartozó köldökzsínór minták plazmájában kiegészítésképpen meghatároztuk a nitrit- és peroxinitrit-szintet is (22. ábra).



**22.ábra Nitrit és peroxinitrit szint**

A peroxinitrit- és nitrit-koncentráció IUGR (n=11) és kontroll- (n=13) köldökzsínór plazmában.

(\*p<0,5; \*\*p<0,05)

A ecNOS eredményeket, mintegy alátámasztva a peroxinitrit- és a nitrit-koncentráció is szignifikánsan magasabb értékeket mutat IUGR mintákban. Tekintve, hogy a peroxinitrit citotoxicitása jelentős, ez az eredmény további magyarázattal szolgálhat a magas lipid-, protein-, illetve DNS-károsodási paraméterekre és a GSH-deplécióra.

## 5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A méhen belüli retardáció a születendő gyermekek 5-6%-t fenyegető betegség. IUGR-nak tekintenek minden olyan újszülöttet, vagy magzatot, akinek a súlya nem éri el az adott gesztációs időhöz tartozó normálisnak deklarált súly 90%-át. Terminus babák esetében ez 2500 g-ot jelent, vagyis az ennél kisebb tömegű újszülötteket. A betegség legfőbb hatásai nem feltétlenül a születés után nyilvánulnak meg, habár a születés körüli megbetegedések és halálozások aránya kifejezetten magas ebben a csoportban [ld. 29, 30]. Sok esetben az IUGR újszülöttek hamar utolérik társaikat, ennek ellenére náluk sokkal nagyobb bizonyos betegségek (pl.: diabetes, szív és érrendszeri betegségek, idegrendszeri károsodások, asthma) már fiatal korban történő kialakulása.

A fejlődés lassulásának, illetve esetenként teljes leállításának oka még nem tisztázott, habár sok egyéb rendellenességgel kapcsolatba hozható. Munkánk alapvető célja az IUGR patomechanizmusának vizsgálata és részletesebb megértése volt, és ezt a kérdést az oxidatív stresszel kapcsolatos paraméterek felderítésével kívántuk megközelíteni. A SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikától kapott nagyszámú minta azonban lehetővé tette számunkra, hogy egyéb szempontokat is figyelembe vegyünk vizsgálatainknál.

Az egyik ilyen kitérőt a császármetszés (CS) hatásának vizsgálata jelentette. A közvélemény szerint, az elektív CS biztonságosabb módszer, mint a spontán vaginális szülés (VSZ). A szülészek, nőgyógyászok általában nem osztják ezt a véleményt. Kíváncsiak voltunk, hogy a biokémiai paraméterekben fellelhető-e különbség a kétféle születési mód között.

Számos egymásnak igencsak ellentmondó közlemény látott napvilágot, melyek azt vizsgálják, melyik születési mód a legkíméletesebb az oxidatív stressz szempontjából az anya és a magzat számára egyaránt. Míg egyes szerzők állítják, az elektív császármetszést mérsékeltebb oxidatív stressz kíséri [41, 42], mások nem találtak összefüggést a születés módja és az oxidatív stressz mértéke között [43]. Saját méréseink értékeléséből az tűnik ki, hogy habár van némi eltérés a különböző születési módok között, ezek az eltérések nem következetesek és nem szignifikánsak. Érdekes volt azonban, hogy az epidurális érzéstelenítéssel született újszülöttek esetében mindig kedvező értékeket tapasztaltunk, vagyis fájdalom kiiktatása nemcsak a magzat vérkeringését serkentette, hanem nagymértékben csökkentette az oxidatív stressz mértékét is.

A CS hatása az oxidatív stressz paramétereire az IUGR kutatás szempontjából is jelentőséggel bír, ezek az újszülöttek ugyanis általában CS-el jönnek világra. Habár lényegi különbséget nem tapasztaltunk a kétféle módszer antioxidáns státuszra gyakorolt hatása között, ügyeltünk arra, hogy az IUGR és a kontrollcsoportban a VSZ és a CS aránya megegyező legyen.

Az eredmények, és a statisztikai értékelés azt mutatja, hogy az IUGR-ban szenvedő újszülöttek antioxidáns védelme a koraszülöttekéhez hasonlóan fejletlen [41]. Az össz antioxidáns kapacitás, és a redukált glutation antioxidáns molekula szintje is szignifikáns mértékben elmarad az érett újszülöttekhez képest. Az utóbbi nemcsak alacsonyabb koncentrációban van jelen, hanem szintje gyakorlatilag minimálisnak tekinthető. A teljes GSH-redox-ciklus vizsgálatára szükségünk volt, hogy magyarázatot találjunk a jelenségre. A GSH készlet regenerációjáért felelős enzimek aktivitása, különösen a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim esetében szignifikánsan alacsonyabb volt az IUGR csoportban a kontrollcsoportéhoz képest. A GSH szintézis mértéke is szignifikánsan elmaradt a kontrollcsoportéhoz képest. A GSH-t kofaktorként felhasználó enzimek szempontjából azonban nem találtunk eltérést az IUGR csoportban. További vizsgálatainkból az is kiderült, hogy nemcsak a oxidatív, hanem a nitrozatív stressz is jelentős az IUGR újszülöttek köldökvérében. Így arra következtetünk, hogy ezen paraméterek additíven járulnak hozzá a GSH deplációhoz. Irodalmi adat egyelőre nem áll rendelkezésre a teljes GSH redox ciklusról IUGR újszülötteknél, de leírtak GSH deplációt alultáplált anyák esetében [63], illetve csökkent GP aktivitást placentában preeklampsziával komplikált terhességnél [64].

Az enzimaktivitások összehasonlítása is alátámasztotta elképzeléseinket, az IUGR-es mintákban a SOD és a KAT aktivitás szignifikánsan alacsonyabb a kontrollnál. A glutation-peroxidáz enzim esetében nem tapasztalható szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest. Valószínűleg az alacsony kataláz kompenzálására tett kísérlet eredménye, hogy a glutation-peroxidáz aktivitása megfelelő mértékű, hiszen régóta ismert, hogy ez az enzim is rendelkezik  $H_2O_2$  bontó aktivitással, így képes eliminálni a SOD működése során képződő, mérgező hidrogén-peroxid molekulákat. A különbség a két enzim között az, hogy a kataláz enzim affinitása magasabb  $H_2O_2$  koncentráció esetén nagyobb [65]. Antioxidáns enzimaktivitások, és LP tekintetében a mi eredményeinkhez hasonló összefüggést írtak le Biri és mtsai [66]. A KAT és LP értékeket szignifikánsan magasabbnak találták mind anyai, mind újszülött vérben, illetve a placentában, és a GP aktivitásban nem tapasztaltak szignifikáns eltérést. Az általuk vizsgált mintákban azonban a SOD aktivitások

magasabbak voltak az IUGR mintákban, amit a KAT csökkent aktivitásának kompenzálására kialakuló mechanizmussal magyarázható.

A magzati vérkeringés kis és nagy vércöre lényegesen különbözik a születés utánitól. A magzatburkok kialakulásával a magzatnak az anyai szervezet biztosítja a táplálékot, és mivel a fötusz tüdejében nincs gázcsere, az oxigént is. Az anyagcsere az anya és a magzat között a placentán keresztül bonyolódik. Az anya vére az oxigént és a szükséges tápanyagokat a placentán át juttatja el a magzat vérébe és ugyancsak ezen keresztül viszi fel az anya vére a magzat véreből a szén-dioxidot, valamint a salakanyagokat. A szállítást a magzati vérkeringés biztosítja úgy, hogy a köldökszinórban futó két köldökartéria a magzattól az elhasznált vért a méhlepény felé szállítja, a magzat irányába haladó köldökvéna pedig a tápanyag és oxigéndús vért viszi a fejlődő magzathoz.

A keringés integritását alapvetően meghatározza a perifériás artériás rezisztencia. Az erek endothel sejtjeinek egyik fő funkciója az értónus autoregulációs szabályozása vasoconstrictor és vasodilatator anyagok elválasztásával, melyek az érfali simaizomzatra fejtik ki hatásukat. Az endothel sejt a NO-t L-argininből szintetizálja NOS segítségével. Normál endothel funkció esetén, humorális és mechanikai ingerek hatása szabályozza a NO termelést. Ilyen ingerek az acetilkolin, ADP, bradykinin, hisztamin, thrombin, P-anyag és a fokozott áramlás miatt keletkező nyírófeszültség. Valószínűleg a nyírófeszültség változása az NO szintézis fő fiziológiai ingere. A NO erőteljes vazodilatátor tulajdonsággal rendelkező anyag, mely hatását a cGMP szignalizációs útvonalon fejt ki, így termelődése esetén jelentősen csökkenti a perifériás vaszkuláris rezisztenciát [67].

A magas ecNOS expresszió valószínűleg egy adaptációs válasz a magzati keringésben uralkodó magas perifériás rezisztenciára. A magas NO szint tehát egy kompenzációs mechanizmus eredménye. Az NO, mint vasodilatátor hatékonyan járulhat hozzá a renyhe magzati vérkeringés serkentéséhez. Eredményeinket alátámasztja, hogy megnövekedett nitrit és nitrát szintet írtak le IUGR köldökvénából származó plazmában [68]. Mások pedig IUGR placentában találtak a miénkhez hasonlóan emelkedett ecNOS mRNS szintet [69].

Másrészről viszont figyelembe kell venni azt is, hogy az IUGR babák SOD aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a kontrollcsoportéhoz képest. A SOD enzim felel a szuperoxidgyök közömbösítéséért. Hiányos enzimaktivitás esetén a szuperoxid-szint növekszik. A szuperoxidgyök könnyedén reagál az NO-val, és a reakciójukból keletkezik a stabil és toxikus peroxinitrit. A peroxinitrit citotoxicitása több szinten is érvényesül. Egyrészt LP-t iniciál [70], másrészt megtámadja a -SH csoportokat [71] protein-



degradációt és GSH-depléciót okozva. Harmadrészt a DNS-t károsítja. A DNS károsodásának a sejten belüli mutató következményeivel is számolni kell. A peroxinitrit a száltörések generálásán és a bázismódosulatok kialakításán túl a poli(ADP-ribóz)-szintetáz is aktiválhatja, ami a számos nukleáris fehérjéhez kovalensen kapcsolja a poli(ADP-ribóz)-t, ezáltal a katalitikus aktivitást csökkentik, és például a H1 hiszton esetében kromatin relaxációt eredményez. A peroxinitrit kis koncentrációban apoptózist indukálhat, nagy koncentrációban azonban nekrozishoz vezet [72]. A reaktív NO származék neve, DNS károsító hatása révén jogosan merül fel a karcinogenezis kapcsán is [73].

A LP-nak vörösvértestek esetében különösen nagy jelentősége van. Ezek a sejtek jelentős mértékű alakváltoztatásra képesek, hogy a legkisebb átmérőjű kapillárisba is bejussanak. A membránintegritás alapvető feltétele a megfelelő deformációs képességnek. Amint azt az LP mérések és a filtrációs kísérletek is mutatják, IUGR mintákban a vörösvértestek nem kellőképpen intaktak. A magas LP értékek és az alacsony filtrációs sebesség arra utal, hogy a rugalmasság csökkenésével a vörösvértestek nem tudják teljes mértékben ellátni szállítójukot.

A GSH hiány szintén súlyos következménye a peroxinitrit toxicitásnak. A GSH kis molekula, gyorsan szintetizálódik, millimol koncentrációban van jelen intracellulárisan. Az egyik leghatékonyabb antioxidáns. Fontos szerepet tölt be a fehérjék –SH csoportjainak védelmében. Ezek a csoportok fontos szerepet játszanak a fehérjék szerkezeti felépítésében, illetve gyakran az enzimek aktív centrumában helyezkednek el. Így károsodásuk a fehérjék strukturális stabilitását és aktivitását is befolyásolja, védelmük tehát különös jelentőséggel bír.

A GSH alacsony szintjének a hatása azonban ennél jóval összetettebb. A tripeptid a gyökfogó funkcion túl fontos szerepet tölt be a biotranszformációban. A glutation-transzferázok úgy érik el a detoxifikáló hatásukat, hogy a xenobiotikumokat és endobiotikumokat GSH-al konjugálják [74].

A harmadik aspektusa a peroxinitrit hatásnak a DNS károsodása. Az oxidatív DNS károsodások az indirekt DNS károsodások közé sorolhatók, a  $\gamma$ -sugárzással ellentétben, ami nem scavangelhető (direkt) hatást eredményez [75]. Számos oxidatív termék keletkezhet, amelyek a DNS-molekula fragmentálódásához, bázisvesztéshez, száltöréshez vezethetnek. A DNS-ben kialakuló mutációknak számos következménye lehet, akár a sejt pusztulása is. IUGR köldökvérben a DNS károsodás kis mértékben ugyan, de erőteljesebb, mint a kontrollcsoportban. Oxidáló ágens hatására azonban mindkét csoport hasonlóan

reagált, ami a repair mechanizmusok intaktságára utal. Így az IUGR csoportban tapasztalt nagyobb mértékű károsodás a megnövekedett oxidatív és nitrozatív stressz következménye, és az ép repair rendszernek köszönhető, hogy a károsodás nem szignifikáns.

Régóta ismert tény, hogy a legelterjedtebb betegségek patomechanizmusában részben az oxigényökök is szerepet játszhatnak. A születés a magzat számára gyakorlatilag már önmagában oxidatív stresszként fogható fel. A hipoxiás intrauterin élet után hirtelen hiperoxiás körülmények közé kerül. Fontos tehát az antioxidáns enzimek érésének nyomon követése, illetve az érés befolyásolása a különböző patológias tünetcsoportok kialakulásának megelőzésére. IUGR esetben tapasztalt igen csak jelentős oxidatív stressz valószínűleg a hiányos antioxidáns védelem és a nagy mértékű NO produkció következménye. Ha tehát felmerül a gyanúja, hogy a magzat méhen belüli fejlődése nem megfelelő különösen indokolt odafigyelni az antioxidáns státusz támogatására. Természetesen egy lehetséges terápia előtt állapotfelmérés szükséges és ennek birtokában kell a terápiás tervet elkészíteni. Nem szabad ugyanis elfelejteni, hogy a nemkívánatos szabadgyök-reakciók ellen egy összetett, természetes antioxidáns rendszer alakult ki, mely hatékony védelmet jelent, illetve, hogy bizonyos antioxidáns tulajdonságú vegyületek nagy koncentrációban prooxidánsként viselkednek, akár a természetes antioxidánsok közül is. A természetes antioxidánsok közé tartoznak például az A-, C-, E-, K-vitamin, tioltartalmú vegyületek (cisztein, ciszteamin, glutation, metionin), nyomelemek (szelén), ubikinon, galluszsav valamint az extracelluláris térben a cöroloplazmin, a transzferrin, a piruvát, a húgysav és a glükóz. Az antioxidáns vegyületek száma igen nagy és hatásmechanizmusukban számos nyitott kérdés van még. Jónéhány gyökfogó működése egyáltalán nem ismert. Számos, már régóta használt gyógyszerről is kiderült, hogy hatásmechanizmusában fontos szerepet játszik a gyökfogás. A megfelelő állapotfelmérés a túladagolás és a nemkívánatos gyógyszer-kölcsönhatások megelőzése miatt elengedhetetlen. A szakirodalomból szeretnék megemlíteni egy lengyel munkacsoportot, akik jelentős mennyiségű publikációban számolnak be az IUGR és az oxidatív stressz összefüggéséről [76-81] Az ő megközelítésük sokkal inkább klinikai, és habár lényegesen kevesebb oxidatív stressz paramétert vizsgáltak, eredményeik több ponton, megerősítik illetve kiegészítik a mi eredményeinket. Különösen bízgatónak tartjuk, hogy az említett csoport kísérleti antioxidáns terápiát alkalmazva (kokarboxiláz, aszkorbinsav és szolkoszeril) kedvező hatást tapasztalt az általuk vizsgált oxidatív stressz paraméterekre (MDA-szint, konjugált-diének, Schiff-bázisok) [ld.76].

A végső konklúziónk, hogy IUGR magzatoknál a túlzott ecNOS expresszió egy kompenzációs mechanizmus a magzati-anyai vaszkulátúrában uralkodó magas rezisztenciára, így ez által a vérkeringést hivatott serkenteni. A magas NO szint azonban alacsony antioxidáns védelemmel párosul, így ezeknél a magzatoknál a vérkeringést serkentő mechanizmus egy extra oxidatív stresszt eredményez. Mivel a vazodilatációra, a keringés serkentésére, vagyis a magas NO koncentrációra ezeknek a magzatoknak feltétlenül szüksége van, a terápiás lehetőséget az antioxidáns védelem megerősítésében látjuk. Amit várhatunk egy ilyen terápiától, hogy egyrészt mérsékelhetné az oxidatív stressz okozta szöveti károsodás mértékét, másrészt a gyökök scavangelésével lehetővé tenné a NO-nak, hogy kifejtse kedvező értágító hatását, ahelyett, hogy peroxinittré alakulva stresszorként viselkedjen.

## 6. LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK

1. A császármetszés nem előnyösebb szülési mód az oxidatív stressz szempontjából, viszont az epidurális érzéstelenítésnek kedvező a hatása az oxidatív károsodások kivédése szempontjából.
2. Az oxidatív stressz markereinek széles skáláját vizsgálva megállapítottuk, hogy az IUGR újszülöttek antioxidáns státusza jelentős fejletlenséget mutat.
3. Elsőként vizsgáltuk a teljes GSH redox ciklust IUGR újszülötteknél: a GSH depléción az alacsony szintetizációs ráta, nagy mennyiségű szabadgyök és a GSH regeneráló enzimek csökkent aktivitásának következménye.
4. Különböző, egymást megerősítő tesztek segítségével megállapítottuk, hogy az eritrocita membránok károsodása jelentős IUGR újszülötteknél, ami csökkent deformabilitást, vagyis szállító funkcióbeli zavart okoz.
5. Jelentős az eltérés az eNOS expresszióban, IUGR újszülötteknél egy adaptációs mechanizmus alakult ki a magas perifériás rezisztencia kompenzálására.
6. Az oxidatív és nitrózatív stressz egymást kölcsönösen gerjesztve járul hozzá a magzati vérkeringés rendellenességéhez IUGR újszülöttekben.
7. Vizsgálataink rávilágítottak az antioxidáns terápia jelentőségére a korai stádiumban felismert méhen belüli retardáció esetében.

## 7. ÖSSZEFOGLALÓ

Az élő szervezetek folyamatos kölcsönhatásban vannak az oxigénnel, aminek eredményeképpen reaktív molekulák, ún. szabad gyökök képződnek. Az oxigén gyökök forrása a molekuláris oxigén párosítatlan elektronja, ami destabilizálja a molekulát, és elektromos töltéssel látja el. A szabad gyökök többsége oxigén központú, ezért elterjedt még a reaktív oxigén intermedierek kifejezés is, ami a szűkebb értelemben vett gyökökön túl a nem gyök természetű reaktív molekulákat is magába foglalja (pl. hidrogén-peroxid). Az antioxidáns védelem feladata, hogy védje a szervezetet a szabad gyököktől. Akkor beszélünk oxidatív stresszről, ha az egyensúly a pro- és antioxidánsok között felborul, a reaktív molekulák javára. Normál körülmények között ez a védelem megtisztítja a sejtet a reaktív oxigén származékoktól. Antioxidánsok hiányában a gyökök megtámadják, és károsítják a lipideket, fehérjéket és a nukleinsavat. A lipidperoxidok és a karbonil-proteinek tipikus termékei az oxidatív környezetnek, de a DNS is gyakran károsodik. A DNS oxidatív károsodásáért a hidroxil gyök a felelős, amely megtámadja a nukleinsavat és száltörést generálhat. Ahogyan a száltörések elleni védelem nélkülözhetetlen a mutációk megelőzésében, csekély mennyiségű stressz fiziológiásan is szükséges a szignál-transzdukcióhoz, és az antioxidánsok expressziójának stimulálásához.

Az oxidatív stressz egy természetes velejárója a születésnek, hiszen a magzat a méhen belüli hipoxiás élet után hirtelen magas oxigén koncentrációval szembesül. Ennek ellenére számos újszülöttkori rendellenesség összefüggésbe hozható az oxidatív stresszrel. Maga a születés módja is hatással lehet az újszülött egészségi állapotára.

Az utóbbi években világszerte növekvő tendenciát mutat a császármetszések (Caesarean section, CS) aránya a spontán hüvelyi szüléshez (VSZ) képest, habár a kérdés, hogy melyik módszer a megfelelőbb, igencsak vitatott. A CS egy sebészeti beavatkozás, amely potenciálisan veszélyeztetheti az anyát és a magzatot is. A szülészek, nőgyógyászok véleménye a témában egymásnak ellentmondó, akárcsak a szakirodalmi eredmények. Mi a problémát az oxidatív stressz szempontjából közelítettük meg. Antioxidáns paraméterek széles skáláját tanulmányoztuk az újszülöttek köldökvérében, hogy minél átfogóbb képet kaphassunk a szülés módja és az oxidatív stressz kapcsolatáról. Munkánk során vizsgáltuk a VSZ és a CS hatását az antioxidáns státuszra (redukált glutation, össz antioxidáns kapacitás), az antioxidatív enzimek aktivitására (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-

peroxidáz) és a biomolekulák károsodására (lipid peroxidáció, karbonil-proteinek, DNS károsodás).

A mérési eredmények értékelése során nem találtunk szignifikáns különbséget az elektív CS és a VSZ csoportok között, viszont a sürgősségi CS csoportban erőteljes oxidatív stressz kimutatható, ahogyan ez várható is volt. Azt a következtetést vontuk le, hogy a születés módja nincs komoly hatással a szabad gyökökkel összefüggésbe hozható károsodások terén, kivéve persze akut vészhelyzetben. Így az elektív CS nem kedvezőbb az oxidatív stressz szempontjából a VSZ-nél.

Az intaruterin növekedési retardáció (IUGR) egy magzati felődési rendellenesség. Egy IUGR-s magzat vagy újszülött súlya minimum 10%-al kevesebb, mint az adott gesztációs időben normálisnak tekinthető lenne. Előfordulása 5-6%-os (!). A rendellenességben szenvedőknél nagyobb a morbiditási és mortalitási arány. Nagyon jellemző paraméter az IUGR magzatok köldökzsinórjának deformálódása. Az IUGR kialakulásának mechanizmusa máig nem tisztázott, habár nagy valószínűséggel a föto-placentáris keringés zavarával áll szoros összefüggésben. Az oxidatív stressz szerepének megértése fontos lehet akár más, korán diagnosztizálható magzati betegségekben az esetleges terápiás megelőzés szempontjából. Ennek megfelelően vizsgálatokat folytattunk köldökzsinór véren és artérián, hogy megállapíthassuk, van-e szignifikáns oxidatív stressz az IUGR babák placentáris keringésében.

Az oxidatív károsodás minden vizsgált paramétere (lipid peroxidáció, eritrocita deformabilitás, karbonil-protein szint, DNS károsodás és repair) szignifikánsan kedvezőtlenebb értéket mutatott az IUGR mintákban. Mindemellett az antioxidáns enzimek aktivitása (szuperoxid-dizmutáz, kataláz), az össz antioxidáns kapacitás, és a redukált glutation szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az IUGR csoportban. A glutation esetében a depléción annyira jelentős volt, hogy további méréseket végeztünk. A teljes redox ciklus vizsgálatából kiderült, hogy már a glutation szintézis mértéke is elmarad a kontroll csoporttól, és a glutation regeneráló enzimek aktivitása is alacsony. Összességében az eredmények azt sugallják, hogy az IUGR újszülöttek antioxidáns védelme a koraszülöttekhez hasonlóan fejletlen.

A nitrogén-monoxidnak (NO) és a NO-szintázoknak (NOS) fontos szerep jut fiziológiás körülmények között a föto-placentáris keringés szabályozásában, ám expressziójuk patológiás körülmények esetén még tisztázatlan. A NO-nak számos funkciója ismert *in vivo*. Egy alapvető szignálmolekula a guanilát cikláz általi cGMP-produkció révén, fontos regulátora a keringésnek, trombózisnak, idegi aktivitásnak, de

szerepe van a nem specifikus immunválaszban, a szív (coronaria) keringésének és oxigénellátásának szabályozásában. Mindemellett szabad gyöknek tekintjük, és citotoxicitásának legfőbb mediátora a peroxinitrit nevű származéka, ami a NO és a szuperoxid anion reakciójából keletkezik. A peroxinitrit direkt oxidatív reakciók, vagy indirekt gyök-mediált úton károsítja a lipideket, -SH csoportokat és a DNS-t. *In vivo* a magas koncentrációban jelen lévő szuperoxid-dizmutáz gyorsan eliminálja a szuperoxid aniont, így a peroxinitrit szintje fiziológias körülmények között erős kontroll alatt áll, és az oxidatív károsodás minimális az endogén antioxidáns védelemnek köszönhetően.

A peroxinitrit toxicitásának egyik fontos mechanizmusa tehát, hogy lipid peroxidációt iniciál a membránban, és ezzel megváltoztatja a permeabilitást és a fluiditást, ami súlyos következményekkel járhat, eritrociták esetében romlik a deformációs képesség, vagyis a szállító funkció. A másik fontos aspektus pedig az -SH csoportok oxidációja, aminek legfőbb következménye a GSH szint erőteljes csökkenése.

Egy olyan rendellenesség esetében, ami legnagyobb valószínűséggel a föto-placentáris keringés zavara miatt alakul ki, az NO szerepének felderítése erősen indokolt. Célunk az volt, hogy tisztázzuk az NO és a nitrózatív stressz szerepét az IUGR patomechanizmusában, ezért meghatároztuk a köldökvér nitrit és peroxinitrit tartalmát, valamint a köldök artériában az endotheliális NO szintáz (ecNOS) expresszióját. Mivel a peroxinitrit citotoxicitásának legfőbb aspektusai a lipid peroxidáció és a GSH depléción, így ezeket a paramétereket is meghatároztuk. Megmértük továbbá a szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitását is ezekben a mintákban, hogy következtetni tudjunk a szuperoxid anion szintjére.

Az ecNOS expresszió több, mint kétszerese volt az IUGR mintáknak a kontrollhoz képest, míg a nitrit és peroxinitrit szint szignifikánsan magasabb és a szuperoxid anion aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a köldökvérben. Vagyis a magas ecNOS expresszió az IUGR újszülöttekben szignifikáns oxidatív stresszel társul, ahogy ez korábbi eredményeink alapján várható volt.

Az eredményeink erősítik azt a hipotézist, mely szerint magas NO produkció egy kompenzációs válasz az umbilikális keringés serkentésére. Így a magas ecNOS expresszió a föto-placentáris vaszkulaturában egy adaptációs mechanizmus eredménye, amely a patológiás terhességeknél előforduló jelentős perifériás ellenállás kompenzálására hivatott létrejönni. IUGR esetén ez a mechanizmus oxidatív stressz következtében magas szuperoxid anion szinttel társul, és komoly nitrózatív stresszt eredményez. Az NO hatása tehát kettős.

## 8. SUMMARY

The living organism constantly reacts with oxygen. As a consequence of this activity, highly reactive molecules, the free radicals are produced. The source of oxygen radicals is the unpaired electron of molecular oxygen, which makes it unstable and electrically charged. Free radicals are usually oxygen centered, hence the term reactive oxygen species is also commonly used, which contains non-radical, but very reactive oxygen species (e.g. hydrogen-peroxide). The antioxidant system defends against free radicals. Oxidative stress arises when the balance between oxidants and antioxidants is disturbed. Under normal conditions, reactive oxygen species are cleared from the cell by the action of antioxidant molecules and enzymes. In the lack of antioxidant molecules and enzymes, free radicals target lipids, proteins and DNA. Lipid peroxides and carbonyl proteins are typical products of an oxidative milieu, but DNA is also the target of free radical attack. Oxidative damage to DNA is a result of interaction of the nucleic acid with hydroxyl radical that generates strand breaks on the DNA. Protection of the DNA against high levels of oxidants is fundamental to avoid strand breaks and mutations, but physiological oxidative stress is indispensable in stimulating the expressions of the various antioxidant enzymes.

Although oxidative stress is a physiological event in the foetal-to-neonatal transition many neonatal diseases are correlated with oxidative stress. The mode of delivery may have a considerable effect on the state and health of the newborn.

In recent years, the proportion of deliveries carried out using Caesarean section (CS) has risen substantially around the world and this steadily increasing global rate of CS has become one of the most debated topics in maternity care. CS is a surgical intervention with potential hazards for both mother and child. The opinions of obstetrician-gynaecologists regarding normal spontaneous vaginal delivery (VD) and CS are highly contradictory. The results of previous studies display great differences. We have approached this question from a consideration of oxidative stress and set out to determine a wide range of parameters relating to the oxidative status of neonates born via VD or undergoing CS. In our study we investigated the effects of VD and of elective CS on antioxidant status (the level of glutathione and ferric reducing ability of the plasma), the activities of antioxidative enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione



peroxidase) and the amount of lipid peroxidation, protein and DNA damage in the umbilical cord blood.

We found no significant differences between VD and elective CS group, but the emergency CS group demonstrated significant oxidative stress, as expected. We concluded that the mode of delivery does not have a serious effect on the level of free radical damage if there is no emergency situation. The elective CS does not have an advantage over VD with respect to oxidative stress

Intrauterine growth retardation (IUGR) is a complication of pregnancy. A newborn with IUGR weighs less than do 90% of all other newborns of the same gestational age. The reported incidence of IUGR ranges between 7 and 10 per cent. This abnormality is associated with increased level of morbidity and mortality. A typical feature of IUGR foetuses is the deformation of the umbilical cord. The mechanism of development of IUGR has still not been appropriately described, although it is most probably a consequence of an abnormal foeto-maternal blood circulation. Understanding the role of oxidative stress at the pathophysiology of such neonatal diseases is important for designing appropriate prevention strategies and new therapeutic approaches. Accordingly we have carried out examinations on umbilical cord blood and endothelium in order to establish how the antioxidant status of full-term IUGR infants changes and whether the results indicate significant oxidative stress. We compared the antioxidant status of healthy mature and IUGR neonates.

All the parameters of oxidative damage (lipid peroxidation, erythrocyte filtration rate, carbonyl-protein, DNA damage and repair) were significantly elevated, while the antioxidant enzyme activities (superoxide dismutase, catalase), the total antioxidant capacity and the level of glutathione were significantly lower in the cord blood of IUGR neonates. Further examination of the total redox cycle of the glutathione revealed a significantly lower rate of glutathione synthesis, and depletion in the activities of the enzymes responsible for the regeneration of reduced glutathione.

On the whole, the results of this analysis suggest that the antioxidant defence of neonates with IUGR is similarly immature as it is in premature infants.

Nitric oxide (NO) and NO synthases seem to play an important role in the physiology of the foeto-maternal blood circulation, although their expression in pathological conditions is unclear. NO has diverse functions *in vivo*. It is a fundamental signalling device via the production of cGMP by guanylate cyclase. The production of NO

is also important for non-specific immune response. NO modulates the blood flow, thrombosis, and neural activity and serves many important physiological roles in the regulation of cardiac function including coronary vasodilatation, inhibiting platelet and neutrophil adhesion and activation, modulation of cardiac contractile function, and inhibiting cardiac oxygen consumption. NO is also a free radical and most of its cytotoxicity is due to peroxynitrite. It is produced in a diffusion-controlled reaction between NO and the free radical, the superoxide anion. Peroxynitrite interacts with lipids, DNA, and proteins via direct oxidative reactions or indirect, radical-mediated mechanisms. *In vivo* superoxide is rapidly removed by high concentrations of superoxide dismutases, so the level of peroxynitrite under physiological condition is controlled and oxidative damage minimized by endogenous antioxidant defences. The strict control is needed since peroxynitrite is a strong oxidant which can react directly with electron-rich groups, such as sulfhydryls, causing depletion in the glutathione (GSH) pool.

One important mechanism of peroxynitrite-dependent cytotoxicity relies on its ability to trigger lipid peroxidation (LP) in membranes, causing membrane permeability and fluidity changes with significant biological consequences (e.g.: erythrocyte deformability decreases). The other major aspects of peroxynitrite-dependent toxicity are the rapid oxidation of the effective endogenous free radical scavenger GSH.

In an abnormality like intrauterine growth retardation (IUGR) which is most probably a consequence of a disorder of the foeto-maternal blood circulation clarifying the role of NO is reasonable. Our aim was to clear up the role of NO and nitrosative stress in the pathophysiology of IUGR. We determined the nitrite and peroxynitrite level of umbilical cord blood and the expression of endothelial NO synthase (ecNOS) from the umbilical artery. Because one of the major consequences of peroxynitrite toxicity is lipid peroxidation and glutathione depletion, these parameters were also measured. In addition the activity of SOD was assayed to evaluate the level of superoxide anions.

We detected that ecNOS expression in IUGR neonates was at least 2-fold higher than in the control samples. The level of peroxynitrite and nitrite was significantly higher, and the activity of superoxide dismutase was significantly lower in the IUGR cord blood. Consequently the elevated expression of ecNOS is coupled with significant oxidative stress, as expected on the grounds of the previous results.

Our results support the hypothesis that increased NO production may be a compensatory mechanism to improve blood flow in the umbilical cord. Increased ecNOS expression in the foetal-placental vasculature may be an adaptive response to the increased

resistance in pathological pregnancies. In IUGR pregnancies it is coupled to the high level of superoxide anion, resulting in severe nitrosative stress. Hence the NO has double-effect.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Halliwell, B Gutteridge JM: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14, 1984.
2. Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 91:14-30, 1991.
3. Fridovich I: Superoxide dismutases. An adaptation to paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761-64, 1989.
4. Kowalski J, Błaszczak J, Petecka E, Irzmański R, Kowalczyk E, Kowalska E, Cegliński T, Pawlicki L: Neutrophils superoxide anion generation during carvedilol therapy in patients with stable angina. *Int J Cardiol* 102(3):397-402, 2005.
5. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM: Increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus. *Circulation* 105:1656-1662, 2002.
6. Sumimoto H: Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275(13):3249-3277, 2008.
7. Di Mascio P, Devasagayam TP, Kaiser S, Sies H: Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem Soc Trans* 18(6): 1054-6, 1990.
8. Stocks J Dormandy TL: The Autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide *Brit J Haemat* 20(1):95-111, 1972.
9. Halliwell B, Gutteridge JM: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307(1):108-112, 1992.
10. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR: Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35(1):35-54, 1998.
11. Gutteridge JM, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15(4):129-135, 1990.
12. Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272(33):20313-20316, 1997.
13. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J: Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB* 17:1195-1214, 2003.

14. Buettner GR: The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, 300(2):535-543, 1993.
15. A Meister, Anderson ME: Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52: 711-760, 1983.
16. Mills GC: Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin. *J Biol Chem* 229:189-197, 1957.
17. Gamble SC, Wiseman A, Goldfarb PS: Selenium-dependent glutathione peroxidase and other selenoproteins: their synthesis and biochemical roles. *J Chem Tech Biotech* 68(2):123-134, 1999.
18. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA: Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482(1-2):21-26, 2001.
19. Pai EF, Schulz GE: The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J Biol Chem* 258 (3):1752-1757, 1983.
20. Carlberg I, Mannervik B: Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-490, 1985.
21. Kletzien RF, Harris, PK, Foellmi: Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB* 8:174-181, 1994.
22. McCord JM, Fridovich I: Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244 (22) 6049-6055, 1969.
23. Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N: Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the *in vitro* glycosylated sites *J Biol Chem*. 262(35):16969-16972, 1987.
24. Kono Y, Fridovich I: Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257 (10):5751-5754, 1982.
25. Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS: Modulation of catalase peroxidatic and catalytic activity by nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 30(7):709-714, 2001
26. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424, 2007.
27. Fleming I, Bauersachs J, Busse R: Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res* 34(3):165-174, 1997.
28. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271:1424-1437, 1996.

29. Seeds JW: Impaired fetal growth definition and clinical diagnosis. *Obstet Gynecol* 63:303-310, 1984.
30. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ Ohlsson A, Golan A: Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 182:198-206, 2000.
31. Wagner M: Choosing caesarean section. *Lancet*, 356: 1677-1680, 2000.
32. Baynes JW, Thorpe SR: Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48(1):1-9, 1997.
33. Coyle JZ, Puttfarcken P: Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262 (5134):89-695, 1993.
34. Markesbery WR: Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med* 23(1):134-147, 1997.
35. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM: Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Rad Biol Med* 45(8):1047-1055, 2008.
36. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* 160(1)1-40, 2006.
37. Brown NS, Bicknell R: Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effect on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3:323-327, 2001.
38. Saugstad OD: Bronchopulmonary dysplasia and oxidative stress: are we closer to an understanding of the pathogenesis of BPD? *Acta Paediat* 86(12):1277-1282, 1997.
39. Saugstad OD: Bronchopulmonary dysplasia—oxidative stress and antioxidants. *Sem Neonat* 8(1):39-49, 2003.
40. Buonocore G, Perrone S, Bracci R: Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate* 79 (3-4):180-186, 2001.
41. Georgson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A and Laszlo A: Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born *via* caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*: 103(2):136-139, 2002.
42. Gezer A, Şimşek YÖ and Gani H: Elective cesarean section for preterm intrauterine growth retarded fetuses. *Int J Gynecol Obstet*: 88: 138-139, 2005.

43. Fogel I, Pinchuk I, Kupferminc MJ, Lichtenberg D, Fainaru O: Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on the mode of delivery. *Am J Obst Gyn*: 193:241-246, 2005.
44. Lowry OH, Rosebrough EA, Farr AL: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
45. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205, 1968.
46. Tietze F: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27, 502-522, 1969.
47. Raftos JE, Dwarte TM, Luty A, Willcock CJ: Direct measurement of the rate of glutathione synthesis in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene treated human erythrocytes. *Redox Rep* 11(1): 9-14, 2006.
48. Levine RL, Garland D, Oliver CN: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478, 1996.
49. Placer ZA, Cushman L, Johnson SC: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 16:359-364, 1966.
50. Novák Z., Kovács L., Pál A., Pataki L., Varga Sz. I., Matkovics B: Comparative study of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cord maternal red blood cells. *Acta Paediatrica Hungarica* 1990. 30(3-4) 391-397, 1990.
51. Misra HP, Fridovich I: A role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175, 1972.
52. Matkovics B, László A, Szabó L: A comparative study of superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in red blood cells from muscular dystrophy patients and normal controls. *Clin Chim Acta* 118 (2-3): 289-292, 1982.
53. Beers, RF Jr, Sizer IW: Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133-140, 1952.
54. Chiu DT, Stults FH, Tappel AL: Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 445(3): 558-566, 1976.
55. Pinto RE, Bartley W: The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J* 112:109-115, 1969.

56. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grassl M: Methods of Enzymatic analysis. Verl. Chemie, 1984.
57. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB: Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 246:7130-7139, 1974.
58. Benzie FF, Strain JJ: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of „Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *J Anal.Biol Chem* 239:70-76, 1996.
59. Green LC: Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138, 1982.
60. Grisham MB: Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 268:237-246, 1996.
61. Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y: Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acid Res* 22: 1774-1775, 1994.
62. Birnboim HC, Jevcak JJ: Fluorimetric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res* 41(5): 1889-1892, 1981.
63. Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S: Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 20:4-14, 2004.
64. Wiktor H, Kankofer M, Zrubek H, Kotarski J: Glutathione peroxidase activity in normal and preeclamptic placentas. *Ginekol Pol* 71(8):799-803, 2000.
65. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73: 334-339, 1989.
66. Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu Ö, Durak I: Role of Oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest* 64:187–192, 2007.
67. Hoenicka M, Schmid C: Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6(4):287-301, 2008.
68. Lyall F, Greer IA, Young A, Myatt L: Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in intrauterine growth restriction. *Placenta* 17(2-3): 165-168, 1996.
69. Nasiell J, Nisell H, Blanck A, Lunell NO, Faxén M: Placental expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in pregnancy complicated by preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77(5):492-492, 1998.



70. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481–487, 1991.
71. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite-mediated sulfhydryl oxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266: 4244–4250, 1991.
72. Szabó Cs, Ohshima H: DNA Damage Induced by Peroxynitrite: Subsequent Biological Effects. *Nitric Oxide* 1(5):373-385, 1997.
73. Marnett LJ: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21(3): 361-370, 2000.
74. Dourado DF, Fernandes PA, Mannervik B, Ramos MJ: Glutathione transferase: New model for glutathione activation. *Chemistry* 14(31):9591-9598, 2008.
75. Margolin Y, Shafirovich V, Geacintov NE, Demott MS, Dedon PC: DNA sequence context as a determinant of the quantity and chemistry of guanine oxidation produced by hydroxyl radicals and one-electron oxidants. *J Biol Chem* 283(51):35569-35578, 2008.
76. Karowicz-Bilinska A, Suzin J, Sieroszewski P: Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with Intrauterine Growth Retardation. *Med Sci Monit* 8(3):211-216, 2002.
77. Karowicz-Bilinska A, Kowalska-Koprek U, Suzin J, Sieroszewski P: Total antioxidative activity measured by ABTS method in pregnant women treated with L-arginine for IUGR. *Ginekol Pol* 74(10): 1130-1136, 2003.
78. Karowicz-Bilinska A, Kowalska-Koprek U, Suzin J, Sieroszewski P: Total antioxidative activity measured by ABTS method in pregnant women treated with L-arginine for IUGR. *Ginekol Pol* 74(10): 1130-1136, 2003.
79. Karowicz-Bilinska A: Leptin concentration in women with normal pregnancy and intrauterine growth retardation. *Ginekol Pol* 75(1): 10-4, 2004.
80. Karowicz-Bilinska A, Marszalek M, Kowalska-Koprek U, Suzin J, Sieroszewski P: Plasma carbonyl group concentration in pregnant women with IUGR treated by L-arginin and acetylsalicyc acid. *Ginekol Pol* 75(1): 15-20, 2004.
81. Karowicz-Bilinska A: Lipid peroxides concentrations in women with Intrauterin Growth Restriction. *Ginekol Pol* 75(1): 6-9, 2004.

### **Az értekezés témájában megjelent saját közlemények**

**Hracsko Z**, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS: Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. *In Vivo* 21(4):703-6, 2007.

**IF: 1,143**

**Hracsko Z**, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS: Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. *Redox Rep* 13(1):11-6, 2008.

**IF: 1,6**

### **Egyéb saját közlemény**

Rakonczay Z, Jr, Hegyi P, Dósa S, Ivanyi B, Jarmay K, Biczó G, **Hracsko Z**, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya A, Pandol SJ, Takács T: A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med* 36(7):2117-27, 2008.

**IF: 6,283**

### **Folyóiratban megjelent idézhető konferencia abstractok a dolgozat témájában:**

**Hracsko Z**, Orvos H, Novak Z, Varga IS: Free radical damage to red blood cells does not depend on the mode of delivery. XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Davos, Switzerland, *Free Rad Res* 40: S153-S153, 2006.

Varga IS, **Hracsko Z**, Orvos H, Novak Z: Changes of the glutathione redox cycle during the process of birth. XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Davos, Switzerland, *Free Rad Res* 40:S155-S155, 2006.

**Hracsko Z**, Orvos H, Novak Z, Varga IS: Role of oxidative stress and red blood cell deformability in intrauterine growth retardation. *Europadiiatrics*, Barcelona, Spain, 2006.

**Hracsko Z**, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Varga IS: Intrauterine growth disorder is associated with free radical damage to proteins and DNA. 48th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research, Prague, Czech Republic, Acta Paeditrica 96: 26-27, 2007.

**Egyéb, folyóiratban megjelent idézhető konferencia abstractok:**

Monostori P, Hracsko Z, Karg E, Varga IS, Haszon I, Papp F, Sumegi V, Berecki CS, Turi S: Effects of a short-term suspension of erythropoietin therapy on oxidative stress during a 12-week follow-up in chronic haemodialysis patients. Ped Nephrol 22(9):1459-1459, 2007.

Rakonczay Z, Hegyi P, Biczó G, Dósa S, Ivanyi B, Jarmay K, Biczó G, **Hracsko Z**, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya A, Pandol SJ Takács T: L-ornithine induces acute necrotizing pancreatitis in rats. Pancreas 37:491-491, 2008.

Turi S, Monostori P, **Hracsko Z**, Boros T, Kiss E, Karg E, Varga IS, Haszon I, Sümegi V, Berecki C: Alteration of oxidative stress during the erythropoietin therapy and its transient withholding in hemodialysed patients. Ped Nephrol 23(9):1647-1647, 2008.

Turi S, Monostori P, Barath A, Fazekas I, Hodi E, Mate A, **Hracsko Z**, Karg E, Varga IS, Sumegi V, Gellen B, Berecki C: Examination of microvascular function in lean and overweight hypertensive adolescents. 23(9): 1659-1658, 2008.

**Abstract kötetben megjelent összefoglalók**

**Hracskó Zs**: Oxidatív lipid, illetve fehérje károsodás és antioxidáns státusz IUGR újszülöttekben MSZKT III. Konferenciája, Debrecen, 2005.

**Hracskó Zs**, Orvos H, Novak Z, Varga IS: A vörösvértest deformabilitás változása és az oxidatív stressz szerepe az IUGR kialakulásában Pro Medicina Nemzeti Egészségügyi Programok Kongresszus Budapest, 2007.

## 10. RÖVIDÍTÉSEK

BU:	Bergmeyer-egység
CDNB:	1 -klór-2,4-dinitrobenzol
CS:	császármetszés (Caesarean section, C-section)
DTNB:	5,5-ditio-bis-nitrobenzoesav
EDA:	epidurális érzéstelenítés
FRAP:	ferric reducing ability of plasma
GSH:	redukált glutation
GSSG:	oxidált glutation
GP:	glutation-peroxidáz
GR:	glutation-reduktáz
GST:	glutation-S-transzferáz
G6PD:	glukóz-6-foszfát dehidrogenáz
ecNOS:	endotheliális nitrogén-monoxid szintáz
EU:	enzimegység
IUGR:	méhen belüli retardáció (intrauterine growth retardation)
KAT:	kataláz
LP:	lipidperoxidáció
MDA:	malondialdehid
NO:	nitrogén-monoxid
ROS:	reaktív oxigén származékok (reactive oxygene species)
SOD:	szuperoxid-dizmutáz
TCA:	triklórecetsav
TBA:	tiobarbitursav
VSZ:	spontán vaginális szülés

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom mindenekelőtt *Dr. Szöllősiné Dr. Varga Ilona* egyetemi docensnek, témavezetőmnek, aki mindig támogatott tudományos munkámban. Ezen felül tanárom, tanácsadóm, bátorítóm volt az elmúlt évek során, segítségére bármikor számíthattam.

Köszönetet mondok a SZTE TTK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék vezetőjének *Dr. Boros Imre* egyetemi tanárnak, és a tanszék munkatársainak, hogy lehetőséget biztosítottak a kutatómunka elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom a tanszék jelenlegi és korábbi tagjainak, akik kellemessé tették a dolgos hétköznapiakat.

Köszönöm az asszisztensek, *Csonka Miklósné* és *Balogh Katalin* segítőkészségét, gyakorlati tanácsát és a gördülékeny labormunka háttérének biztosítását.

Köszönöm *Dr. Novák Zoltán* egyetemi docensnek, és *Dr. Orvos Hajnalka* egyetemi docensnek, hogy a minták összegyűjtésében, a kísérleti koncepció megtervezésében segítségemre voltak.

Köszönet illeti az SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának dolgozóit, akik klinikai feladataik mellett mindig kézséggel szakítottak időt a kutatásommal kapcsolatos teendőkre. Külön köszönet *Dr. habil Pál Attila* tanszékvezető egyetemi tanárnak, a SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy mintákhoz juthassak kutatásaimhoz.

Köszönöm a SZTE Biológia Doktori Iskolának, hogy a doktori képzésében részt vehettem.

Hálával tartozom *Férjemnek*, aki mindig támogatott, és türelemmel viseltetett irántam, amikor tudományos munkám során nem tölthettem vele annyi időt, amennyit szerettem volna. Végül köszönöm *Anyunak* a végtelen türelmet és szeretetet.