

Prosztagliklin és tromboxán meghatározás humán plazmában,
valamint szerepük az érlelmeszesedés korai felismerésében

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette: PETŐ JUDIT
vegyész

Készült: A Bács-Kiskun Megyei Önkormányzat Kórháza
Patológiai Osztályának Kutató Laboratóriumában Kecskeméten
és az
MTA Izotóp Intézetében Budapestén

KECSKEMÉT

1993.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
1.1. Rövidítések jegyzéke	2
1.2. A proszttaglandinok szerkezete és nevezéktana	4
1.3. Arachidonsav metabolizmus. A PG-ok bioszintézise	6
1.4. A prosztanoidok lebomlása	10
1.5. A prosztanoidok biológiai hatásai	12
1.6. A prosztaciklin és a tromboxán A ₂ szerepe a szív- és érrendszerben	14
1.7. PG-mérések	19
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	25
2.1. A vérminták gyűjtése	25
2.2. Vérvétel	26
2.3. Anyagok	27
2.4. ¹²⁵ I-6-Keto-proszttaglandin F _{1a} RIA kit	27
2.5. ¹²⁵ I Tromboxán B ₂ RIA kit	29
2.6. Eszközök és műszerek	30
2.7. Módszerek	31
2.7.1. A plazma PG-mentesítése	31
2.7.2. Kontroll plazmák készítése	31
2.7.3. Közvetlen/Direkt RIA mérés	31
2.7.4. Oldószeres extrakció etilacetáttal	32
2.7.5. Extrakció dietiléterrel	32
2.7.6. Szilárfázisú extrakció C18 oszlopon	33
2.7.7. Módszerek a szilárfázisú extrakció és a RIA minőségellenőrzésére	34
2.8. Statisztikai paraméterek	36
3. EREDMÉNYEK	39
3.1. Közvetlen/direkt RIA	39
3.2. Extrakció etilacetáttal	41
3.3. Plazma extrakció dietiléterrel	42
3.4. Szilárfázisú (C18) extrakció	44
3.5. A PG-mentesítés minőségellenőrzése	48
3.6. A Samplex C18 oszlop kapacitásának ellenőrzése	49
3.7. A Samplex extrakciós módszerrel kombinált RIA meghatározás minőségellenőrzésének eredményei	50
3.7.1. Extrakciós veszteségek	50

3.7.2. Az extrakció hatásfoka és méréssorozatok közötti, külső variáció (interassay variation)	51
3.7.3. Méréssorozaton belüli szórás (intraassay variation)	53
3.7.4. A "vak" kérdése (procedure blank)	54
3.8.5. Pontosság (reprodukálhatóság, precision), méréstartomány, érzékenység	54
3.7.6. Megbízhatósági vizsgálat (accuracy)	56
3.8. Az extrakciós módszer alkalmazása, humán plazmaminták feldolgozása	58
3.8.1. Egészséges gyermekek és kamaszkorúak 6KPGF és TXB ₂ szintje	58
3.8.2. 6KPGF és TXB ₂ szintek fiatalkori infarktusos családok gyermekeiben	59
3.8.3. Korreláció a koleszterin-frakciók eltolódása és a plazma TXB ₂ koncentráció között egészséges felnőttekben	61
3.8.4. Kúraszerű halfogyasztás hatása hiperkoleszterinémiás önkéntesek 6KPGF és TXB ₂ szintjére	62
4. MEGBESZÉLÉS	64
4.1. A C18-szilárdfázisú extrakcióval kombinált RIA módszer értékelése	64
4.2. 6KPGF és TXB ₂ szintek korai érrelmeszesedésben, prevenciós lehetőségek	71
5. ÖSSZEFOGLALÁS	88
Köszönetnyilvánítás	89
Epilógus	90
IRODALOMJEGYZÉK	91

BEVEZETÉS

A dolgozat a szív- és érrendszeri hatásaiban kiemelkedő fontosságú, mintegy másfél évtizeddel ezelőtt felfedezett vegyület, a prosztaciklin (PGI_2) perifériás szintjének meghatározását tűzte ki célul, viszonylag egyszerű és nem költséges módszer segítségével. A dolgozat témaválasztását indokolja e prosztaglandin későbbiekben részletezett jelentősége, melyet bizonyít a munkásságért J. R. Vane-nek 1982-ben odaítélt Nobel-díj.

Az érlelmeszesedés kórfolyamatának vizsgálata laboratóriumunk fő kutatási profilját képezte. A lipidanyagcsere mellett 1980 óta folytak a PGI_2 -nel kapcsolatos kutatások, melyek állatkísérletekben egyebek között megerősítették a PGI_2 védő szerepét koleszterin-indukált atheroszklerózisban.

A témakör további vizsgálatához szükségessé vált a humán plazma PGI_2 és tromboxán A_2 szintjének meghatározása. A kidolgozott módszer birtokában a kórház osztályai részéről felmerült igények illetve az általunk a világirodalom tanulmányozása közben felvetődött problémák és lehetőségek közül néhányat megvalósítottunk, melyeket a dolgozatban röviden szintén megemlítek.

Szeretném megjegyezni, hogy a dolgozat irodalmi áttekintése talán hosszabb a megszokottnál, s nem kapcsolódik minden részlete a későbbi vizsgálatokhoz, de a prosztanoidok és ezen belül a PGI_2 sokszínűségéről, összetett szerepéről, bonyolult vizsgálati módszereiről összefoglaló és átfogó - még így sem tökéletesen teljes - képet szerettem volna festeni.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Rövidítések jegyzéke

AA	arachidonsav (<i>arachidonic acid</i>)
ACAT	acyl-CoA: koleszterin aciltranszferáz (<i>acyl CoA: cholesterol-acyltransferase</i>)
ACEH	sav koleszterin-észter hidroláz (<i>acid cholesteryl ester hydrolase</i>)
ADP	adenozin difoszfát
AI	atherogén index, az atherogén és antiatherogén koleszterin-frakciók aránya, a Klimov formulával számolható (2.8.)
ASA	acetil-szalicilsav (<i>acetylsalicylic acid</i>), aszpirin
B	antitesthez kötött aktivitás (RIA-ban)
cAMP	ciklikus-adenozin-3',5'-monofoszfát
cGMP	ciklikus-guanozin-3',5'-monofoszfát
CIA	kemilumineszcenciás-immunoassay
cv	variációs együttható, relatív szórás (<i>coefficient of variation</i>)
DHA	dokozahexaénsav, 22:6 n-3
EDRF	endotélium eredetű relaxációs faktor (<i>endothelium-derived relaxing factor</i>)
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav dinátrium sója
EET	epoxi-eikozatriénsav
EIA	enzimes immunmeghatározás (<i>enzyme immunoassay</i>)
EPA	eikozapentaénsav, 20:5 n-3
GC/MS	gázkromatográfiával kombinált tömegspektrometria (<i>gas-chromatography-mass spectrometry</i>)
HDL	nagysűrűségű lipoprotein (<i>high density lipoprotein</i>), antiatherogén hatású koleszterin-frakció
HPETE	hidroperoxi-eikozatetraénsav
HPLC	nagynyomású folyadékkromatográfia (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
LAT	acil-koenzim A: lizofoszfatidil - aciltranszferáz
LDL	kissűrűségű lipoprotein (<i>low density lipoprotein</i>), atherogén koleszterin-frakció
LT	leukotrién, pl. LTB ₄ = leukotrién B ₄

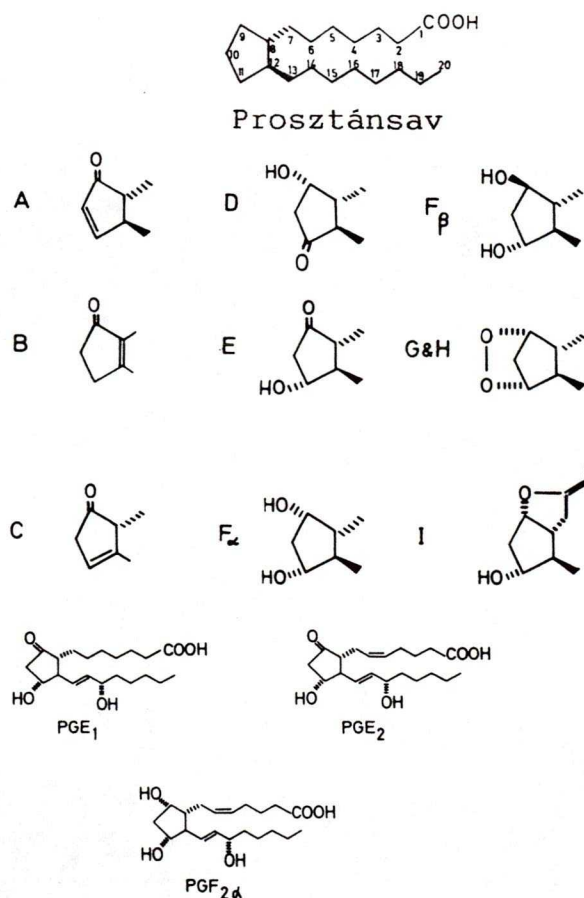
NSAID	nem szteroidális gyulladáscsökkentő szer (<i>non-steroidal antiinflammatory drug</i>)
NSB	nem specifikus kötés (<i>non-specific binding</i>) (RIA-ban)
PAF	vérlemezke aktiváló faktor (<i>platelet activating factor</i>)
PF4	4-es vérlemezke faktor (<i>platelet factor 4</i>)
PG	prostaglandin, pl. PGE_2 = prosztoglandin E_2
PGI_2	prosztaciklin, PGX, epoprosztenol
PRP	trombocitadús plazma (<i>platelet rich plasma</i>)
RCS	nyúlaortát összehúzó anyag (<i>rabbit-aorta contracting substance</i>)
RIA	radioimmunoassay, radioimmun-meghatározás
SD	az átlag szórása, standard deviáció
SEM	közepes szórás (<i>standard error medium</i>)
SRS-A	anafilaxia lassan reagáló anyaga (<i>slow-reacting substance of anaphylaxis</i>)
T	összes, totál aktivitás (RIA-ban)
TG	triglicerid, triacilglicerol
TLC	vékonyréteg kromatográfia (<i>thin-layer chromatography</i>)
TTP	trombotikus trombocitopéniás purpura
TX	tromboxán, pl. TXA_2 = tromboxán A_2
VLDL	nagyon kis sűrűségű lipoprotein (<i>very low density lipoprotein</i>)
6KPGF	6 - keto - $\text{PGF}_{1\alpha}$

1.2. A prosztaglandinok szerkezete és nevezéktana

A prosztaglandinok (PG-ok) a lipidek sokszínű csoportjába tartozó, 20 szénatomos, többszörösen telítetlen zsírsavak, melyeknél oxidatív záródás, s ezáltal öt szénatomos gyűrű kialakulása következik be a láncon belül. A PG-ok és metabolitjaik rendszerezésének alapja a húsz szénatomos prosztánsav, melynek két, 7 ill. 8 szénatomos oldallánca egy ciklopentán gyűrűhöz kötődik.

A PG-ok a 9,11 és 15-ös szénatomon oxigéntartalmú funkciós csoportokat és 1-3 kettőskötést tartalmaznak. A PG-okat a ciklopentán gyűrűn lévő funkciós csoportok alapján osztályozzuk, és célszerűségből nagy betűkkel jelöljük: A,B,C...stb. (1. ábra).

1. ábra



Az A,B,C típusú PG-ok a PGE dehidratációjával és izomerizációjával képződnek. Az F típusú PG-oknál az indexben feltüntetett a (α) ill. b (β) jelzés a 9-hidroxilcsoport térhelyzetére utal. A biciklusos PGI₂ biológiai jelentősége miatt triviális nevén, prosztaciklinként terjedt el.

A PG-ok neve után az indexben feltüntetett érték a vegyületben lévő kettőskötések számát jelzi. A PG₁-es szériában a kettőskötés a 13-as szénatomon van, a PG₂-es és PG₃-as csoportban ezenkívül az 5-ös ill. az 5-ös és 17-es szénatomon is kettőskötést találunk.

A PG-ok teljes bioszintézisére az élő szervezet nem képes, a felvett nyítláncú politelítetlen zsírsavakból képződnek. A zsírsavak jelölésénél feltüntetjük a molekula szénatomszámát, a kettőskötések számát, és azt is hogy a molekula végétől hányadik szénatomon találjuk az első kettőskötést. PL. a 20:4n-6 szerkezet az arachidonsavat jelöli.

A PG-ok lebomlásakor egy- vagy kétlépéses béta-oxidációval 2,3-dinor- ill. 2,3,4,5-tetranor PG-ok képződnek, ezek az alapvegyület C₁₈- ill. C₁₆-vázú metabolitjai. A 20-as szénatomszámú PG-ok omega-oxidációban is részt vehetnek karboxilcsoport képződése közben, s ezek további béta-oxidációja vezet rövidebb vegyületekhez, az ún. omega-dinor- és omega-tetranor-prosztánsavakhoz.

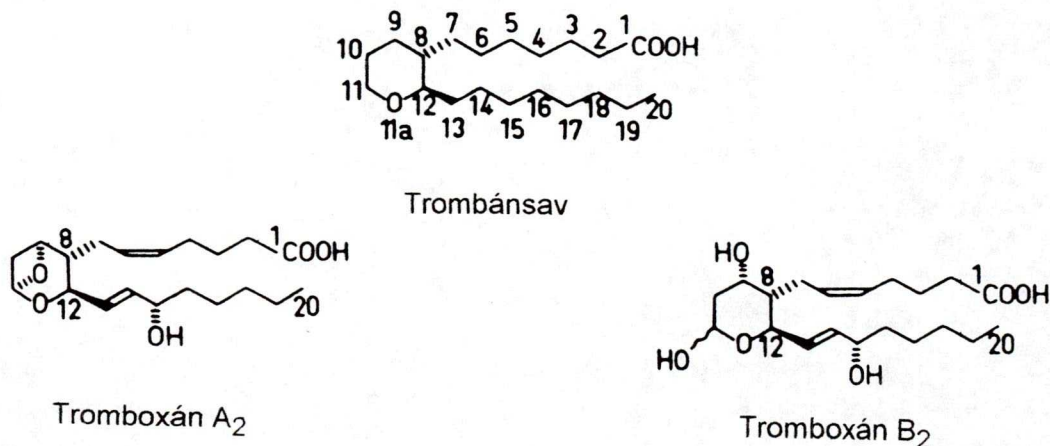
Ha a PG-ok nem a megfelelő C₂₀-as esszenciális zsírsavból képződnek, hanem kettővel hosszabb szénláncú zsírsavból, akkor a létrejött PG-ok karboxil szénláncra két metilén csoporttal hosszabb, s dihomó-prosztaglandinok keletkeznek. Utóbbiak *in vivo* képződése még nem bizonyított.

A tromboxánok nomenklatúrája kapcsolódik a PG-okéhoz. Alapvegyületük a trombánsav, mely hattagú oxángyűrűt tartalmaz.

Élettanilag legjelentősebb képviselőjük a tromboxán A₂. Hidrolízisével tromboxán B₂ képződik (2. ábra).

Származékaik nevezéktana a PG-okéval egyező.

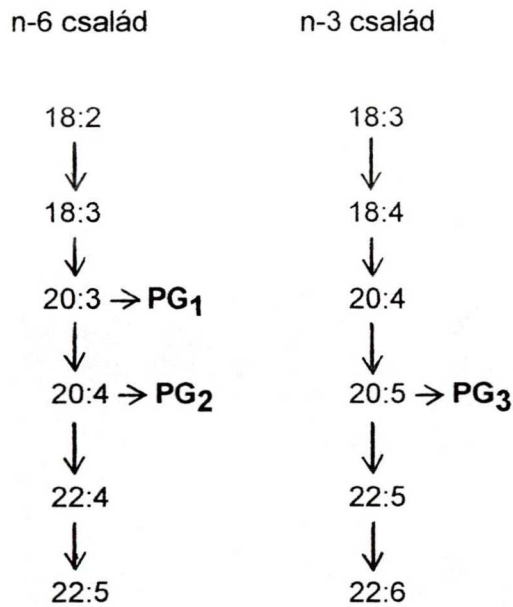
2. ábra



1.3. Arachidonsav metabolizmus. A PG-ök bioszintézise

A PG-ök a szervezetben esszenciális politelítetlen zsírsavakból képződnek. Az ehhez szükséges zsírsavak a 6-os és 9-es helyzetben cisz helyzetű kettőskötést tartalmaznak. A növényi táplálék két alapvető esszenciális zsírsava a linolsav ($18:2n-6$) és az alfa-linolénsav ($18:3n-3$). Ezek a szervezetben átalakulnak: méginkább telítetlenné válnak (deszaturáció), láncuk hosszabodik (elongáció), s létrejönnek a PG-ök szintézisének kiindulási zsírsavai: a dihomogamma-linolénsav ($20:3n-6$), az arachidonsav ($20:4n-6$) és az eikozapentaénsav (timnodonsav, $20:5n-6$). Utóbbi három származtatott zsírsavhoz hozzájuthatunk közvetlenül a táplálkozás révén is, az állati hús és zsiradék ill. a hal és egyéb tengeri élőlények olaja tartalmazza őket (3. ábra).

3. ábra



A politelítetlen zsírsavakat a szervezetben a membrán lizofoszfolipidek veszik fel, miközben jórészt 2-acil helyzetben észtereződnek, így a politelítetlen zsírsavak a sejtmembrán foszfolipidekben tárolódnak. A folyamatot két enzim, az arachidonil-CoA szintetáz és a lizofoszfatidil-aciltranszferáz (LAT) katalizálja. A politelítetlen zsírsavak a foszfolipidekben a membrán fluiditásának fenntartásáért felelősek, míg a telített zsírsavak a membránt merevítik, azt rideggé teszik.

Az arachidonsav (AA), teljes nevén 5,8,11,14-eikózatetraénsav, a kettes típusú PG-ok kiindulási anyaga majdnem minden szövetben megtalálható. A szabad AA koncentrációja nyugalmi állapotban igen alacsony. Stimuláló hatásra a foszfolipidekből AA szabadul fel, a legtöbb szövetben a foszfolipáz A₂ enzim segítségével (102). Mivel a foszfolipázok rendkívül érzékenyek mechanikai vagy kémiai stimulusra, a sejtkörnyezetnek már csekély mértékű megváltozása lényeges mennyiségű AA felszabadulást eredményezhet. A foszfolipáz enzimek aktiválódása nem teljesen tisztázott folyamat, a sejtmembrán zavarai váltják ki: pl. kémiai serkentés angiotenzin II, bradikinin, arginin vazopresszin, noradrenalin, trombin révén (33,60,110,126,252) vagy mechanikai stimulus hatására (60). Legfontosabb a foszfolipáz A₂ és a foszfolipáz C az AA felszabadításában. A foszfatidil-etanolamint és a foszfatidil-kolint a foszfolipáz A₂ bontja, míg a foszfatidil-inozitol hidrolíziséért a foszfolipáz C a felelős. A foszfolipáz A₂ enzim aktivitását a Ca²⁺ - ionok növelik, míg a kalcium-csatorna blokkolók és a glükokortikoidok gátolják (84,105).

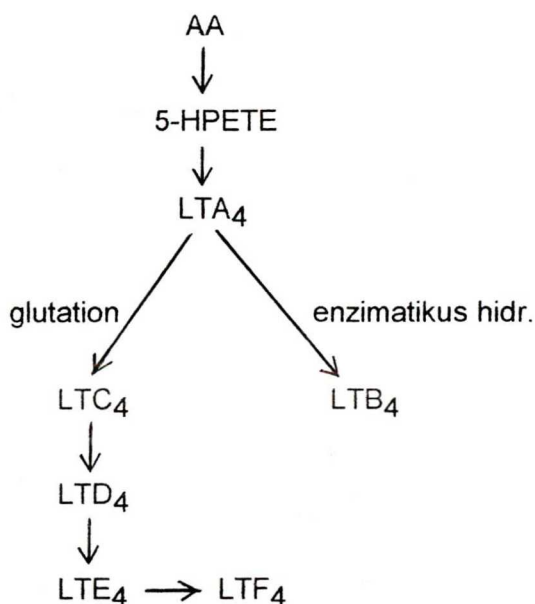
A felszabadult AA gyorsan továbbalakul, így a teljes folyamatban a foszfolipid-észter raktárakból történő AA felszabadulás a sebességhatározó lépés (102,229). Az AA többféle létfontosságú vegyületcsoport kiindulási anyaga. A dolgozat szempontjából legfontosabb a PG-ok felé mutató reakcióút, de lényeges a leukotriének és az epoxi-eikózatetriénsavak képződése, sőt az eikozanoidok szintézisének fontos szabályozási mechanizmusát jelenti az AA visszaépülése a membrán foszfolipidekbe (61). Az AA felszabadulást tehát a foszfolipázok, az arachidonil-CoA szintetáz, a CoA-tól függetlenül működő AA-transzasiláz és a LAT közösen kontrollálják.

A politelítetlen zsírsavak, így az AA is oxidációs folyamatok kiindulási anyaga. Az oxidáció lehet enzimatis és levegő, fény, hő hatására bekövetkező autooxidáció. Az utóbbi folyamat során főként lipid-hidroperoxidok képződnek, hematin tartalmú komponensek (hemoglobin, mioglobin) is katalizálják.

A leukotriének (LT-ek) képződése AA-ból a lipoxigenáz enzimek működése révén történik. Nevüket onnan kapták, hogy elsőként leukocitákból extrahálták őket, és konjugált trién szerkezettel rendelkeznek. A lipoxigenáz termékek nem biológiai regulátorok (mint pl. a PG-ok), hatásuk patofiziológias természetű. Az asztmás megbetegedéseket okozó anyagról, melyet az anafilaxia (túlérzékenység) lassan reagáló anyagának neveztek el (slow reacting substance of anaphylaxis, SRS-A), bebizonyosodott, hogy leukotrién C₄ (LTC₄) és LTD₄ keveréke. A LT-ek szerepe főként a túlérzékenységi és gyulladásos folyamatokban érvényesül (190). Részt vesznek ezenkívül különféle rendellenes vérzési folyamatokban és símaizom összehúzódásokban (32,190).

A LT-ek és egyéb lipoxigenáz termékek bioszintézise röviden a 4. ábrán látható. Először a zsírsav szubsztrátból oxidációs lépésben nem ciklusos hidroperoxidok keletkeznek a lipoxigenáz enzim közreműködésével. Ezek a képződött savak a hidroperoxi-eikózatetraénsavak (HPETE). Az oxidáció a molekula különböző helyein mehet végbe (az 5-HPETE-hez hasonlóan képződik a 8, 9, 11, 12 és 15-HPETE is). E labilis intermedierek továbbalakulásakor hidroxisavak képződnek (HETE). Az 5-HPETE dehidratálódásával képződik a bomlékony epoxid, konjugált trién szerkezetű LTA₄, melyből további LT-ek származtathatók (18).

4. ábra



Újabban megélénkült az érdeklődés az AA ún. harmadik metabolikus útja felé, mely reakciósor szintén az AA oxidációjával kezdődik, s eredményeként epoxi-zsírsavak keletkeznek. A folyamat monooxygenáz enzimek által katalizált és citokróm P-450, NADPH és oxigén-függő (156). A képződött epoxi-eikózatetriénsavak (EET-k) befolyásolják az értónust és a vérlemezke funkciót, szabályozzák a sejtmembrán permeabilitását és az iontranszportot. Az EET-k epoxid-hidroláz hatására gyorsan hidrolizálnak vic-diolokká. Kémiájuk és gyakorlati jelentőségük ismertetése meghaladja a dolgozat kereteit.

Az AA napjainkban is legfontosabbnak tartott metabolikus útja a PG-ok (prosztanoidok) szintéziséhez vezet. A ciklooxygenáz enzim, mely az AA-at PG-endoperoxidokká alakítja, szinte minden állati és humán szövetben megtalálható (189). A ciklooxygenáz egy komplex reakciót katalizál, melynek lépései a következők:

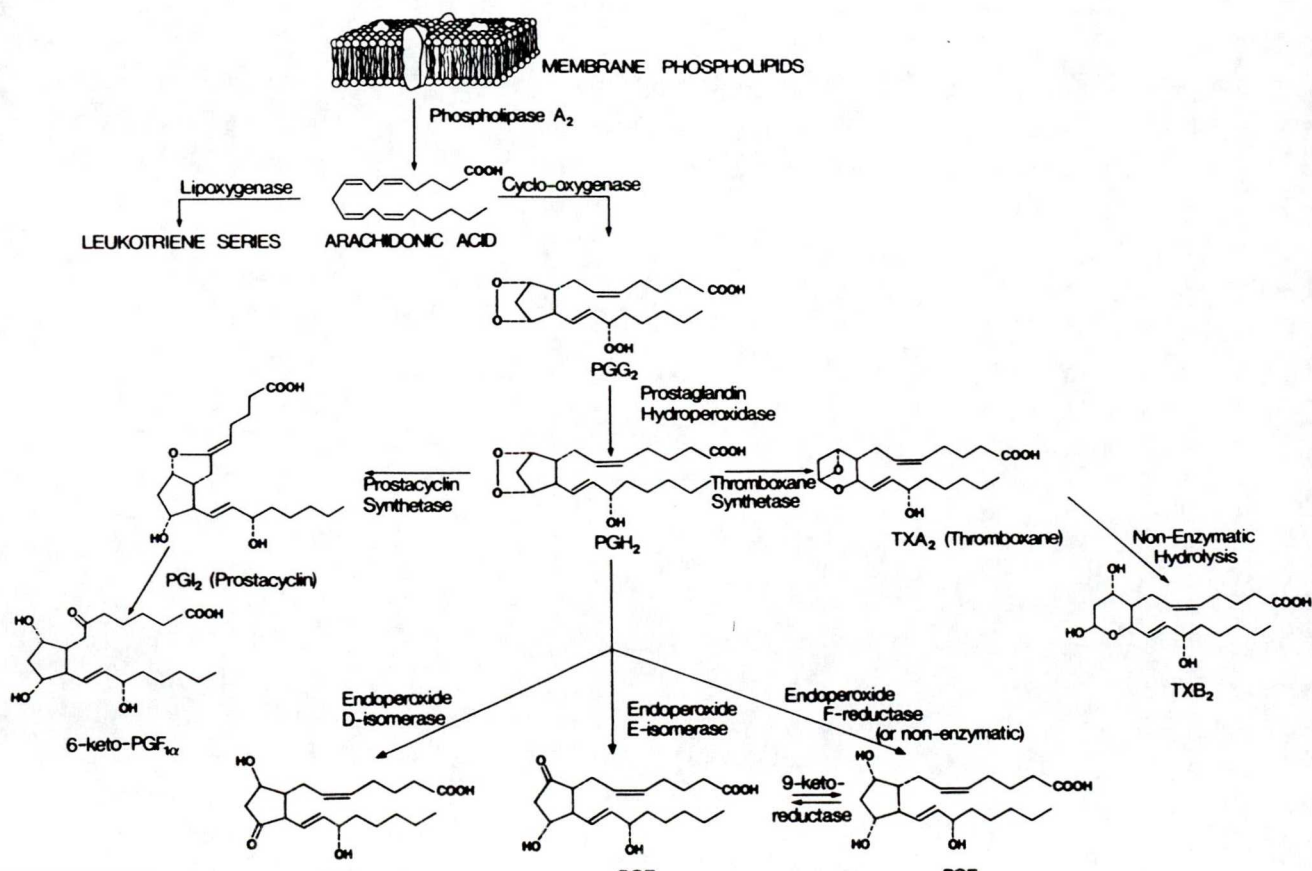
1. a 13-as szénatomról egy H sztereospecifikus eltávolítása
2. 11-es szénen molekuláris O_2 felvétele, miközben a 11-cisz kettőskötés 12-transz helyzetbe tolódik
3. a 11 és 9-es szén között peroxid híd kialakulása
4. ezzel egyidőben a 8-as és 12-es C közti gyűrűzáródással ciklopentán gyűrű képződik
5. a 14-cisz kettőskötés 13-transz helyzetbe tolódik, a 15-ös C-re hidroperoxi-csoport épül.

A reakciósort 1965-66-ban tisztázták, de az endoperoxidokat izolálni csak nyolc évvel később sikerült (72,188). A zsírsav ciklooxygenáz katalizálja a PGG_2 - PGH_2 átalakulást is, azaz a ciklooxygenáz (PGG_2 képződés) és peroxidáz (PGH_2 képződés) aktivitást nem sikerült elkülöníteni. Ezért az enzimet prosztaglandin G/H szintetáznak is szokták nevezni.

A PG-endoperoxidok jelentős biológiai aktivitással rendelkeznek, símaizom összehúzó és vérlemezke aggregátorok (74). Vizes oldatban bomlékonyak, féléléttartamuk 4-6 perc.

A PG-endoperoxidok továbbalakulásakor képződnek a 2-es típusú PG-ok. Az ún. klasszikus PG-ok az E,F,D típusú PG-ok. Később fedezték fel az igen labilis tromboxán (TX) A_2 -t, majd a PGI_2 -t (5. ábra).

5. ábra (J. P. Codde, L. J. Beilin: Prostaglandins and experimental hypertension: a review with special emphasis on dietary lipids. J. Hypertens. 4:675-686. 2. ábrája)



A PGH_2 átalakulása lehet enzimatis vagy spontán reakció. A PGE_2 és PGD_2 izomerizációs folyamatban képződik, míg a PGF_{2a} az endoperoxid redukciójával. A PGI_2 és a TXA_2 szintetáz enzimek hatására képződik, a PGI_2 biciklusos vegyület, a TXA_2 pedig hattagú karbociklusos gyűrűt tartalmaz. Mindkét anyag gyorsan hidrolizál 6-keto- PGF_{1a} ill. TXB_2 képződése közben (5. ábra).

1.4. A prosztanoidok lebomlása

A prosztanoidok nagy biológiai potenciállal rendelkeznek, rendkívül kis mennyiségben, a szteroid hormonoknál nagyságrenddel kisebb koncentrációban hatásosak, így nem meglepő, hogy a legtöbb szövetben olyan enzimek vannak, melyek a PG-okat gyorsan degradálják. A PG-ok felvétele és lebontása főként a tüdőben, májban és vesében történik. A PG-metabolitok vizsgálata a hetvenes évek közepén kezdődött, amikor állatkísérletek során egyes szövetek és szervek PG-tartalmát határozták meg. Később a végső degradációs termékeket vizeletből azonosították.

A lebomlás első lépése általában a PG-ok 15-ös helyzetű hidroxil-csoportjának oxidációja, s ezzel a vegyület biológiai aktivitása jelentősen csökken. Az ezután, a 13-as helyzetben levő kettőskötés redukciójával keletkező 15-keto-13,14-dihidro-PG-ok gyakorlatilag inaktívak. Az első lépés nagyon gyors, a 15-hidroxi-PG-dehidrogenáz katalizálja. Egy harmadik lépésben a 15-keto-reduktáz enzim működése révén (az elsővel ellentétes folyamatban) 13,14-dihidro-PG-ok képződnek, melyek általában biológiai aktivitással rendelkeznek.

A vizeletbe kiválasztott végső PG-degradációs termékek erősen oxidált formában vannak, pl. dinor- ill. tetranor- mono- vagy dikarbonsavak formájában (65).

Jellemző reakció az E és F típusú PG-ok egymással történő átalakulása is. A PGE_2 9-es ketocsoportja hidroxillá redukálódhat *in vivo*, PGF_{2a} képződése közben (245). A reakciót katalizáló 9-keto-reduktáz enzimet többféle szövetből izolálták. Az F_a típusú PG-ok visszaalakulásáért PGE_2 -vé a 9-hidroxi-dehidrogenáz felelős. A PGD vegyületek 11-es helyzetű csoportjának redukciójával F típusú PG-ok képződhetnek. A PG-ok interkonverziójának jelentősége abban van, hogy a bizonyos szövetekben egymással azonos, míg más szövetekben ellentétes hatású PG-ok egyensúlya és mennyisége fenti folyamatok által is szabályozható.

A PGI_2 kémiai szerkezete (enol-éter) révén igen instabilis sav, spontán hidrolizál 6-keto- PGF_{1a} (6KPGF) képződése közben. A PGI_2 szintézisre általában

emiatt a 6KPGF mérése alapján szoktak következtetni (122,164). A keringésbe bekerülő PGI_2 azonban nem mutat olyan gyors lebomlást, mint azt az *in vitro* élettartam alapján várnánk (38), ez a későbbiekben részletezett stabilizáló anyagoknak köszönhető. A PGI_2 és metabolitjai lebontásában részt vesz a 15-hidroxi-dehidrogenáz és a 13,14-dihidro-reduktáz enzim, valamint jellemző - a többi PG-hez hasonlóan - a PGI_2 béta- és omega-oxidációja a májban és a vesében. A vizeletben kiválasztott PGI_2 metabolitok többek között a 6KPGF, a 2,3-dinor-6KPGF, a 6-keto- PGE_1 , a pentanor- PGF_{1a} , a 6,15-diketo- PGF_{1a} , a 6,15-diketo-13,14-dihidro- PGF_{1a} és a 6,15-diketo- PGE_1 (173,182). Vizeletben a fő PGI_2 termék a 2,3-dinor metabolit (40). Intravénás $^3\text{H-PGI}_2$ injekció beadása után vékonyréteg kromatográfiás és nagynyomású folyadékkromatográfiás meghatározással hétféle radioaktív PGI_2 metabolitot tudtak kimutatni a vérben, a fő termék a 6KPGF volt. Későbbi vérvételeknél a polárosabb komponensek aránya nőtt meg (16 és 18-szénláncú dikarbonsavak). A 6KPGF szintje valószínűleg a cirkulációba frissen belépő PGI_2 mennyiségére utal (223).

A szintén fontos biológiai hatásokkal rendelkező TXA_2 gyorsan hidrolizál *in vitro* a gyakorlatilag inaktív TXB_2 -vé. 37 °C-on, fiziológiás pH-n a TXA_2 félélettartama 30, *in vivo* pedig 37 másodperc (75). A TXB_2 további, enzimatis leontását tekintve, a TXB_2 a 15-hidroxi-dehidrogenáznak nem jó szubsztrátja, 15-keto-13,14-dihidro- TXB_2 nem mutatható ki sem plazmában, sem vizeletben. A keringésben a fő TX metabolit maga a TXB_2 . Vizeletbe történő kiválasztáskor a TXB_2 béta-oxidációban vesz részt 2,3-dinor- TXB_2 képződése közben (44). A béta- és omega-oxidáció kombinációjának eredményeként többféle metabolitot is kimutattak, méréstechnikailag a humán vizsgálatokban a 11-es hidroxil-csoport redukciójával képződő 11-dehidro- TXB_2 jelentős, melyet a plazma TXA_2 szintjének követésére alkalmaznak (25).

A PGI_2 és TXA_2 viszonylagos stabilitása a keringésben bizonyos plazma faktoroknak köszönhető, melyek ezeket a labilis molekulákat stabilizálják. Mind a TXA_2 -ról, mind a PGI_2 -ről kimutatták, hogy plazmában proteinekhez, főként albuminhoz kötött formában vannak jelen (48,161). Újabb kutatások a PGI_2 -t stabilizáló faktor biokémiai analízisére irányultak, s az albumin preparátumban levő apolipoprotein, az Apo A₁ bizonyult azonosnak ezzel a faktorról (251). Az Apo A₁ az érlelmeszedés ellen védő koleszterin-frakciónak, a nagy sűrűségű lipoprotein koleszterinnek (high density lipoprotein cholesterol, HDL-Ch) apoproteinje, s lehetséges, hogy a HDL-Ch ill. az Apo A₁ a jótékony hatását épp a PGI_2 stabilizálásán keresztül fejti ki. Erről részletesebben a PGI_2 érrendszeri szerepének vizsgálata során még szó esik.

1.5. A prosztanoidok biológiai hatásai

A PG-ok sokrétű biológiai hatásairól e helyen csak röviden emlékezem meg, részletes összefoglalót többek között E. Oliw és mtsai közöltek 1983-ban (157).

A PG-ok tulajdonságainak követése bonyolult feladat, s ehhez több tényező is hozzájárul:

- különböző PG-ok hatása ellentétes lehet (PGE-PGF)
- ugyanazon PG különböző szövetekben különböző hatású lehet (a PGE₂ a méhtest izomzatát összehúzza, a méhnyakét pedig elernyeszti)
- ugyanazon szerv különböző módon reagál a fiziológias hatásra különböző időpontokban (pl. a méh a menstruációs ciklus és a terhesség különböző szakaszaiban)
- ugyanazon vegyület ellentétes hatást okoz különböző szervezetekben (a PGF_{2a} vérnyomáscsökkentő hatású nyúlban és macskában, míg egérben és kutyában enyhén vérnyomásemelő)
- ugyanazon PG különböző koncentrációban ellentétes hatású lehet
- a telítetlenségi fokukban különböző PG szériák ellentétes hatásúak lehetnek (a PGE₁ a ciklikus-AMP szintet emeli, a PGE₂ pedig csökkenti).

Fentiek figyelembevételével a PG-ok összetett hatásait nagyon körültekintően kell vizsgálat alá venni. Természetesen ez a sokrétű hatás legtöbbször nem közvetlen, hanem különböző mediátorok szintjének megváltoztatásán keresztül jön létre.

A PG-ok az egész szervezetben kifejtik hatásukat. Elsők között a PGE és F típus méhizomzatra kifejtett hatását ismerték fel, intravénás adagolással azonnali, gyors összehúzódnásokat tudtak kiváltani. A terhesség első és második harmadában abortuszt végeztek, a terhesség végén pedig a szülést indították be ilyen módon (242). Azóta is folyik hatékonyabb és kevesebb mellékhatással rendelkező PG-analógok kutatása hasonló célra.

Sok PG található a vesévelőben, míg a vesekéregben kevesebb. A vesében a PG-ok szabályozzák annak működését, véráramlását, főként valamely egyéb hormonális vagy idegi szabályozás alatt álló faktor zavara esetén (8). Irányítják a renin-angiotenzin rendszert (52), és főként a PGI₂ és PGE₂ részt vesz a só- és vízkiválasztásban (67).

A gyomor-bél funkciók tekintetében ismeretes, hogy többféle PG gátolja a gyomorsav kiválasztást és sejtvédő hatást mutat (3,5,137). Főként a PGE₁ és a PGE₂ a gyomor- és nyombélfekélyek gyógyításában bizonyult hatékonynak, metilált és egyéb szintetikus analógjaik pedig még erősebb sejtvédő hatással rendelkeznek (180). A gyomor- ill. nyombélpanaszok a betegek 10-30 %-ánál aszpirin, ibuprofen vagy egyéb

nem-szteroidális gyulladásgátló (NSAID) szedése után alakultak ki, éppen a PG-anyagcsere zavarai következtében (103). A PGI_2 citoprotektív hatása a *de novo* protein szintézis stimulálásához kapcsolható (5).

A tüdőt kezdetben a PG-ok bioszintézisének, és enzimatis lebontásának helyeként ismerték fel, később kiderült, hogy mind a légzés, mind a vérkeringés funkcióinak eddig ismert leghatékonyabb irányítói az AA metabolitok (42,89). A PGF_{2a} összehúzza, a PGE_2 elernyeszti a hörgők símaizomzatát. A TXA_2 érösszehúzó hatása miatt növeli a tüdő mikroereiben a nyomást, s növeli a tüdőben a folyadék felhalmozódást, mely hajlamosít embóliás megbetegedésre. A tüdő patológiás elváltozásaiban igen fontos szerepet játszanak még az AA kaszkád lipoxigenáz termékei is; a LT-ek felelősek elsődlegesen az emberi asztmatikus megbetegedésekért.

A PG-ok az idegrendszerben is fontos hatást fejtenek ki. Sok olyan folyamat van az agyban, melyek során PG-ok szabadulnak fel. Elektromos ingerlés, migrén, ischemia, görcsök esetén gyors AA felszabadulás figyelhető meg. Különböző szervezetekben különböző típusú PG-ok dominálnak az agyban. Pl. egér, patkány: PGD_2 ; macska: PGE_2 ; kutya, ember: PGF_{2a} ; tengeri malac: TXB_2 . A humán és patkány agyi erek intenzív PGI_2 termelők is egyben. A PG-oknak szerepük van a hőmérséklet-szabályozásban, az agyi véráramlásban és keringésben ill. az idegi válaszokban (56,243,244). Az E típusú PG-ok gátolják az adrenerg idegi átvitelt, valószínűleg a noradrenalin felszabadulás gátlása révén (79). A PGD_2 számos egyéb hatása mellett gátolja a szimpatikus idegi vezetést (151) és természetes alvást indukáló anyag (160). A PG-oknak fontos szerepük van számos idegi eredetű megbetegedésben (pl. schizofrenia, epilepszia, migrén, mániás depresszió).

A PG-ok különböző szervekben betöltött funkciói, melyeket az előbbieken röviden felvázoltam, részben már utalnak a PG-ok érrendszeri, és vérkeringésben betöltött szerepére. A PGF_{2a} vérnyomásemelő hatását már 1968-ban leírták (36), a PG-ok termelődését érfalból pedig 1975-ben sikerült kimutatni (224). A PGE_2 infúzió a legtöbb szervezetben vérnyomáscsökkentő és értágító hatású. Klinikai célokra a PGE_1 is hasonlóan jól használható. Csökkenti a szívizom összehúzódását, ezáltal fokozza a szív tejesítményét, csökkenti az érfal érzékenységet és gátolja a vérlemezke aggregációt (158).

A klasszikus PG-ok mellett érrendszeri hatásaiban sokkal jelentősebb szerepe van a PGI_2 -nek és a TXA_2 -nek. Összetett biokémiai folyamatokban való részvételük és biológiai hatékonyságuk miatt e két anyag érrendszeri hatásait a dolgozat következő fejezetében részletezem.

A PG-ok gyors metabolikus inaktiválódásuk miatt nem mint cirkuláló hormonok fejtik ki hatásukat, nem tárolódnak, az adott szerv működését, mikrokeringését, az

erek áteresztőképességét sokkal inkább a helyileg felszabadult PG-ok szintje határozza meg normál és patológias körülmények között egyaránt(127).

1.6. A prosztaciklin és a tromboxán A_2 szerepe a szív- és érrendszerben

M. Hamberg és B. Samuelsson 1975-ben fedezték fel, hogy humán vérlemezkékben arachidonsavból főként tromboxánok képződnek (73,75). Ők bizonyították, hogy biológiai tulajdonságai és félélettartama alapján a korábban kimutatott nyúlaortát összehúzó anyag (rabbit aorta contracting substance, RCS) azonos a TXA_2 -vel (213). A TXA_2 nagyon bomlékony molekulának bizonyult, biológiai hatásvizsgálata alapján félélettartama fiziológias körülmények között mindössze fél perc volt (75). Vérlemezkéből izolált frakció segítségével P. Needleman és mtsai 1976-ban bioassay technikával kimutatták, hogy PG-endoperoxidokból TXA_2 szabadult fel, mely erősen összehúzta a nyúlaortát ill. vérlemezke aggregációt okozott. A folyamatért felelős enzimet tromboxán szintetáznak nevezték el (152).

S. Moncada és mtsai 1975-ben kezdték el vizsgálni a TXA_2 bioszintézist különböző szövetekben. Az érszövet nem termelt TXA_2 -t, de kaszkád bioassay technikával (230) sikerült kimutatni, hogy a sertés érfal mikroszómális frakciói a PG-endoperoxidokat egy ismeretlen enzim segítségével egy bomlékony, vérlemezke aggregációt gátló anyaggá alakítják (140). Az anyagot PGX-nek nevezték el. Úgy mint a TXA_2 , a PGX is labilis vegyületnek bizonyult, félélettartama fiziológias körülmények között 2-3 perc volt. 15 másodperces forralás teljesen megszüntette az aktivitást (38). További vizsgálatok kimutatták, hogy az új vegyület hatékonyan tágította a koszorúereket (37), lazította a belfodri és hasi artériákat (21) és erős *in vivo* antitrombotikus hatással rendelkezett (81). Érszövetben a PGX volt az AA fő terméke (90). 1976-ban C. Pace-Asciak mutatta ki, hogy patkánygyomorban a 6-oxo-PGF_{1α} (6KPGF) képződése PG-endoperoxidokból a labilis PGX intermediéren keresztül megy végbe (164).

A Wellcome Research Laboratory (Kent, Anglia) és az Upjohn Company (Kalamazoo, Michigan) kutatóinak együttműködése során sikerült tisztázni a PGX kémiai szerkezetét (90). Ezután a PGX-et biciklusos sajátsága miatt prosztaciklinnek nevezték el, és a PGI₂ rövidítést vezették be. Kémiai neve 5-[(1S,3Z,5R,6R,7R)-7-hidroxi-6-[(1E,3S)-3-hidroxi-1-oktenil]-2-oxabicyclo-(3,3,0) okt-3-ildén pentán]-sav. A gyógyszerári fagyasztva-száritott preparátum neve epoprosztenol. Legáltalánosabban elterjedt azonban a "prosztaciklin" triviális név.

A TXA_2 és a PGI_2 felfedezése alapvetően hozzájárult a vérlemezke-érfal kölcsönhatás megértéséhez, és új utat nyitott a hemosztázis és a trombotikus folyamatok kutatásában. A vérlemezkek által termelt TXA_2 erős aggregátor tulajdonságú, érösszehúzó anyag. A PGI_2 az artériák és vénák fő PG-ja. Mikroerekben, főként a kapillárisokban szintén a PGI_2 a fő AA termék (59).

Érfali sejtkulturák vizsgálata kimutatta, hogy a PGI_2 fő termelője az endotélium (115,238). Az érfal PGI_2 -termelő aktivitása legnagyobb az intimális felszínen és folyamatosan csökken az adventícia felé (141). A PGI_2 gátolja a vérlemezkek aggregációját és csökkenti a vérnyomást értágító hatásán keresztül, beleértve az összes érfalat.

A PGI_2 és TXA_2 így biológiai értelemben a homeosztázis mechanizmusának két ellentétes pólusát képviseli.

A PGI_2 a vérlemezke aggregáció gátlását az adenilát-cikláz enzim serkentésén, azaz a vérlemezkek ciklikus-AMP (cAMP) szintjének növelésén keresztül fejti ki (62,222). Hatása ilyen szempontból erősebb és hosszabb ideig tart, mint a PGE_1 -é vagy PGD_2 -é. A PGI_2 gátolja a vérlemezke foszfolipáz és ciklooxygenáz működését (104,121). Mindez a PGI_2 cAMP szintet növelő tulajdonságának köszönhető. A PGI_2 , azáltal, hogy gátolja az AA-kaszád bizonyos lépéseit, a vérlemezke aktivitás *in vivo* szabályozását látja el.

A PGI_2 nem csak a vérlemezkekre fejt ki kontrolláló hatást. Emeli a cAMP szintet humán fibroblasztokban (63), tüdő homogenizátumokban (114), polimorfmagvú leukocitákban (20) stb. is. Ezekben a sejtszerekben szintén a PGI_2 - TXA_2 rendszer tölt be fontos szerepet a sejtfunkciók szabályozásában. A PGI_2 magában az endotéliumban is emeli a cAMP szintet, így a saját bioszintézisét is befolyásolja, negatív visszacsatolás formájában (85,193).

Bár a PGI_2 az endotéliumban termelődik, az érfali ciklooxygenáz enzim gátolt működése esetén is képződhet PGI_2 több sejt együttműködése révén. Friss érgyűrűk és endoteliális sejtek ciklooxygenáz enzimét indometacinnal gátolták, majd vérlemezke-szuszpenzióval inkubálták, és ekkor PGI_2 -szerű aggregációgátlás jelent meg (21,22). A PGI_2 szintetáz szelektív gátlásakor ez a hatás megszűnt (187). Az adatok bizonyítják, hogy az érfal nem csak a saját endogén prekursoraiból képes PGI_2 -t szintetizálni, s az érfal és a vérlemezkek között fontos biokémiai együttműködés áll fenn (142). A vérlemezke aggregáció gátlása párhuzamos a vérlemezkek cAMP szintjének növekedésével (13). Alátámasztja a fenti eredményeket az is, hogy az endotélsejtek a külső PGH_2 -t is képesek PGI_2 -vé alakítani. A. J. Marcus és mtsai kimutatták, hogy az endotél sejtejei a vérlemezkek PG-endoperoxidjait csak akkor alakítják PGI_2 -vé, ha a vérlemezkekben gazdag plazma (platelet-rich plasma, PRP)

koncentrációja hasonló a normál véréhez (123). Nagy vérlemezke koncentrációnál a vérlemezke-vérlemezke kölcsönhatás háttérbe szorítja a vérlemezke-endotél reakciót.

A vér alakos elemei közül a fehérvérsejtek szintén szintetizálnak PG-endoperoxidokat és TXA_2 -t, melyek az érfallal történő kölcsönhatásuk révén PGI_2 produkciót segíthetnek elő (80). A nyirokrendszer fehérvérsejtjei, a limfociták PGI_2 -szintetáz aktivitással rendelkeznek, s képesek a vérlemezkek által felszabadított PGH_2 konvertálására PGI_2 -vé (246). A fenti folyamatokon keresztül a PGI_2 szabályozhatja a fehérvérsejtek viselkedését és aktivitását, pl. gyulladások és immunválasz-reakciók esetében (83).

Az intakt, ép érendotélium és a vérlemezkek között nincs reakció normál körülmények között, s a PGI_2 felszabadulása hozzájárul az érfal tromboerezisztenciájához. A PGI_2 alacsony koncentrációban gátolja a vérlemezke aggregációt (vérlemezke-vérlemezke kölcsönhatás), míg a vérlemezke adhéziót az érfalhoz (vérlemezke-kollagén kölcsönhatás) csak magasabb koncentrációban gátolja. Így a PGI_2 hozzájárul ahhoz, hogy a vérlemezkek a sérült érfalhoz tapadhassanak, s ezáltal azt javíthassák, míg a vérlemezkekből álló trombusképződést megakadályozza (82).

A PGI_2 -szintetáz enzim rezisztens sok természetes és szintetikus anyagra, azonban a lipidperoxidok (pl. a 15-hidroperoxi-arachidonsav, oxidált lipoprotein frakciók, LDL-peroxidok) a működését teljesen gátolják (21,187). Szabadgyökök által indukált lipidperoxidáció és párhuzamos PGI_2 szint csökkenés figyelhető meg például E-vitamin hiányban, az életkor előrehaladtával és érlelmeszesedésben (58,154). Az atheromás plakkokban lipidperoxidok halmozódnak fel, az érfali PGI_2 -termelés gátlódik, míg a vérlemezkek aktiválódnak (203).

Az atheroszklerotikus érfal sokkal kevesebb PGI_2 -t szintetizál, mint az egészséges, függetlenül attól, hogy kezdeti vagy kifejlett lerakódásokról, léziókról van-e szó (203). Ez azt mutatja, hogy az érlelmeszesedés legkezdetibb szakasza, a zsíros csíkok ("fatty streaks") megjelenése az érfalon a betegség folyamatának kritikus szakasza.

A betegség kialakulásának kezdetén a PGI_2 -termelés átmenetileg nő /ezt alátámasztják koleszterin-etetéses nyúl kísérletek (7)/, majd jelentősen, végleg lecsökken. Ez a kétfázisú válasz a koleszterin hatására biológiailag még nem teljesen tisztázott. A kezdeti szakaszban makroszkópikus elváltozások nincsenek, mikroszkóppal viszont kimutathatók az érfal morfológiai elváltozásai: vizenyős érfal, megnövekedett mennyiségű endoplazmás retikulum. A fokozott membránaktivitással együttjárhat a membránhoz kötött enzimek, így a ciklooxygenáz és a PGI_2 -szintetáz enzim aktiválódása (7), ill. nagyobb AA felszabadulás az érfali sejtmembrán foszfolipidekből (128). Az eredmény fokozott PGI_2 szintézis.



Kiseb helyi intimális sérüléskor a $\text{PGI}_2\text{-TXA}_2$ arány nem bomlik meg, a környező endotelium és az intima elegendő PGI_2 -t termel. A vérlemezkék az érfalhoz tapadhatnak, hogy a sérülést kijavítsák, de az aggregáció gátolt. Kiterjedt, krónikus érfalsérüléskor azonban az arány megváltozik. A betegség kifejlődésekor az intima PGI_2 termelése lecsökken, majd meg is szűnik az érfali enzimek csökkent működése következtében, melyhez a lipidperoxidok felszabadulása is hozzájárul (106). A csökkent PGI_2 szint miatt megindul a vérlemezkék aggregációja, az aktiválódott vérlemezkékből tromboxánok és más anyagok szabadulnak fel, majd kis trombusok képződnek, melyek a keringéssel továbbhaladva a véráramlást lassítják ill. megakadályozzák.

A betegséget a hiperlipidémia nagyban elősegíti, mert a vérlemezkék koleszterin tartalmának növekedésével nő a TXA_2 képződés (226), a vérlemezkék AA tartalma egyre nagyobb százalékban konvertálódik a vérlemezke aktivitást fokozó TXA_2 -vé (212). A TXA_2 aggregációt okozó hatásához kalcium-ionokra van szükség. A kalcium aktiválja a foszfolipáz A_2 -t, mely a vérlemezkékben emelkedett AA felszabadulást eredményez (179). A TXA_2 mobilizáló hatása miatt az intracelluláris kalcium szint tovább emelkedik (pozitív feed-back). A magasabb kalcium-ion tartalom adenilát-cikláz gátló hatású (199).

A PGI_2 szintjének változása az atherogenezis folyamán azért is fontos, mert egyéb antitrombotikus hatásaira csak újabb vizsgálatok során derült fény. A PGI_2 szabályozza pl. az érfali koleszterin metabolizmust is. Érelmeszesedés során az érfali símaizomsejtekben koleszterin és kolesztein-észterek halmozódnak fel, mivel a koleszterin transzportért felelős enzimek zavart szenvednek (208). A koleszterin-észterek hidrolíziséért felelős enzim, a lizoszomális sav koleszterin-észter hidroláz (ACEH) aktivitását csak a PGI_2 képes növelni, míg a koleszterin-észterek szintézisét a PGE_2 is gátolja (70). A PGI_2 összetett hatását bizonyítja, hogy gátolja az érfali LDL-influxot és a koleszterin észtereződésért felelős acil CoA: koleszterin aciltranszferáz (ACAT) enzim működését, ezáltal is csökkentve az érfal koleszterin tartalmát (119). A PGI_2 koleszterin-észter hidrolízist elősegítő hatása az adenilát-cikláz aktivitásának növelésén keresztül megy végbe. Humán atheroszklerotikus símaizomsejtekben két PGI_2 analóg cAMP-függő folyamatban növelte a koleszterin-észter metabolizmust, s a sejtek triglicerid és koleszterin tartalma lényegesen csökkent (162).

Saját laboratóriumi eredményeink szerint intravénásan adagolt PGI_2 jelentős védelmet nyújtott az érfali lipidlerakódás és plakkok kialakulásával szemben házinyúlban (116), ami morfológiailag is igazolható volt (167).

A símaizomsejt szaporodás az érfali intima felé az atheroszklerotikus folyamat korai szakaszára jellemző. Vérlemezke-eredetű növekedési faktorok, 12-lipoxigenáz termékek elősegítik az érfal ily módon történő megvastagodását. A PGI_2

analógokkal és a cAMP-vel történő kezelés gátolta a símaizomsejt proliferációt (155,162). A PGI₂ nem csak a humán vérlemezkékből, hanem a makrofágokból és az érendoteliumból is gátolta a sejtosztódást serkentő, mitogén anyagok felszabadulását (240). A PGI₂ gátolja emellett a makrofágokban a koleszterin-észterek túlzott akkumulációját is.

A véralvadás során végbemenő fibrinogén-fibrin átalakulást a PGI₂ oly módon gátolja, hogy a vérlemezkék felszínén lévő fibrinogén kötőhelyeket, így a fibrinogén-vérlemezke kölcsönhatást blokkolja *in vivo* és *in vitro* (143,144). Ezenkívül a PGI₂ a humán bőr fibroblasztokban növeli a fibrinolízist a proteáz plazminogén aktivátor serkentésén keresztül; ez a folyamat nagyban hozzájárul a PGI₂ klinikai jelentőségéhez krónikus obstruktív keringési megbetegedésekben.

Emelkedett TXA₂ szinteket és fokozott trombocita aggregációs hajlamot írtak le miokardiális infarktuson átesett betegekben (219), vazotonikus és instabil anginás megbetegedésekben (181). Akut mellkasi fájdalmakat jelző betegekben a megemelkedett TXB₂ kiválasztás diagnosztikai értékű lehet az infarktus vagy az anginás roham előrejelzésére (111). Számos kutató megerősítette, hogy a PGI₂ biztonságosan adható infúzióként közvetlenül a beteg koronária artériába, valamint, hogy instabil anginás betegekben a külsőleg adott PGI₂ jótékony hatású (221). Nehéz kezelhetősége és mellékhatásai miatt napjainkban a kutatás különböző PGI₂ analógok irányában folyik.

A diabetes mellitus, mely az érelmeszesedés egyik fontos rizikófaktorá szintén magasabb TXA₂ és alacsonyabb 6KPGF termeléssel jár együtt (29). Trombotikus trombocitopéniás purpurában (TTP) a diabeteshez hasonlóan mikroértromboembólusok képződése, és a PGI₂ csökkent produkciója a jellemző (178). Intravénás PGI₂ infúzió TTP-s betegeknél látványos javulást okozott (168).

A PGI₂ és a TXA₂ biológiai hatásainak jelentős részét a cAMP, mint másodlagos átvivő anyag (second messenger) szintjének változtatásával éri el. A PGI₂, PGE₁ vagy egyéb PGI₂ analógok (iloprost, karbaciklin) a vérlemezkék felszínén lévő specifikus receptorhoz kötődnek, mely egy guanin-nukleotidot kötő proteinhez kapcsolódik, s ez az adenilát-cikláz enzimet aktiválja. A cAMP szintjének emelkedésével a vérlemezkefunkció gátlódik, a vérlemezkék alakja megváltozik, adhéziójuk, kiválasztásuk csökken, s mind az elsődleges (primer, reverzibilis), mind a másodlagos (szekunder, irreverzibilis) aggregáció gátlódik. A vérlemezkék PGI₂-vel történő inkubálása során mindezek a hatások megfigyelhetők (199). Ha a vérlemezke aggregációt előzetesen aszpirinnel (acetil-szalicilsav, ASA) gátolták, a vérlemezkefunkciók közül csak a szekréció és a másodlagos aggregáció gátlódott. Ezért az érelmeszesedés kezelése aszpirinnel jótékony hatású, de nem akadályozza meg minden tekintetben a PGI₂ csökkenésből eredő káros folyamatok kialakulását.

A $\text{PGI}_2\text{-TXA}_2$ rendszer az előbbieken ismertetett hatásai következtében a vérlemezke-érfa kölcsönhatásokat szabályozó mechanizmust képviseli, arányuk eltolódása különböző szív- és érrendszeri zavarokhoz ill. megbetegedések kialakulásához vezethet.

1.7. PG-mérések

Az utóbbi évtizedekben nyilvánvalóvá vált, hogy a PG-ok számos fiziológiai folyamat irányításában részt vesznek, s hogy az AA-metabolizmus zavarai különféle megbetegedésekhez vezethetnek. Az ezzel kapcsolatos hipotézisek bizonyítása azért nem egyszerű, mert a PG-ok mérése biológiai mintában számos nehézséget felvet.

A PG-ok a véráramba jutva gyorsan inaktiválódnak, emiatt valószínű, hogy hatásukat a képződési helyük közelében fejtik ki. Szöveti mérések során is figyelembe kell venni, hogy a PG-ok nem tárolódnak a sejtekben, kémiai vagy mechanikai stimulus hatására viszont szintézisük ugrásszerűen megnő. Nagy biológiai hatékonyságuk miatt nyugalmi koncentrációjuk igen alacsony. Fentiek miatt a mintavétel technikája nagyon fontos mind szöveti, mind vérminta esetén. A mesterséges, *ex vivo* PG-bioszintézist meg kell gátolni: mélyhűtés, folyékony nitrogén, a PG-szintetizáló enzimek pl.: ciklooxygenáz gátlása jöhet szóba (233,250). Az endogén PG szintek nehézkes meghatározása miatt alternatív lehetőséget jelent a szövet vagy a sejt kultúra PG-termelő kapacitásának vizsgálata meghatározott idejű inkubálás után (166).

A PG-termelés a szövetekben és az érfa falban szokatlanul nagy ingadozásokat mutat, így a mintavételnek ugyanazon napszakban, és lehetőség szerint gyorsan kell történnie (64).

A vérből történő analízis mellett alternatívát jelent a vizeletvizsgálat is. A vizsgálat céljától függően a vizeletben meghatározhatók az elsődleges PG-ok - ez a vese PG-termelésére utal -, ill. a megfelelő PG-bomlástermékek, melyek a keringésben lévő PG szintekre adnak felvilágosítást. Korrekt eredményt a 24 órás, gyűjtött vizeletből történő analízis adhat, azonban ez különféle technikai, gyakorlati nehézségeket vet fel.

Az elsődleges PG-ok vizsgálatánál általában közvetlenül az alapvegyület koncentrációját határozzák meg, kiegészítve esetleg a viszonylag stabil 15-keto- ill. 6,15-diketo-13,14-dihidro-PG metabolitok mérésével (49). A PGI_2 és a TXA_2 közvetlenül csak biológiai módszerekkel mérhető, kémiai meghatározásuk stabil

hidrolízistermékük formájában (6KPGF és TXB_2) történik a keringésben, és 2,3-dinor-metabolitjaikként vagy 11-dehidro- TXB_2 -ként a vizeletben.

A PG-ok kvantitatív mérési módszerei közül leginkább elterjedt a radioimmunoassay (RIA) és a gázkromatográfiával kombinált tömegspektrometria (GC/MS).

A biológiai hatásvizsgálatot alkalmazó **bioassay** egyre inkább kiszorul a módszerek közül. Ennél a technikánál a mérés során a biológiailag aktív vegyület mennyiségét egy izolált szerv válaszreakciója révén, ismert standarddal történő összehasonlítás után lehet meghatározni. Ez a módszer vezetett számos biológiailag hatékony vegyület hatásainak megismeréséhez, a TXA_2 azonosításához (mint RCS) és a PGI_2 felfedezéséhez (159,230). Nem alkalmazható a módszer PG-metabolitok mérésére, mivel ezek gyakorlatilag biológiailag inaktívak. Ugyanakkor, míg a kémiai módszerek esetén az inaktív komponensek keresztreakciót hoznak létre, a biológiai meghatározást nem zavarják. A leginkább elterjedt módszert J.R. Vane írta le és vett részt a módszer továbbfejlesztésében (230). A vizsgálat során izolált szerveket perfundálnak az aktív komponenst tartalmazó pufferoldattal. Az adott szervet úgy kell megválasztani, hogy símaizomzata érzékeny és megfelelően specifikus legyen a vizsgálni kívánt anyagra. A specifikusságot növelni lehet karakterisztikus választ adó többféle szövet kombinálásával (kaszkád szuperfúzió). A mérés során a szövet tónusának változását rögzítik. J.R. Vane vezette be szuperfúziós folyadékként a vér használatát. Ennek során a megfelelően érzéstelenített állat vére 10-15 ml/perc sebességgel áramlik át az izolált, meghatározáshoz használt símaizomsejtszöveteken, majd visszatér egy fővénába. E módszer jelentősége, hogy a keringésben felszabadult aktív anyagok néhány másodpercen belül eléri az izolált szöveteket, így a kaszkád szuperfúziós technikával kémiaiailag instabil anyagok is meghatározhatók.

A bioassay technikával nem csak PG-ok, hanem egyéb vazoaktív anyagok, gyógyszerek is vizsgálhatók (adrenalin, noradrenalin, angiotenzin II, bradykinin stb.). Ma már bizonyított, hogy számos ún. vazoaktív anyag és gyógyszer a biológiai hatását éppen a PG-felszabadulásra ill. szintézisre kifejtett hatása révén éri el.

A PG-ok vérlemezke aggregációra kifejtett hatásán alapul a PG-ok **aggregációs mérése**. Friss vér alacsony fordulatszámú centrifugálásával nyert trombocitadús plazmában (PRP) aggregátor tulajdonságú anyag segítségével vérlemezke aggregációt hoznak létre (adenozin-difoszfát /ADP/, kollagén, AA), s az optikai denzitás változását nefelometriásan követik. A méréshez különféle típusú aggregométereket használnak, első változata az ún. Born-típusú aggregométer (19) volt, melyet azóta kétcsatornás eszközök váltottak fel. Az aktív anyagok hatására az aggregációs görbe módosulásából lehet következtetni standarddal történő összehasonlítás után (118,186,241). A módszert legelterjedtebben a PGI_2 szintjének

meghatározására használják (használták), mivel antiaggregációs hatása legalább egy nagyságrenddel nagyobb a többi PG-énál. Hátránya viszont, hogy kis szelektivitása miatt a PGI_2 szintje magasabbnak mérhető. Ezért inkább a PG szintekben bekövetkezett változások követésére szokták az aggregációs vizsgálatot alkalmazni, s a " PGI_2 -szerű anyag" szintjére ill. " PGI_2 -szerű aktivitás"-ra szokás utalni (211).

Valamely biológiai hatáson alapuló eljárás segítségével ismeretlen szerkezetű biológiailag aktív anyagok is kimutathatók. Sokszor alkalmazzák ezeket az eljárásokat az érrendszeri hatásaiban jelentős trombocita- vagy endotéleredetű növekedési ill. aktiváló faktorok vizsgálatára (pl. vérlemezke aktiváló faktor /platelet activating factor, PAF/). A biológiailag aktív anyagok felfedezésével párhuzamosan azonban fokozott gondot jelent ezen anyagok megkülönböztetése biológiai úton, mivel hatásuk azonos is lehet. (Ezen segít különféle szintézisgátlók hozzáadása vagy a kémiaiilag meghatározott PG-ok hatásának levonása a mért biológiai hatásból. Sajnos azonban ez sem mindig célszerű megoldás, mert az egyik reakcióút gátlásával a metabolizmus más reakcióutak felé tolódhat el, így annak termékei túlzottan felszaporodhatnak) (51,125).

A PG-ok mennyiségi meghatározása napjainkban szinte kizárólag kémiai módszerekkel történik.

A **GC/MS módszer** során sokkomponensű minta és bonyolult vegyületek esetén első lépésként szükséges a kémiai anyagok szétválasztása gázkromatográfián, mivel már az egyes komponensek azonosítása is problémát jelenthet a tömegspektrumok szuperpozíciója miatt. Az egyes komponensek detektálása tömegspektrometrián történik. A GC/MS kombináció nagy teljesítőképességű, kitűnő megoldást jelent. A gázkromatográfiás elválasztás által megkívánt magas hőmérsékleten azonban a PG-ok lebomlanak. Ezért először illékonyabb származékká, leggyakrabban a PG-metilészterek acetoxi-vagy metoxi-trisz-trimetilszilil származékaivá alakítják őket. A gázkromatográfiás elválasztás után a komponensek a tömegspektrométer ionforrásába jutnak, ahol a molekula tördelődik. A komponensek azonosítását és detektálását a képződött gyökök tömege alapján végzik, általában számítógépes feldolgozással.

A fenti eljárás mennyiségi értékelésénél hibát okoz, hogy az anyag egy része az oszlopon erősen adszorbeálódik és bomlik. A módszer javítására szolgál az ún. izotóphigításos módszer. Ennek lényege, hogy a vizsgált mintához nagy mennyiségű stabil izotóppal (deutériummal) jelzett PG-t adagolnak. Ez a tisztítási lépésnél ill. a detektálásnál vivőanyag és belső standard. A jelzett és a természetes PG hasonló jellemvonású, s a jelzett PG ismert kiindulási koncentrációja segítségével

a tömegspektrométerben mért két forma arányából a természetes PG eredeti koncentrációjára lehet következtetni (66).

A GC/MS módszerek területén rohamos fejlődés tapasztalható, amely szinte lehetetlenné teszi ezek részletes áttekintését. Egyebek mellett kiemelkedő jelentőségű a nagyfelbontású gázkromatográfiás negatív-ion kémiai ionizációs tömegspektrometria (HRGC/NICIMS) (236).

Természetesen a különféle technikáknál olyan PG-derivátumokat kell előállítani, melyek a kívánatos tulajdonságokkal rendelkeznek. A PGI_2 és TXA_2 hidrolitikus termékeinek, azaz a 6KPGF-nek és a TXB_2 -nek a GC/MS meghatározása a fejlett és egyre bonyolultabb módszerek ellenére sem nélkülözi az előzetes tisztítási lépést (lépéseket), amely a RIA mérést is megelőzi. Ennek oka a prosztanoidok rokon szerkezete és viszonylag nehéz elválaszthatóságuk. Leggyakoribb módja e vegyületek elkülönítésének a vékonyréteg-kromatográfia (thin-layer chromatography, TLC), és a nagynyomású folyadékkromatográfia (high-performance liquid chromatography, HPLC) (16,40). E módszerek bevezetése azonban mindenképpen a PG-veszteségeket növeli, s ezáltal a meghatározás érzékenységét csökkenti. Meg kell említeni, hogy a TLC vagy a HPLC lépést nem közvetlenül alkalmazzák a biológiai minta (plazma, vizelet) esetén - éppen a minta sokkomponensű, bonyolult összetétele miatt -, hanem még ezt megelőző, előtisztítási lépésként oldószeres vagy szilárdfázisú extrakciót szokás alkalmazni (40,236). Ez a kísérő anyagok jó részét (proteinek, egyéb lipidek, poláros anyagok) eltávolítja.

A fentiek alapján jól látható, hogy a GC/MS módszer igen műszerigényes, költséges, az utóbbit tekintve a folyamatos ráfordítások is jelentős összeget képviselnek, amellet meg lehetőségen időigényes és nehézkes. A felsorolt hátrányok miatt a PG-ok ilyen típusú meghatározása és ezen módszer klinikai alkalmazása erősen korlátozott.

A PG-ok meghatározása korántsem lehetséges - mai ismereteink szerint - túlságosan egyszerű módszerekkel, mégis az előzetes tisztítási lépéssel ill. lépésekkel kombinált **RIA meghatározás** tűnik számunkra a leghozzáférhetőbb, s kiemelkedően alkalmas eljárásnak. A RIA rendkívül érzékeny és specifikus, a telítési izotópanalitikai módszerek közé tartozik. Lényege, hogy a természetes, mintában jelenlévő és a külsőleg adagolt radioaktív izotóppal jelzett molekulák versenyeznek az antitest kötőhelyeiért. A szteroid hormonok meghatározására már jól bevált technikákat a hetvenes évek derekán kezdték el alkalmazni a PG-ok területén is. Az egyes PG-okra és/vagy metabolitjaikra (antigének) specifikus antitesteket leggyakrabban nyulak immunizálásával hozzák létre. A PG-okat előzőleg fehérjéhez (globulinhoz vagy albuminhoz) kötik, e nagyobb molekulatömegű vegyületekkel szemben megindul az ellenanyag-termelés, s az antiszérumot vérvétel útján gyűjtik. A PG-ok jelzésére

általában tríciumot vagy ^{125}I -izotópot alkalmaznak. A jó-d-jelzéshez legcélszerűbb a PG-tirozil-metilészterét előállítani, amely már alkalmas a jó-d bevitelére.

A radioimmun-meghatározás során az antiszérum a mintában levő, jelöletlen PG koncentrációjától függően köti meg a jelölt antigén molekulákat, majd a szabad, antitesthez nem kötött PG-ok eltávolítása után (csontszemes elválasztás (14,26), kicsapás, centrifugálás, szilárd fázishoz kötés) a beütésszám mérhető, és ismert PG-standardsorral felvett kalibrációs görbéről a minta PG-tartalma leolvasható (23,108,216).

A RIA nagyon érzékeny meghatározási módszer, alkalmas 10^{-13} molnyi anyag kimutatására, s fentiek szerint az egyes PG-okra nézve specifikussá tehető.

Korrekt meghatározáshoz, ha sok a zavaró komponens (vér-, vizeletminta), a RIA-nál is szükséges megelőző tisztítási lépés, amely az egyéb típusú vegyületek java részét eltávolítja (23). Különbőféle szervekből izolált szövetminták pufferes izolálása során nyert médiumokból azonban elfogadható a 6KPGF és TXB_2 közvetlen RIA mérése (45,117,153,176), bár sok esetben ilyenkor is használnak valamilyen egyszerű, szelektív tisztítási lépést. A szöveti PG-termelést sok esetben úgy követik, hogy az inkubáló pufferhez jelzett AA-t adnak, majd TLC-s felbontás után a különböző PG-ok izotóptartalmát detektálják (56,107,166).

Esetenként közvetlen (direkt) 6KPGF és TXB_2 RIA méréseket végeznek egyes szerzők vérplazmából is, az ilyen típusú vizsgálatok - főként állatkísérletekben - különféle farmakológiai hatású anyagok kipróbálására történnek (117,136).

Mivel a TXB_2 szintézisért a vérben lévő vérlemezkék a felelősek, a szérum meghatározott ideig történő inkubálása után visszamért TXB_2 szintből következtetések vonhatók le a trombociták TXB_2 -termelő képességéről, azaz a vérlemezke aktivitásról (28,232). A szérum inkubálása 37°C -on és általában 60 percig történik. Ez idő alatt a TXB_2 szint a vérben kb. három nagyságrenddel (pg/ml-ről ng/ml koncentrációig nő, így a RIA meghatározáshoz a minta megfelelő hígítása szükséges.

A plazma 6KPGF és TXB_2 szintek meghatározására irányuló igény növekedésével egyre többféle, RIA-t megelőző szelektív extrakciós lépés kidolgozására került sor. Ezek első, legegyszerűbb fajtája a különböző **szerves oldószerekkel végzett extrakció**. Ennek lényege, hogy a meghatározott módon gyűjtött plazmát adott térfogatú oldószerral rázzák ki, általában több soron, majd a szerves fázist gyűjtik és bepárolják. Az extrakció leggyakoribb oldószere a dietiléter (95,196) és az etilacetát (27,233,249) vagy különböző oldószerverkeverékek (47,191), az oldószer mennyisége általában a plazmatérfogat 3-5-szöröse, s a kirázást 3-4-szer ismétlik. A PG-ok jó hatásfokkal gyűlnek össze a szerves fázisban, majd az oldószer elpárologtatása után az anyagot pufferben visszaoldják, s a RIA mérés ezután közvetlenül elvégezhető. Az oldószeres szétválasztási módszerek egyszerűek,

azonban főként a dietiléteres extrakciós módszer nem elég szelektív, a mért 6KPGF szintje igen magas, átlagértéke plazmában gyakran 200 pg/ml feletti (196,233). Hátránya még az eljárásnak, hogy az extrakciós hatások a mérési tartományon belül változó lehet (249).

A 6KPGF és TXB_2 plazmaszintjeinek mérése a **szilárdfázisú extrakciós eljárások** bevezetésével nagy lépést tett a gyors és megbízható meghatározás felé. A 18-as szénláncú szénhidrogén-láncokkal (**C₁₈**) apolárosított szilika fázis bevezetése a PG analízisbe W.S. Powell nevéhez fűződik (175). Az azóta kidolgozott eljárások megoszlanak az egyes tisztítási lépések számában és minőségében, az eluáló szer milyenségében, fő vonalaiban azonban egységesek. Az alvadésgátlót és ciklooxygenáz-gátló szert tartalmazó plazmát általában pH 3-ra savanyítják, majd megfelelően előkezelt oszlopra viszik fel. Szelektív oldószeres mosásokkal a kísérő anyagokat eltávolítják (víz (124,163), 10-15 %-os alkohol (35), benzol), majd a PG-okat eluálják közepesen poláros oldószerekkel, metil-formiáttal, etanollal vagy etilacetáttal (35,163). Az oldószer bepárlása után a pufferben feloldott anyag RIA-val mérhető. Az eljárásnak kisebb az oldószerigénye, s a gyűjtött fázis tisztább, könnyebben kezelhető. A meghatározott 6KPGF szintek e módszerrel alacsonyabbak. Irodalmi adatok támasztják alá a módszer megbízhatóságát, jó hatásfokát és precizitását (35, 124).

Itt jegyzem meg, hogy a RIA mellett alternatív megoldást jelent, az antitest-antigén reakció specifikusságának és érzékenységének megtartásával, a nem izotópjelölést alkalmazó kemilumineszcenciás immunoassay (CIA), ahol fényt kibocsátó marker anyagot kötnek a PG-hez (237) és az enzimes immunmeghatározások (EIA és ELISA), ahol enzimfehérjét alkalmaznak az adott PG jelölésére (39,247). Ezek a módszerek kiküszöbölik a sugárzó izotópokkal való munka nehézségeit (beszerzés, szigorúan szabályozott munkafeltételek) és a RIA azon hátrányát, hogy az izotópok felezési idejével arányosan a teszt alkalmazhatósága csökken.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A vérminták gyűjtése

A módszer beállításához illetve az egészséges és az érrendszeri megbetegedések szempontjából veszélyeztetett helyzetben lévő önkéntesek plazma 6KPGF és TXB₂ szintjének vizsgálata során több száz meghatározás történt. A vérminták zömének gyűjtése dr. Mihai Klára főorvos, kandidátus (Bács-Kiskun Megyei Önkormányzat Kórháza, majd 1992 óta) Városi Tisztifőorvos (Kecskemét) vezetésével történt, a kardiovaszkuláris betegségek elsődleges megelőzése érdekében kórházunkban folyó munka részeként. A vizsgálatokat a SZOTE etikai bizottsága engedélyezte (Eng.sz.:15-24/88).

A kontroll értékek gyűjtése során a szülők tájékozott beleegyezése után, a gyermekosztályra kivizsgálásra felvett vagy kontrollra jelentkező és egészségesnek talált 3-14 éves gyermekek, az iskolaorvosi hálózat segítségével az önként jelentkező 15-18 évesek közül kiválogatott kamaszkorúak, és az önkéntes 19-20 évesek plazmamintáit dolgoztuk fel. Kontrollnak minősültek azok, akik testvéreiben, szüleiben, azok testvéreiben és nagyszüleiben (első és másodfokú rokonaiban) a vizsgálat időpontjáig érelmeszesedéssel kapcsolatos megbetegedés nem fordult elő, esetleg néhány gyermek esetében időskori (65 év feletti) magasvérnyomás vagy cukorbetegség fordult elő az egyik nagyszülőnél (összesen 85 leány és 53 fiú, átlagéletkoruk (+/-SD) 14,5+/-3,7 év ill. 13,7+/-4,1 év).

A beteganyag gyűjtése a fiatalkori infarktusos családok folyamatos behívása során történt, a család tagjai a vizsgálaton jórészt egyszerre jelentek meg. Fiatalkori infarktusos szülőnek minősült az a szülő, főként apa, aki 45 éves kora előtt a WHO kritériumai szerint egyértelműen akut miokardiális infarktuson esett át. A család 3-20 éves korú tagjait tekintettük az érrendszeri megbetegedés szempontjából veszélyeztetettnek (összesen 77 leány és 65 fiú, átlagéletkoruk 13,6+/-4,0 és 12,6+/-4,3 év). Az egyszerűség kedvéért a családi megbetegedés halmozódása szerint nem végeztem felbontást.

A vizsgálatban azon gyermekek és fiatalok vérmintáit dolgoztuk fel, akik nem dohányoztak, alkoholt nem fogyasztottak, gyógyszert - beleértve a hormonális fogamzásgátlókat - nem szedtek.

A vérminták gyűjtése 1987 óta folyamatos volt.

A felnőtt átlaglakosságból 78 látszólag egészséges 20-74 éves korú (átlag 36,5 $\pm$ 17,6 év) férfi és nő (41 nő és 37 férfi) plazma TXB₂ és 6KPGF szintjét vettem össze az összkoleszterin, a HDL és az AI szinttel. A koleszterin szint 41 %-ban 6,0 mmol/l vagy annál magasabb volt. A vizsgálati anyag gyűjtése ebben az esetben is folyamatos volt.

A Kiskunfélegyházi Városi Kórházban szintén standardizált körülmények közt folyt mintagyűjtés 11 menopauzában lévő nő és 19 férfi részvételével (40-74 évesek, átlag 57,8 $\pm$ 9,3 év). Mindannyian magas kiindulási koleszterin szinttel rendelkeztek (5,6-9,3 mmol/l), azonban a hiperlipoproteinémia klinikai tüneteit egyikük sem mutatta. A dr. Joó Imre (Laboratóriumi Osztály) vezetésével végzett lipidprofil és trombocitafunkció vizsgálat egy részét jelentették a laboratóriumunkban elvégzett plazma és szérum 6KPGF és TXB₂ szint meghatározások.

A vizsgálatban résztvevők kéthetes kimosási periódus után 3 hétig fogyasztottak busakonzervet (heti 1000 ill. 1800 g), melyben az esszenciális zsírsavtartalom napi 1,2 g EPA-nak és 0,6 g DHA fogyasztásnak felelt meg, ill. 9 esetben napi 2,2 g EPA és 1,1 g DHA-nak. A két különböző mennyiség hatása a laboreredményekre ilyen időtartam alatt nem különbözött lényegesen egymástól.

Az önkéntesek a vizsgálat ideje alatt (2 hét kimosási periódus, 3 hét halfogyasztás, 2 hét kontroll időszak) életvitelükön (diéta, fizikai aktivitás) nem változtattak, lipid- vagy PG metabolizmust befolyásoló gyógyszert nem szedtek.

A vizsgálat a SZOTE etikai bizottságának engedélyével folyt, mellyel 1988-ban hozzájárult a rendellenes lipidszinteket mutató egyének kísérletes busa(olaj) kezeléséhez. A résztvevők szerették a halat és szívesen vettek részt a vizsgálatban.

2.2. Vervétel

A vervétel minden esetben reggel, éjszakai pihenés után éhgyomorra, 15 percig tartó nyugalmi helyzet után történt könyökvénából, mindig azonos időben és körülmények között. A vervétel során mindig azonos típusú 18G2 (Medicor) tűt használtunk.

A vervételt és a vér kezelését egy-egy vizsgálatsorozaton belül lehetőség szerint ugyanaz a személy végezte.

A PG-analízishez a frissen és traumamentesen levett vérhez 7,4 x 10⁻² mol (2,5 %) Na₂-EDTA alvadásgátlót és 2,8 x 10⁻⁵ mol (0,001 %) indometacin ciklooxigenáz-gátlót tartalmazó oldatot adtunk 1:9 térfogatarányban. Egy adott minta

6KPGF és TXB_2 meghatározásához általában 0,5 ml fenti oldathoz 4,5 ml vénás vért szívtunk.

A vérminta azonnali, de legkésőbb 8 percen belüli (ekkor is 4°C -on tartva) 1200 g-n, 4°C -on történő 10 perces centrifugálása után a plazmát szeparáltuk, majd a felhasználásig -25°C -on tároltuk, maximum 1 hónapig.

Az összkoleszterin szint és a HDL-koleszterin frakció (nátriumfoszforsulfátos/magnézium-kloridos lecsapás után) meghatározása szérumból történt.

A busakísérletben a trombocitaszám méréshez EDTA-val alvadásgátolt plazmát használtak.

2.3. Anyagok

A humán plazmák extrakciója során felhasznált oldószerek: abszolút etilalkohol, dietiléter, etilacetát, petroléter ($40-70$ ill. $30-40^\circ\text{C}$) Reanal készítmények voltak.

A szilárdfázisú extrakciónál háromféle C_{18} -szilika oszlop került összehasonlításra: SEP-PAK (Waters Associates, Milford, USA, MA01757), SIGMA C_{18} HPLC szorbens (SIGMA, USA, H-8261, $15-40\ \mu\text{m}$) és a magyar gyártmányú SAMPLEX C_{18} (Bioszeparációs Technikai GMK, Budapest, Budafok, $50-100\ \mu\text{m}$ részecskeméret, 12 % széntartalom, 250 mg töltet).

A plazmák PG-mentesítése csontszenezéssel történt (Norit A, Serva, Heidelberg).

A szérum összkoleszterin és HDL-koleszterin meghatározására enzimatiszus módszert alkalmaztunk (SERA-PAK, Reanal és CHOD-PAP, Boehringer/Mannheim).

Felhasznált oldatok:

- $7,4 \times 10^{-2}$ mol $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ + $2,8 \times 10^{-5}$ mol indometacin oldat
- 2 M citromsav oldat
- 0,05 M kénsav oldat
- 10 %-os etilalkohol

2.4. ^{125}I -6-Keto-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ RIA kit

A ^{125}I -6KPGF RIA kit (kódszám: RK-16, Izinta, MTA Izotóp Intézet, Budapest) 100 db tesztcsőre elegendő anyagot tartalmaz. A gyártó szerint a kit egyenértékű az

Amersham (Buckinghamshire, Anglia) által gyártott ^{125}I -6KPGF tesztel. A RIA összeállítását és a mérést a gyártó utasításai szerint végeztük, melyet az alábbiakban részletezek.

A teszt komponensei:

- puffer: a gyári puffer koncentrátumot 80 ml d. vízzel hígítva az elkészült oldat 50 mmol-os foszfátpuffer (pH 6,8)
- 6KPGF standard: a liofilizált standardot 2 ml d. vízben oldva a törzsoldat 4 ng/ml 6KPGF-t tartalmaz. A törzsoldat 0,5 ml-ének feles pufferes tovahígításával készültek a 200-1,5 pg/cső 6KPGF tartalmú standardok a kalibrációs görbe felvételéhez
- 6KPGF antiszérum: 10 ml vízben oldva készül a liofilizált nyúlszérum pufferes oldata
- 6KPGF- ^{125}I -tirozil-metilészter (tracer): kevesebb, mint 200 kBq (5,4 μCi) ^{125}I -izotópot tartalmazó antigén 50 %-os alkoholos oldata, 10 ml pufferrel hígítandó
- dextránhoz kötött csontszén, második antitest: 1 % Norit A-t és 0,5 % dextrán T-70-et tartalmazó 10 mmol-os (pH 6,8) foszfátpuffer. A dextránnal fedett csontszén az antiszérumhoz nem kötött, szabad antigént távolítja el.

A feloldott reagensek 2-8 °C-on tárolhatók egy hónapig.

A mérés összeállítását az 1. Táblázat mutatja, a jelölt mennyiségek mikroliterben értendők.

1. Táblázat

	Puffer	Standard	Minta	Antiszérum	Tracer
T	300	-	-	100	100
NSB	400	-	-	-	100
B ₀	300	-	-	100	100
St	200	100	-	100	100
Minta	200	-	100	100	100

A rendszer összeállítása után az összerázott csöveket 4 °C-on, 18-22 órán keresztül inkubáltuk, majd a teljes beütést (T) tartalmazó csövekhez 300 μl puffert, az összes többi csőbe 300 μl csontszén oldatot mértünk. Az összerázott csöveket 4 °C-on, 10 percig 3000 g-n centrifugáltuk.

500-500 μl tiszta felülúszó radioaktivitását detektáltuk.

A RIA kiértékelése:

1. Adott minta két vagy három párhuzamos mérésének beütésszámait átlagoltuk

2. Az átlagokból kivontuk a háttér (NSB) átlagos értékét, ez a B, ill. a zérus standardnál a B_0
3. A normalizált százalékos kötések kiszámítása: $B/B_0 \%$ ($B/B_0 \cdot 100$)
4. A $B/B_0 \%$ ábrázolása a standard koncentrációjának függvényében (a koncentráció logaritmikus osztású tengelyű), az összekötött pontok tipikusan S alakú, szigmoid görbét adnak
5. Az ismeretlen plazmaminták koncentrációjának leolvasása a kalibrációs görbéről
6. A minták leolvasott pg/100 μ l koncentrációinak visszaszámolása az eredeti plazma koncentrációra. Ennek menete TXB_2 koncentrációknál: a leolvasott koncentráció szorzása 10/9-cel a vér vérvételkor történt hígulását figyelembe véve, szorzás 10-zel a 100 μ l-ről 1 ml-re való áttérés miatt, és osztás a hatásfokkal az extrakciós veszteségek figyelembevétele miatt. A 6KPGF méréseknél alkalmazott, legtöbbször ötszörös dúsítás miatt az előzőeken kívül ötös osztást is végeztünk, s így a plazma eredeti prosztanoid koncentrációit pg/ml egységben kaptuk meg.

Megjegyzések:

1. T az összradioaktivitást jelzi az adott rendszerben, a tracer "frissességére" enged következtetni. Az NSB a nem specifikus adszorpcióból és az elválasztás tökéletlenségéből adódik, B_0 pedig a jelzett antigén maximális kötődését mutatja jelzetlen antigén távollétében. Az NSB és a B_0 pontos meghatározása nagyon lényeges, a számítások ezek segítségével folynak.
2. A direkt és az extrakciós RIA méréseinknél az egyes csövekben a rendszer összeállításakor a T, NSB, B_0 és St csövekben a puffer mennyiségét 100-100 μ l-rel csökkentettük, s helyette ugyanennyi "0" plazmát (lásd később) vagy "0" extraktumot mértünk be.
3. A 6KPGF antiszérum keresztkötés értékei egyéb PG-okra (50 %-os B/B_0 értékek eléréséhez szükséges PG-koncentrációk alapján): PGF_{2a} 0,8 %, PGE_2 1,4 %, PGF_{1a} 2,0 % és PGE_1 1,2 %.

2.5. ^{125}I Tromboxán B_2 RIA kit

A ^{125}I - TXB_2 RIA kit (kódszám: RK-17, Izinta, MTA Izotóp Intézet, Budapest) 100 db tesztcsőre elegendő anyagot tartalmaz.

Komponensek:

- TXB₂ puffer: a puffer koncentrátumot vízzel 100 ml-re kiegészítve az elkészült oldat 0,1 % zselatin és 0,01 % mertiolát tartósítószer tartalmú 50 mmol-os foszfát puffer (pH 7,3).
- TXB₂ standard: az 1 ml vízzel feloldott liofilizált standard 8 ng/ml TXB₂-t tartalmaz TXB₂ pufferes közegben. A törzsoldat feles tovahígításával (pufferrel) készültek a kalibrációs görbe felvételéhez a 400-1,5 pg/cső standard oldatok
- TXB₂ antiszérum: liofilizált immunizált nyúl antitest pufferes oldata
- ¹²⁵I-TXB₂ metil-tirozinát (tracer): megközelítőleg 74 kBq (2 µCi) sugárzású izotóp alkoholos oldata, pufferrel hígítandó
- Dextránnal fedett csontszén szuszpenzió: 1 % Norit A-t és 0,5 % Dextrán T-70-et tartalmazó 10 mmolos foszfát puffer (pH 7,3).

A feloldott vagy hígított komponensek 4 °C-on tárolva legalább egy hónapig stabilak.

A TXB₂ RIA összeállítása és a minták további kezelése megegyező a 6KPGF teszténél leírottakkal.

Megjegyzések:

Megegyeznek a 6KPGF mérésnél rögzítettekkel.

A TXB₂ antiszérum keresztkötés értékei egyéb PG-okra: PGD₂ 2,5 %; PGF_{2a} 0,4 %; PGE₂ 0,3 %; 6KPGF 0,2 %; PGE₁, PGF_{1a}, PGA₂ és 13,14-DH-15-K-PGF_{2a} <0,1 %; 13,14-DH-15-K-PGE₂, 6KPGE₁, 13,14-DH-6,15-DK- PGF_{2a} és AA < 0,01 %.

2.6. Eszközök és műszerek

- Hűtő centrifuga (K23 típus, Janetzki, Lipcse)
- Mágneses keverő (MM6 típus, Poznan), kémcsőkeverő (5164 típus, Kutesz, Budapest)
- Az oldószerek bepárlásához esetenként N₂-áram, rotációs filmbepárló (Rotadest, Kutesz, Budapest), legtöbbször pedig vákumhíd (speciális, egyszerre 16 minta bepárlása lehetséges)
- Szcintillációs gamma sugár detektor: automatikus mintaváltós, 100 mérőhelyes készülék (NZ-310 típus, Gamma Művek, Budapest)
- Folyadékszscintillációs (lágy béta sugárzás mérő) detektor: ³H mérésére az MTA Izotóp Intézetében TRI-CARB típusú spektrométerrel (Model 3255, Packard)
- Sejtszámláló készülék trombocitaszámláláshoz (PS5 típus, Medicor)
- Személyi számítógép (Commodore 64) és nyomtató (GX-80, Epson).



2.7. Módszerek

2.7.1. A plazma PG-mentesítése

A PG-mentesítéshez kevert plazmát használtam, hogy a mérések során a háttér átlagos értékű legyen. A mentesítést 0,1 %, 0,3 % és 1 % Norit A-val 0-10 perc időtartamban végeztem, folyamatos keverés közben, majd 10 perces 3000 g-s centrifugálás után az oldat tisztáját gyűjtöttük, szükség esetén szűrtük.

Az 1 % Norit A-val történő 10 perces mentesítés volt megfelelő a PG-mentes vagy más szóval "0" plazma(extraktum) előállítására háttérként a minták mérése során.

2.7.2. Kontroll plazmák készítése

Az ismert koncentrációjú 6KPGF és TXB_2 kontroll plazmák határozott mennyiségű standard oldatok PG-mentes plazmával történő hígításával jöttek létre. A standard törzsoldatok általában a gyári liofilizált 6KPGF ill. TXB_2 standard "0" plazmás oldásával készültek, kezdetben pedig szilárd 6KPGF segítségével, utóbbit azonban nagyon nehéz volt pontosan bemérni és sokszorosan hígítani az igen kis koncentrációtartomány eléréséhez. Az ilyen módon készült kontroll plazma törzsoldatok koncentrációja rendre 400, 800 és 500 pg/100 μl volt, s általában feles PG-mentes plazmás tovahígítással kaptuk a további kontroll plazmákat.

2.7.3. Közvetlen / Direkt RIA mérés

A 6KPGF és a TXB_2 mérés során a RIA-ban a standard görbét 100-100 μl "0" plazma háttérében vettem fel, s a mintákból is ennyit mértem be. Egyes kezdeti 6KPGF direkt meghatározásoknál 200, 300 vagy 500 μl PG-mentes plazmát és ugyanannyi mintát alkalmaztam a mérendő PG-koncentrációk növelése céljából. 500 μl "0" plazma és minta bevitele esetén az antiszérumot kétszeres töménységben

vittem be, s az egyes csövekben a szokásos 500 µl végtérfogat helyett a RIA pufferrel 800 µl-t hoztam létre.

TXB₂ mérésnél a görbe erős torzulása miatt a kalibrációs görbét csak 100 µl "0" plazma jelenlétében vettem fel.

Közvetlen/direkt meghatározást 40 humán plazmaminta esetén végeztünk 6KPGF-re és 23 mintán TXB₂-re.

2.7.4. Oldószeres extrakció etilacetáttal

Az eljárás O. Ylikorkala és L. Viinikka és mtsaik (233,247) 1981-ben leközölt módszere alapján történt.

Az extrakció menete:

1. 1 ml plazma savanyítása 80 µl 2 M citromsavval pH 4-4,5-re
2. 3 x 3 ml etilacetátos extrakció, a szerves fázist gyűjtöttük
3. A plazmát végül eldobtuk
4. Az etilacetátos oldat extrakciója 2 x 1 ml d. vízzel, a vizes fázis előntése
5. Az etilacetát bepárlása vákumhídon 37 °C-os vízfürdőben. Vízcseppek visszamaradása esetén 1 ml abszolút etanol hozzáadás és ismételt bepárlás
6. A száraz extrakciós maradék visszaoldása 1 ml 6KPGF RIA pufferben
7. Későbbi felhasználás esetén az oldat tárolása -25 °C-on.

Az extrakció tesztelésére 16, 31, 62 és 125 pg-os kontroll plazmák készültek.

2.7.5. Extrakció dietiléterrel

Az extrakció menete analóg az Izinta ³H-prostaglandin PGF_{2a} RIA kitjéhez mellékelt tájékoztatóban közölt oldószeres mintaelőkészítési módszerrel.

Az extrakció menete:

1. 1 ml megfelelően levett plazma savanyítása 0,1 ml 2 M citromsavval pH 3-ra
2. Extrakció 5 ml petroléterrel a neutrális lipidek eltávolítására, előntjük
3. Plazma extrakció 5 ml dietiléterrel a PG-ok kinyerésére, rázás, a vizes fázis előntése
4. A hab eltávolítására az éteres fázist 3 x 1 ml d. vízzel mostuk, vizes részt előntöttük
5. Az éter bepárlása rotációs filmbepárlón ill. vákumhídon, víz visszamaradása esetén éter vagy etanol hozzáadás, ismételt bepárlással

6. A plazma visszaoldása 6KPGF mérésnél 0,5 ml 6KPGF pufferben, TXB₂ méréshez visszahígítás TXB₂ pufferrel az eredeti térfogat szerint, szükség esetén az oldat tárolása -25 °C-on.

Az extrakciót 15-500 pg/100 µl koncentrációjú kontroll plazmákon (hatásfok vizsgálat) és 15 db ismeretlen mintán (mérhetőség vizsgálat) végeztem el 6KPGF mérésnél, ill. 10 és 100 pg-os kontroll plazmákon (hatásfok) TXB₂ mérésnél.

Az extrakció vizsgálata és minőségellenőrzése az Izotóp Intézetben történt, a TXB₂ extrakciót csak röviden vizsgáltam ³H-TXB₂ izotóptartalmú plazmákon, mert az a (147) irodalom alapján ismert volt.

2.7.6. Szilárfázisú extrakció C₁₈ oszlopon

A módszer W. S. Powell (175) és N. Maurin (124) illetve több hasonló leközölt eljárás kombinálásával készült, sajátosan alkalmazva a laboratóriumunk lehetőségeire.

A C₁₈-szénláncokkal apolárosított szilika fázisok közül a Sigma töltetet legelőször oszloppá alakítottam (üres fecskendőben alul-fölül üvegszűrővel ellátva), majd a Sigma és a Samplex oszlopból használat előtt patront kellett készíteni. Ez úgy történt, hogy az oszlop felső végét kifűrt műanyagdugóval láttam el, melybe a 10 ml-es műanyag fecskendő vége éppen megszorult és jól zárt. A Sep-Pak oszlop gyárilag használatra kész volt.

Az extrakció menete:

1. 1-2 ml plazma savanyítása egytized térfogatú 2 M-os citromsavval pH 3-ra
2. A savanyított plazma kétszeri, lassú átnyomása az oszlopon 10 ml-es fecskendőn keresztül
3. Az oszlop mosása 6 ml d. vízzel a poláros anyagok, nagy molekulák eltávolítására
4. Mosás 6 ml 10 %-os etanollal a poláros lipidek, foszfolipidek eltávolítása céljából
5. Szelektív mosás ^{6 µl} petroléterrel (a 30-40 és a 40-70 °C-os párlat is megfelelő) a nyíltláncú monohidroxi zsírsavak és a neutrális lipidek eltávolítására
6. A prosztanoidok elúciója (lassan) az oszlopról 8 ml etilacetáttal
7. Az etilacetát bepárlása (főként) vákumhídon vagy N₂-áramban
8. Az extraktum visszaoldása RIA pufferben, a minták esetleges tárolása mérésig -25 °C-on.

Megjegyzések:

1. A C18 oszlopokat minden használat előtt regenerálni kellett: az előkezelés 6-8 ml abszolút etanolos, majd 6-8 ml d. vizes mosással történt. A többedszer (négyyszer) használt oszlopokról a denaturált fehérjéket is eltávolítottuk: az előbbi előkezelés után 6 ml 0,05 M kénsavas és 6 ml d. vizes mosást végezve. Az oszlopokat a használatok között a mosó abszolút alkoholban tároltuk.
2. Kezdetben néhány esetben a plazma savanyítás nélkül került az oszlopra, további kezelése analóg volt.
3. Egyes esetekben a PG-elúcióhoz etilacetát helyett abszolút etanolt használtam a határfok változásának vizsgálatára.
4. 6KPGF mérésnél a pufferes visszaoldás során esetenként 1-, 2-, legtöbbször pedig 5-szörös dúsítás történt, majd ezt a 6KPGF pufferes oldatot hígítottuk vissza TXB₂ méréshez TXB₂ pufferrel az eredeti plazmatérfogatra.

2.7.7. Módszerek a szilárdfázisú extrakció és a RIA minőségellenőrzésére

A **C18 extrakció egyes lépéseinek vizsgálatához** első közelítésben jelzett 6KPGF és TXB₂ antigéneket használtam. Mindhárom típusú szilárdfázison vizsgáltam a 6KPGF kötődését (semleges és savanyított plazmával is). Ehhez ³H-6KPGF-t (Izinta, Budapest) és ¹²⁵I-6KPGF-t alkalmaztam jelzőanyagként.

³H-6KPGF tartalmú plazma készítése: 5 ml szokásos módon gyűjtött plazma + 50 µl ³H-6KPGF (20 µCi). A jelzett plazma ill. az extrakció egyes fázisaiban lejövő frakciók 100-100 µl-éből, 10-10 ml szcintillációs koktél (LumaGel) hozzáadása után, mértük az aktivitásokat.

¹²⁵I-6KPGF tartalmú plazma készítése: 4 ml plazmához 0,5 ml 6KPGF RIA tracert adtam, s ezt extraháltam 2 párhuzamos mérésben. A beütésszám mérések során 0,5-1 ml oszlopról lejövő oldat aktivitását határoztuk meg, s ebből következtettem az adott teljes fázis izotóptartalmára.

A TXB₂ kötődését és távozását az egyes fázisokban a 6KPGF-hez hasonlóan teszteltem ¹²⁵I-TXB₂ tracert tartalmazó plazma segítségével.

A **RIA paraméterei** változtak a PG-mentes plazmaextraktum háttérében. A vizsgált paraméterek a következők voltak: Bo/T érték, NSB % (NSB/Bo %), IC₅₀ (50 %-os kötődésnek megfelelő antigén koncentráció). A Bo/T érték 33-50 % között, az NSB % 0-5 % között ideális. Végleges értéküket 15 méréssorozat eredményeinek átlagaként adtam meg.

Az **oszlop kapacitásának** meghatározására a felvitt plazma mennyiségét 1-10 ml között változtattuk (új oszlopokon), illetve az oszlopot 1-7 esetben használtuk ugyanazzal a plazmával (2-2 ml felvitele), s mindegyik esetben meghatároztuk a PG szinteket.

Az **extrakció hatásfokának vizsgálata** során az előzőekben leírt kontroll plazmák visszanyerését vizsgáltuk: a RIA-val mért és a bevitt PG koncentrációk hányadosának százszorosa adta a hatásfokot.

A több, 8-13 méréssorozatban tesztelt kontroll plazmák (melyek ellenőrző mintákként felfoghatók) mért szintjéből számítottam a vizsgálatok közötti, ún. **külső variációs koefficiens** vagy interassay variation-t ($SD/\text{átlag} \%$). A kontroll plazmák koncentráció tartománya 6KPGF mérésnél 3,1-25, TXB₂-nél 6,2-100 pg/100 µl volt. Mivel a kontroll plazmák eikozanoid tartalma mélyhűtött tárolás közben is változik, és PG-méréseink hatásfokának ellenőrzése folyamatos volt, természetesen a kontroll plazmák "0" plazma komponense mindig változott, legtöbbször frissen készült. Az ebből eredő hiba így a mért külső variációs koefficiens értékét növelte.

Ugyanazon minta méréssorozaton belüli több párhuzamos méréséből számítható a **belső variációs koefficiens** vagy az intraassay variation ($SD/\text{átlag} \%$). Értéke általában 10 % alatt fogadható el, s a méréstartomány 3, alsó, középső és felső szakaszán szokás megadni. A vizsgálatot 3 különböző koncentrációjú minta 5-5 oszlopon történt extrakciója, s duplikát RIA mérése alapján végeztem el mind a 6KPGF, mind a TXB₂ mérésnél - és mindezt két méréssorozatban.

Alkalmazott módszerünknel az intra- és interassay variáció nem csak a RIA méréstechnika hibájából adódott, hanem az extrakciós lépés folytán fellépő pontatlanságok és technikai hibák is benne foglaltattak.

Azt, hogy az extrakció lépései során vittünk-e be a minta PG-tartalmán kívül olyan anyagot, amely a RIA-ban mért koncentrációkat megemeli, a "vak", azaz a **"procedure blank"** vizsgálata adta meg. Ehhez 6KPGF és TXB₂ puffert extraháltunk a minták kezelésével egyező módon 3-3 C18 oszlopon, majd az puffer extraktumot RIA-val mértük.

Adott minta három párhuzamos RIA mérése adott felvilágosítást a **RIA pontosságára** (precision). A bemérés (pipettázás), a háttér (pl. a mérőcső háttére) és a radioaktivitás detektálás véletlen hibáinak a nagyságára adott felvilágosítást. A RIA méréseknél általában 1-6 % között van, s a méréstartományon belül nagysága változó. A **precízióprofil** a teljes méréstartományban felvettem kb. 150-150 db 6KPGF és TXB₂ minta párhuzamos értékeinek szórása segítségével ($cv \% = SD / \text{átlag} * 100$). A precízióprofil a koncentráció tartomány alsó és felső részén megemelkedik. Irodalmilag a 6 % körüli cv % még elfogadható, a **méréstartományt** a 10 %-nál kisebb cv %-ok tartománya adja meg.

A módszer **érzékenységét** (kimutathatósági határát, detection limit) a B_0 érték szórásának kétszereséhez tartozó koncentrációként adtam meg, 15 mérőssorozat alapján.

Megbízhatóság (accuracy): magában foglalja a pontosságot és a torzítást, azaz a mért érték eltérését a "valódi" koncentrációtól. A megbízhatósági vizsgálaton belül gyári kontroll szérum hiányában a módszer linearitásának és paralellitásának vizsgálatát végeztük el.

Linearitás vizsgálat: ismeretlen PG-tartalmú kevert alapplazmához különböző, ismert mennyiségű 6KPGF és TXB_2 standardot adtunk (6KPGF mérésnél 3 esetben 50-100-150-200 ill. egy esetben 160-320-640 pg/ml-t, TXB_2 mérésnél 3 sorozatban 125-250-500-1000 és 1 esetben 100-500-1000 pg/ml-t). A bevitt koncentráció függvényében ábrázolhatók a mért koncentrációk, s ha a függvényt pontokon át húzható egyenes, melynek meredeksége 1,00, akkor az eljárás megbízható és az antiszérummal interferáló anyagok mennyisége a mintában elhanyagolható. A tengelymetszet az alapplazma PG-tartalmát adja meg. Négy mérőssorozat átlagaként adtam meg a meredekség értékét.

Paralellitás vizsgálat: Az extrahált kevert plazmaminta 1:2, 1:3, 1:5 és 1:10-szeres pufferes hígításával készült oldatokban is meghatároztuk a PG-tartalmat (megfelelően hígított "0" extraktum háttérű kalibrációs görbéről leolvasva).

A 6KPGF és TXB_2 szinteknek az eredeti és a hígított mintákban a hígítással való korrigálás után meg kell egyezniük a módszer belső variációs koefficiensén belül, ha a módszer megbízható. A paralellitás vizsgálatot 2-2 mintánál végeztük el.

A minőségellenőrzéshez a 23, 108, 216 és egyéb irodalmak módszertani részei adtak segítséget.

2.8. Statisztikai paraméterek

Az összeállítás a (92,71) irodalmak felhasználásával történt.

a. Átlag / számtani közép

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

x_i = x aktuális értéke

n = esetszám

b. Szórás / standard deviáció

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{Q}{n - 1}}$$

c. Négyzetösszeg / kvadrátikus

$$Q_x = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

d. Szórásnégyzet / variancia

$$V = (SD)^2 = \frac{Q}{n - 1}$$

e. Közepes szórás / standard error

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

f. Variációs együttható / relatív szórás

$$cv \% = \frac{SD}{\bar{x}} * 100$$

g. Student féle t-teszt

Két csoport közötti eltérés vizsgálatára normális eloszlású változó esetén

A közös szórás

$$s = \sqrt{\frac{Q_1 + Q_2}{n_1 + n_2 - 2}}; \quad t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} * \frac{\sqrt{n_1 * n_2}}{n_1 + n_2}$$

A t értékhez tartozó valószínűségi szint (p) adott szabadsági foknál ($n_1 + n_2 - 2$) t-táblázatból (92) kikereshető. Két csoport közötti eltérés lényegesnek tekinthető, ha $p < 0,05$ (szignifikancia szint).

h. Lineáris regresszió

A regressziós egyenes $y = a + bx$ alakú, ahol

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(x_i - \bar{x})^2} = \frac{Q_{xy}}{Q_x}$$

és $a = \bar{y} - b\bar{x}$

i. Korrelációs együttható

$$r = \frac{SD_{xy}}{SD_x * SD_y} = \frac{Q_{xy}}{Q_x * Q_y}$$

j. Atherogén index / Klimov formula

Az atherogén és antiatherogén koleszterin-frakciók arányát adja meg
össz-K - HDL-K

$$AI = \frac{\text{össz-K} - \text{HDL-K}}{\text{HDL-K}} \quad K = \text{koleszterin}$$

Az eredmények értékelésénél felhasznált Commodore 64 gépre írt programok:

- TT próba
- lineáris regr.

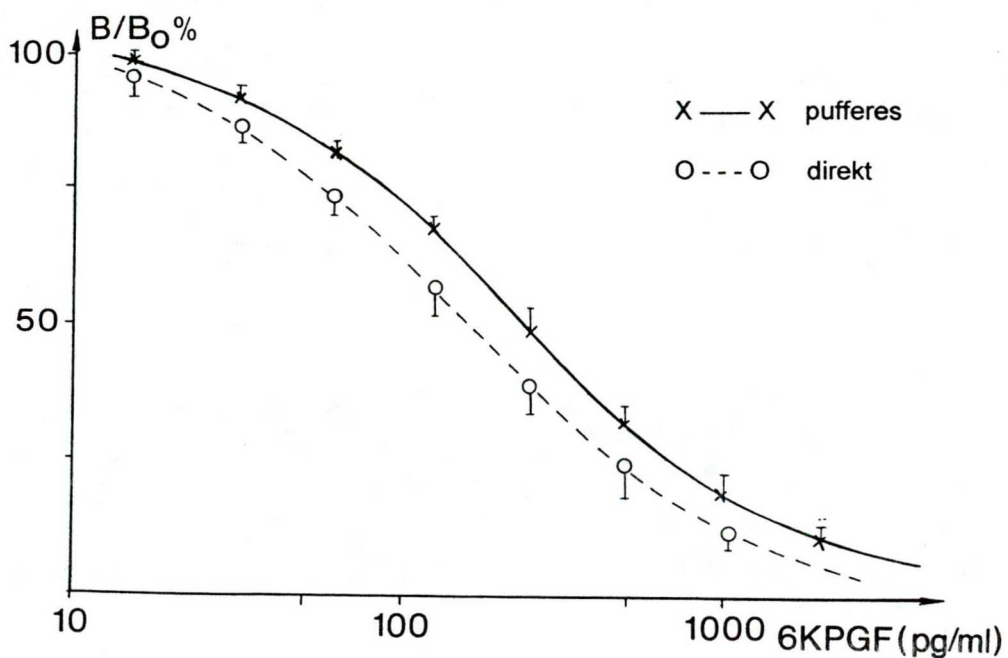
3. EREDMÉNYEK

A mérési eljárás kidolgozása elsősorban a 6KPGF meghatározásra irányult humán plazmában, mivel a TXB₂ mérésére leírt dietiléteres extrakciós módszer már rendelkezésre állt (147), másrészt a PGI₂ viszonylag alacsony koncentrációja a plazmában a többi eikozanoidhoz képest azt eredményezi, hogy az egyéb komponensek a mérést erősen zavarják. A 6KPGF és TXB₂ mérés beállítása humán plazmákra irányult, így a továbbiakban mérendő mintán gyermekek vagy felnőttek egyedi vagy kevert, szigorúan standardizált körülmények között levett plazmáját értem.

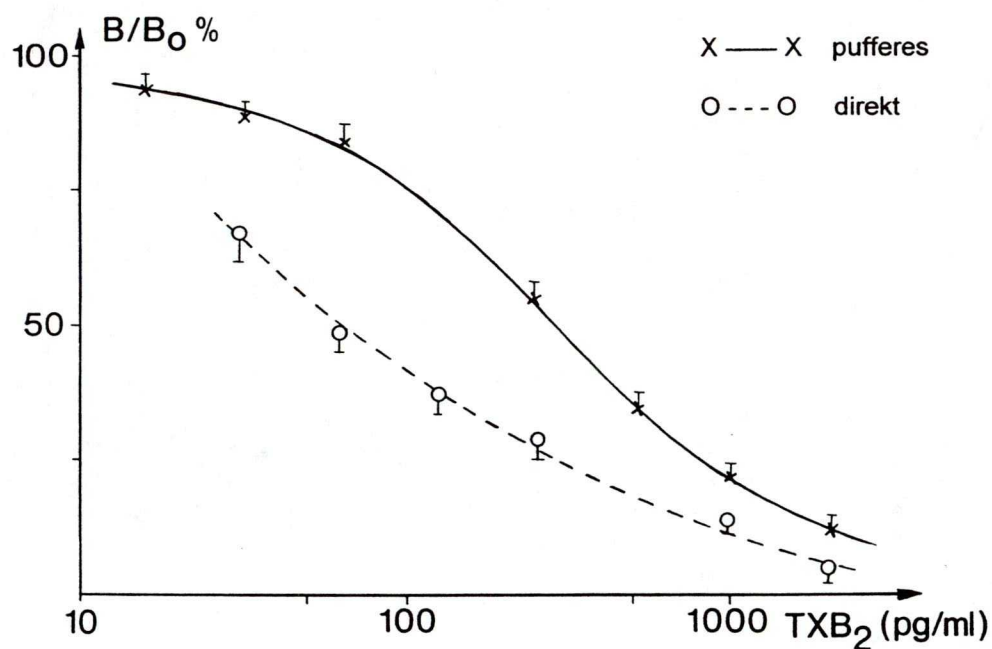
3.1. Közvetlen/direkt RIA

A standard görbét PG-mentes plazma (1 % Norit A, 10 perc) 100-100 µl-ének jelenlétében vettük fel. A plazmaháttérrel nem tartalmazó, pufferes görbéhez képest 6KPGF méréseknél a görbe enyhén balra tolódott, jellegének számottevő módosulása nélkül (6. ábra). A TXB₂ kalibrációs görbe a 100 µl "0" plazma jelenléte miatt erősen torzult (7. ábra).

6. ábra

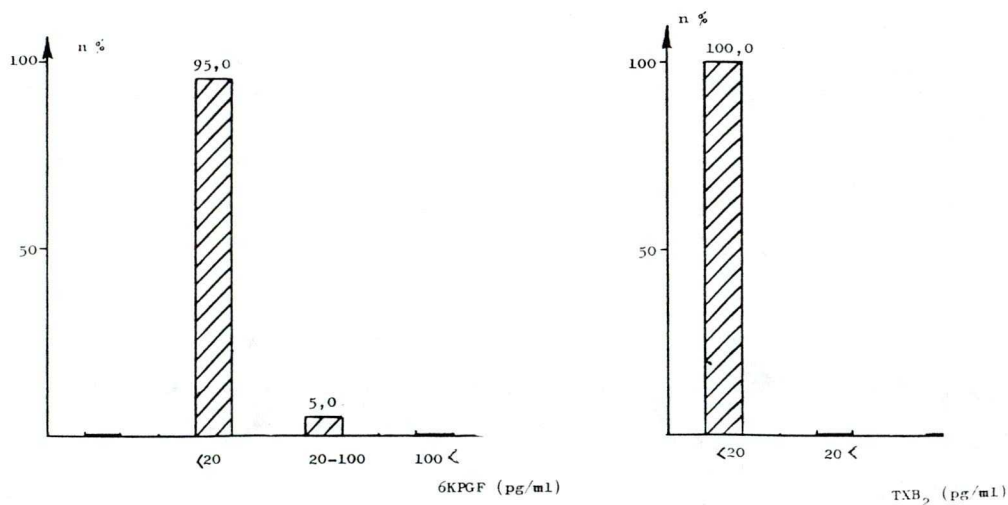


7. ábra



A direkt 6KPGF és TXB₂ mérések során a 3-18 éves korú gyermekektől vett plazmaminták koncentrációi döntő többségben a mérési tartomány alsó határán kívül estek (40db 6KPGF mérésből 38, 23 db TXB₂-ből 23 esetben) (8. ábra).

8. ábra



Azért, hogy a meghatározandó PG szinteket növeljem, a 6KPGF méréseket 200, 300 és 500 µl plazma jelenlétében is elvégeztem. 200 µl "0" plazma jelenlétében a görbe méginkább balra tolódott. 300 µl plazmánál a görbe már szemmel láthatóan torzult, felfelé és jobbra tolódott. 500 µl plazmával kétszeres antiszérums koncentráció esetén sem lehetett kalibrációs görbét felvenni (6. ábra).

A Bo/T és az IC₅₀ értékek (50 %-os B/Bo-hoz tartozó antigén koncentráció) változását a plazma jelenlétével az 2. Táblázat mutatja be.

2. Táblázat

	0	100	200	300	500
Bo/T (%)	46,0	38,4	26,9	39,8	1,1
IC ₅₀ (pg/ml)	38,4	29,6	24,0	42,0	-

200-300 µl "0" plazma hátterek jelenlétében 2-2 kevert plazmaminta 6KPGF szintjét mértem, melyek túl alacsonynak bizonyultak.

A TXB₂ direkt RIA mérése során a kalibrációs görbe erősen lefelé torzult, ennek megfelelően a minták alacsony értéket mutattak (8. ábra). A Bo/T érték a plazmaháttér bevitelével 68,6 %-ról 13,2 %-ra csökkent, így a további direkt vizsgálat értelmetlennek tűnt.

3.2. Extrakció etilacetáttal

Az extrakciós eljárás viszonylag egyszerű, a minta savanyítása pH 4,5-re történt, mert további savanyításkor az etilacetátos közegben a fehérjék jelentős része kicsapódott. Az etilacetáttal háromszor extrahált, vízzel mosott, majd pufferben visszaoldott PG-mentes plazma extraktum jelenléte (100-100 µl) a RIA kalibrációs görbét felfelé, és főként a kisebb 6KPGF koncentrációknál a kevésbé érzékeny tartományba tolta el a pufferes standard görbéhez képest. Az eltolódás nem volt párhuzamos. A Bo/T érték 56,9 %-ról 27,4 %-ra csökkent. Az extrakció nem kielégítő minőségére utal, hogy a visszanyerés hatásfoka 6KPGF-re az alacsony tartományban a 100 %-ot jócskán meghaladta, a nagyobb koncentrációk felé pedig egyre csökkent (3. Táblázat).

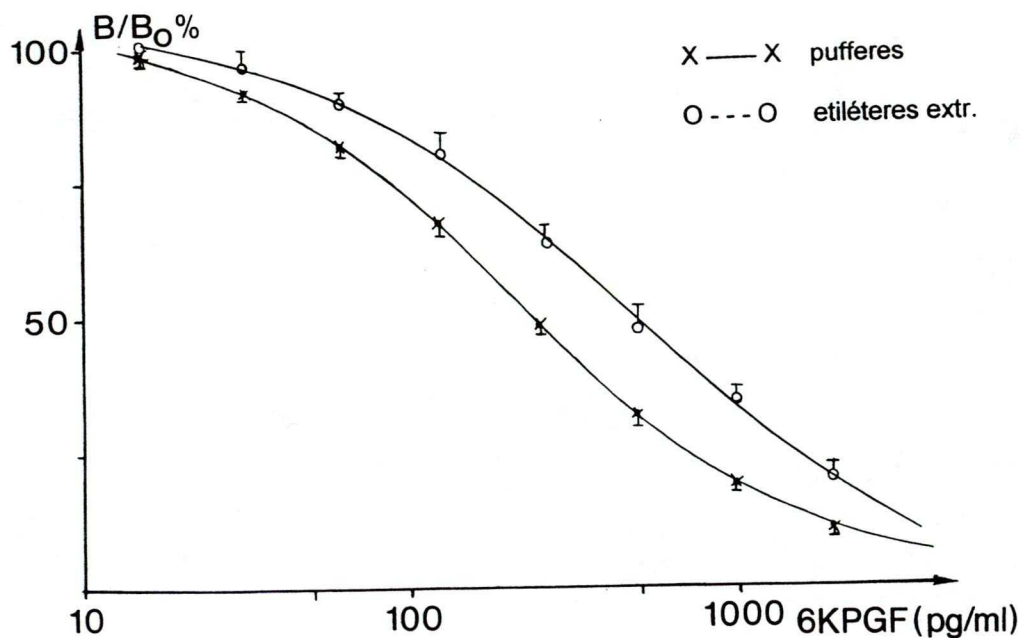
3. Táblázat

Bevitt (pg/cső)	Visszamért (pg/cső)	Visszanyerés (%)
16	31	193,7
31	41	132,2
62	45	72,6
125	56	44,8

3.3. Plazma extrakció dietiléterrel

A 6KPGF kivonásának módja a plazmából viszonylag egyszerű és szelektív volt ezzel a módszerrel, a visszamaradt extraktum kevesebb volt, mint az előbbi módszernél. Az esetek mintegy 10 %-ában az extraktum bepárlása után víz maradt vissza, ezért újabb éter vagy alkohol hozzáadás, és ismételt bepárlás volt szükséges. PG-mentes plazma fentiek szerint nyert extraktuma (100-100 μ l) a pufferes görbéhez képest a standard görbét felfelé és jobbra, a kevésbé érzékeny tartományba, de torzulásmentesen tolt el. A 6KPGF extrakciós görbe jól használható volt (9. ábra).

9. ábra



A Bo/T érték az extrahált "0" plazma hatására 19 %-kal csökkent (41,6 vs. 51,2 %).

A 6KPGF standard törzsoldat PG-mentes plazmás hígításával készült kontroll plazmák direkt és extrakció (melynek során kétszeres dúsítás is történt) utáni mérését is elvégezve következtetni lehetett - a kontroll plazmák tartalmának közvetlen leellenőrzése mellett - az extrakció hatásfokára is. Az eredmények összegezve a 4. Táblázatban láthatók.

4. Táblázat

Bemért konc. (pg/cső)	Meghatározott konc. (pg/cső)		Direkt visszamérés (%)	Extrakciós hatásfok (%)
	Direkt	Extrakciós		
500	>400	229,0	-	22,9
250	226,3	120,6	90,5	24,1
125	144,8	76,2	115,8	30,5
62,5	64,6	41,0	103,4	32,8
31,2	26,0	18,2	83,3	29,2
16,1	15,2	8,8	94,4	27,5
Visszanyerés átlag ($\pm$ SD):				97,5 $\pm$ 12,5 27,8 $\pm$ 3,8

Az extrakció átlagos hatásfoka 6KPGF-re 27,8 $\pm$ 3,8 % volt. A direkt meghatározás regressziós egyenesének egyenlete: $Y=0,93 \cdot X+5,72$, $r=0,988$. Az éteres extrakciós meghatározás alapján a bevitt és visszanyert értékek segítségével húzható regressziós egyenes egyenlete a következő volt: $Y=0,22 \cdot X+4,62$, $r=0,997$.

A plazma eredeti és mért koncentrációja között erős volt a korreláció, azonban a módszer 6KPGF-re túlságosan alacsony hatásfokúnak bizonyult. Az extrakciós eljárás minőségének ellenőrzéseként a mintákhoz hasonlóan RIA puffert, petrolétert és dietilétert pároltunk be és oldottunk vissza pufferben, hogy ezen fázisok "fals" anyag bevitelére következtessünk. Az éteres fázisok hozzájárulása a mért 6KPGF szinthez elhanyagolhatóan alacsony volt, míg a pufferé mérhető, de kismértékű volt (2-3 pg/cső).

Hat egészséges felnőtt plazmamintái közül kettőben a 6KPGF szint túlságosan alacsony, négy esetben viszont mérhető volt, mely a vérvételi hígulást, a kétszeres dúsítást és az extrakciós hatásfokot figyelembe véve 90-499 pg/ml kiindulási plazma koncentrációt jelentett. A módszerrel mérhető legkisebb 6KPGF szint 40 pg/ml volt.

Az éteres extrakciót hasonló módon elvégeztem a TXB₂ meghatározáshoz, a kétszeres dúsítás alkalmazása nélkül. A TXB₂ extrakciós RIA görbe jellege a "0" plazma extraktum háttérének hatására nem változott, enyhe jobbra tolódása párhuzamos volt a pufferes görbével (megegyezően a (147) irodalommal).

³H-TXB₂ izotóptartalmú plazmák extrakció előtti (A₀ és B₀) és azt követő (A_V ill. B_V) beütésszámai alapján a hatásfok átlagosan 40,2 %-nak adódott (5. Táblázat).

5. Táblázat

Minta	Beütésátlag (cpm)	Hatásfok (%)
A ₀	7579	
A _V	3230	42,6
B ₀	7723	
B _V	2918	37,8

3.4. Szilárdfázisú (C18) extrakció

A szilárdfázisú extrakció végleges formája egyszerű, viszonylag könnyen elvégezhető műveletnek bizonyult.

A kísérletek kezdetén a plazmákat közvetlenül, savanyítás nélkül vittem fel az összehasonlítani kívánt Sigma, Sep-Pak és Samplex típusú oszlopokra. Ebben az esetben nem kaptam a dózissal arányos visszanyerést. A plazmák savanyítása pH 3-ra a visszanyerést a dózissal arányos szintre emelte. A háromféle C18 oszlop különbözőképpen viselkedett az extrakció egyes fázisaiban (6. Táblázat). A kiindulási ³H-jelzésű 6KPGF-et tartalmazó plazma sugárzását 100 %-nak tekintve mértük az egyes fázisokban megjelenő beütésszámokat, s százalékos értékét számoltuk. Savanyítás nélkül felvitt plazma PG-tartalmát Sigma típusú oszlop alkalmazásakor a vizes és 10 %-os etanolos mosás eltávolította (35 és 60 %-ban). A Samplex és a Sep-Pak oszlopról a víz nem, de a 10 % alkohol a 6KPGF 40-50 %-át lemosta.

A savanyított plazma az oszlopokon erősebben kötődött meg, de ebben az esetben is a Sigma oszlop volt a legkevésbé megfelelő, csak az alkoholos mosás elhagyásával lett volna használható. A Sep-Pak és a Samplex patronon szelektív elúciókat lehetett végezni. A Samplex oszlopon az etilacetátos elúció után kb. 5 %

6KPGF maradt vissza a fázison, amit az abszolút etanolos regenerálás eltávolított. Megjegyzendő, hogy a méréseim ebben az esetben csak tájékoztató jellegűek voltak, adataim általában két méréssorozat átlagait mutatják. A további munka irányának mérlegeléséhez azonban elégségesek voltak.

6. Táblázat

Savanyítás nélküli plazma	Sigma	Sep-Pak	Samplex
Kétszer felvitt plazma	1,8	1,0	3,0
Víz	34,7	3,7	3,2
10 % etanol	59,9	49,5	39,3
Petroléter	0,2	0,2	0,5
Etilacetát	3,3	45,2	50,1
Maradék	0,1	0,4	3,9
Savanyított plazma	Sigma	Sep-Pak	Samplex
Kétszer felvitt plazma	1,1	0,4	1,2
Víz	0,7	0	1,2
10 % etanol	81,4	0	1,1
Petroléter	0,2	0,4	0,8
Etilacetát	16,6	97,8	90,5
Maradék	0	1,4	5,2

Könnyebb beszerezhetősége és kisebb költsége miatt **a továbbiakban Samplex oszloppal, savanyított plazmával és a tesztelt extrakciós módszerrel** dolgoztam.

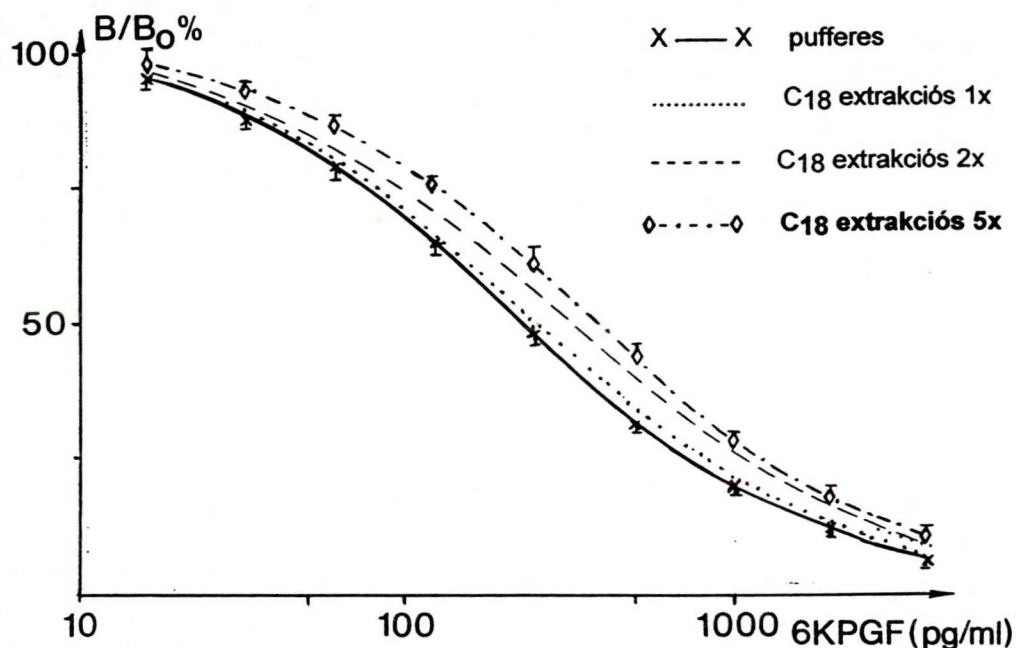
A Samplex oszlopon extrahált, savanyú PG-mentes plazma jelenlétében (100 µl) a RIA kalibrációs görbe alig tért el a pufferestől (10. ábra). Ismert 6KPGF tartalmú kontroll plazmák visszanyerése a méréstartományon belül állandó, hozzávetőlegesen 80,1±10,9 % volt, azonban öt ismeretlen plazmaminta közül csak egy volt mérhető, négyben a 6KPGF szint extrém alacsony volt. Az egyébként is várhatóan alacsony

koncentrációk miatt dúsítást végeztem, bepárlás után az extraktumot az eredeti plazmatérfogat felében, később ötödében oldottam vissza.

A kétszeresre ill. ötszörösre dúsított plazmaháttérben a kalibrációs görbe csekély, torzulásmentes, egyenletes jobbratolódást mutatott (10. ábra).

A B_0/T érték egyenletesen csökkent, az NSB % pedig nőtt, de a kit működését nem rontotta annyira, hogy a mérést megbízhatatlanná, pontatlanná tegye, ugyanis irodalmi adatok szerint a B_0/T 33-50 % között ideális. A görbe jobbra tolódását az IC_{50} koncentráció emelkedésével jellemeztem (7. Táblázat).

10. ábra



7. Táblázat

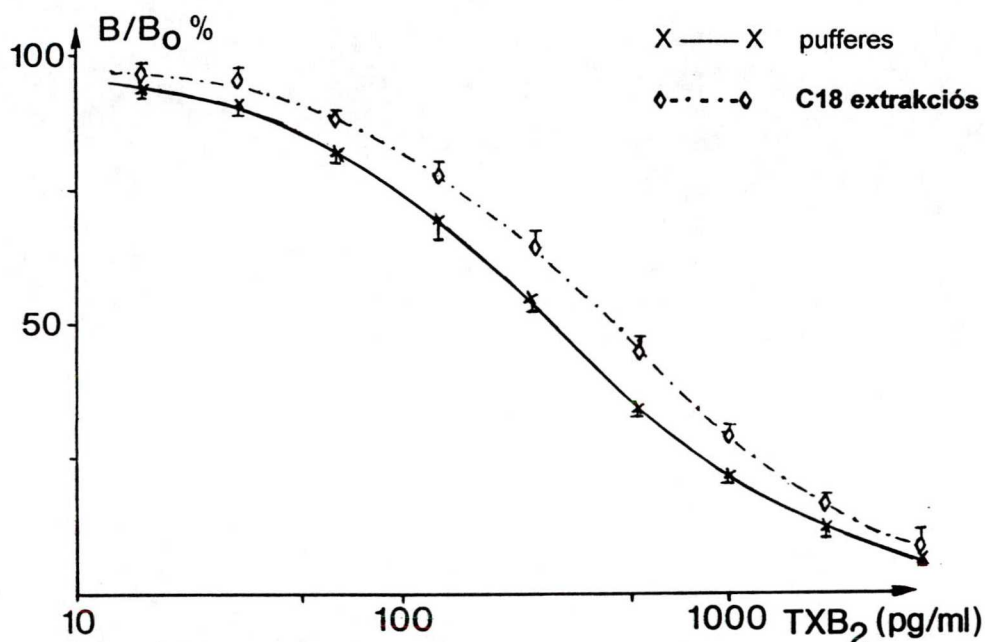
Görbe	B_0/T %	NSB %	IC_{50} (pg/cső)
Pufferes	62,0	2,1	22,2
Plazma dúsítás 1*	54,1	3,3	25,2
Plazma dúsítás 2*	46,6	3,9	33,1
Plazma dúsítás 5*	42,5	5,6	33,5

Mivel a 6KPGF RIA paraméterei a PG-mentes plazmaextraktum bevitelével és **ötszörös töményítésével** sem torzulak túlságosan, a módszert alkalmasnak találtam

további vizsgálatok elvégzésére. A későbbiekben részletezendő eredményeink szerint a plazmaminták 6KPGF szintje döntő többségben mérhetővé vált, így ötszörösnél nagyobb dúsításra nem volt szükség.

A TXB₂ RIA vizsgálatát ezek után, és hasonló módon végeztem, azzal a különbséggel, hogy a magasabb koncentrációk miatt nem alkalmaztam dúsítást a visszaoldáskor. A pufferes TXB₂ RIA görbe "0" plazma extraktum jelenlétében kismértékben és torzulásmentesen szintén jobbra tolódott (11. ábra).

11. ábra



A plazmaextraktum háttér a TXB₂ mérésnél sem okozott a RIA paramétereiben olyan mértékű változást, hogy a RIA meghatározás minőségét túlságosan rontotta volna. A B₀/T érték mindig nagyon magas volt, főként a puffer háttér esetén (8. Táblázat).

A 7. és 8. Táblázat utolsó sorában kiemelt értékek nem egyetlen, hanem a későbbiekben végzett, 15-15 méréssorozat átlagos értékeit képviselik.

8. Táblázat

Görbe	B ₀ /T %	NSB %	IC ₅₀ (pg/cső)
Pufferes	84,6	4,1	30,8
Plazmaháttér (1*)	62,3	5,4	41,7

A módszer segítségével az ismeretlen plazmaminták TXB₂ tartalma mérhetővé vált, ezért az eredetileg 6KPGF mérésre kidolgozott eljárást további vizsgálatokra tartottam alkalmasnak a TXB₂ meghatározás területén is. A módszer előnye, hogy a mintában a 6KPGF és a TXB₂ tartalom egyazon extrakciót követően meghatározható volt.

3.5. A PG-mentesítés minőségellenőrzése

Kevert humán plazma PG-mentesítését 0,1; 0,3 és 1 %-os Norit A-val, különböző ideig (0-10 perc) végeztük. A lecentrifugált felülúszó szokásos módon végzett C18 extrakciója után RIA-val határoztuk meg a PG-tartalmat. A 6KPGF-mentesítéshez 0,3 % Norit A 5 perces mentesítése elegendő volt (9. Táblázat). A TXB₂ tartalom megkötéséhez valóban szükséges volt a javasolt 1 % Norit A (10. Táblázat). A mentesítendő plazmában az eredeti 6KPGF koncentráció 25 pg/ml, a TXB₂ szint 291 pg/ml volt.

A 10 perces 1 % Norit A-s mentesítést elfogadtuk.

9. Táblázat

Norit A (g/100 ml)	6KPGF (pg/ml)			
	Inkubációs idő (perc)			
	0	2	5	10
0,1	15,3	14,7	5,3	5,0
0,3	6,2	6,2	<2,9	<2,9
1,0	7,3	5,6	<2,9	<2,9

10. Táblázat

Norit A (g/100 ml)	TXB ₂ (pg/ml)			
	Inkubációs idő (perc)			
	0	2	5	10
0,1	247,5	274,7	272,0	193,1
0,3	231,2	23,6	16,3	24,5
1,0	13,6	28,0	<13	<13

3.6. A Samplex C18 oszlop kapacitásának ellenőrzése

A Samplex oszlopok megfelelő regenerálási lépések közbeiktatása után többször felhasználhatók voltak. Ugyanazon plazmaminta két oszlopon történő sorozatos extrakcióját végeztük el (legelőször új volt az oszlop), és meghatároztuk minden egyes extrakció után a 6KPGF és TXB_2 szinteket (11. Táblázat). A 7. használat előtt kénsavas regenerálást is beiktattunk a 2.7.6. 1. megjegyzése szerint. A meghatározott 6KPGF és TXB_2 szintek a kisfokú szórásen kívül határozott tendenciát nem mutattak. A 6KPGF szint az I. oszlopon $25,2 \pm 5,6$, a II. oszlopon $24,9 \pm 6,0$ pg/ml-nek, a TXB_2 pedig $180,4 \pm 27,1$ és $176,9 \pm 21,4$ pg/ml-nek adódott. Az oszlopokon megkötődött fehérjék kénsavas eltávolítása enyhén segítette a PG-kötődést. (A 6KPGF mérésnél a viszonylag nagy szórás (átlag 23 %) az alacsony plazma szintből adódhat, abszolút értékben ez a szórás nem olyan nagy).

11. Táblázat

Használat sorszama	6KPGF (pg/ml)		TXB_2 (pg/ml)	
	I.	II.	I.	II.
1.	25,2	24,7	173,8	150,0
2.	31,4	35,8	165,0	179,3
3.	27,9	20,3	188,6	171,8
4.	29,8	20,3	220,8	185,4
5.	26,9	28,1	209,7	216,3
6.	16,2	18,4	150,0	157,5
7.	18,8	26,9	154,8	178,3

Vizsgáltuk az oszlopra felvihető plazmamennyiséget is ugyanazon kevert plazmát használva (12. Táblázat). A visszamért TXB_2 értékeket a plazmamennyiség nem befolyásolta, átlagos értéke $171,7 \pm 27,1$ pg/ml volt, mely egyezik a 11. Táblázatban szereplő értékkel. A 6KPGF meghatározás 5-10 ml plazma felvitele esetén nem volt megfelelő, a nagy mennyiségű kísérőanyag a 6KPGF kötődését zavarta az oszlopon.

12. Táblázat

Plazmatérfogat (ml)	6KPGF (pg/ml)	TXB ₂ (pg/ml)
1	23,5	150,0
2	30,8	207,2
5	< 3	150,9
10	< 3	178,6

A későbbi gyakorlatban az oszlopokat 5-6-szor használtuk, és a 4. extrakció után kénsavas regenerálást iktattunk közbe. A meghatározandó mintákból 1,5-2 ml-t vittünk az oszlopra.

3.7. A Samplex extrakciós módszerrel kombinált RIA meghatározás minőségellenőrzésének eredményei

3.7.1. Extrakciós veszteségek

Az extrakció egyes lépéseinél a PG-tartalomban fellépő veszteségek adódhatnak egyrészt az antigén nem tökéletes megkötődéséből a oszlopon, másrészt a tisztítási lépések során is távozhat el az oszlopról anyag. Ilyen irányú vizsgálat történt vázlatosan a 3.4. pontban a 6. Táblázat szerint. A Samplex oszlopot tovább vizsgáltam ¹²⁵I-jelzett 6KPGF és TXB₂ tracer tartalmazó plazmákkal is. A lejövő fázisokban megjelenő aktivitás utalt az extrakciós veszteségre, s az eredeti plazma aktivitásához képest százalékban adtam meg (13. Táblázat). 6KPGF vizsgálatoknál 7, TXB₂-nél 5 sorozatmérést végeztünk, ezért az átlag és szórás értékeket tüntettem fel.

A 6KPGF és a TXB₂ az oszlopon jól és kellő erősséggel kötődött meg, a tisztítási lépések a TXB₂ esetében egy százaléknál kevesebb hatóanyag-tartalom veszteséget okoztak, de ez a 6KPGF esetén sem érte el az 5 %-ot.

13. Táblázat

	^{125}I -6KPGF (%)	^{125}I -TXB ₂ (%)
Eredeti plazma	100,0	100,0
Plazma, kétszeri felvitel után	1,2 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 1,9
Deszt. víz	1,2 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,5
10 % etanol	1,1 $\pm$ 0,3	0
Petroléter	0,8 $\pm$ 0,6	0
Etilacetát	88,4 $\pm$ 4,5	88,9 $\pm$ 5,7

Az etilacetát eluens nem távolította el az oszlopról a 6KPGF és TXB₂ teljes egészét, de vizsgálataink szerint 8 ml etilacetát elegendő volt, mert a további oldószerfelesleg már nem távolított el számottevő anyagot. (Itt nem részletezett adataink alapján viszont ekkora eluens térfogatra szükség volt megfelelő minőségű extrakcióhoz). Az oszlop regenerálására használt etanollal az oszlopon maradt anyag tökéletesen lemosható volt.

Megjegyzés: Történt próbálkozás az etilacetát kiváltására abszolút alkohollal a hatásfok növelésének érdekében. Ennek a cserének előnye volt, hogy már 4 ml etanol a 6KPGF-et 99 %-ban lemosta az oszlopról, ez kisebb oldószerigényt és rövidebb bepárlási időt eredményezett volna. Az alkoholos elúció azonban nem volt elég szelektív, melyet a megnövekedett extraktum mennyiség és a Bo/T érték további, a RIA "jószágának" határáig való csökkenése (36,9 %-ra) is mutatott és a többi paraméterben is kedvezőtlen tendencia mutatkozott.

3.7.2. Az extrakció hatásfoka és mérőssorozatok közötti, külső variáció (interassay variation)

Ismert 6KPGF illetve TXB₂ tartalmú kontroll plazmák extrakcióját elvégezve a visszamért koncentrációk alapján következtethettünk a teljes eljárás (extrakció és RIA) hatásfokára. A kontroll plazmák koncentráció-tartománya lehetőség szerint lefedte a teljes tartományt, mely a mintákban előfordult.

Ismeretlen mintákat is tartalmazó mérőssorozatainkban rendszeresen alkalmaztunk kontroll plazmákat, így a hatásfokot számos alkalommal teszteltük. 8-13

különböző mérőszorozatban meghatározott visszanyerések átlagos hatásfoka kontroll plazmákra összefoglalóan a 14. és 15. Táblázatban látható.

14. Táblázat

6KPGF (pg/ml)	n	Hatásfok (%)	cv %
31,2	8	77,0±15,6	20,2
62,5	12	80,3±12,8	15,9
125	12	79,1±10,5	14,6
250	12	76,5±12,3	16,8
31-250	44	78,3±13,0	16,6

15. Táblázat

TXB ₂ (pg/ml)	n	Hatásfok (%)	cv %
62,5	10	83,0±16,8	20,2
125	12	79,5±13,3	16,7
250	13	85,2±11,8	13,8
500	12	86,1±13,1	15,2
1000	10	79,1±12,6	15,9
62,5-1000	57	82,7±13,4	16,2

Az extrakciós módszer hatásfoka a vizsgált méréstartományon belül nem mutatott változó tendenciát sem a TXB₂, sem a 6KPGF meghatározás esetén, átlagos értéke 6KPGF-re némileg alacsonyabb volt. Mivel az ismeretlen plazmaminták koncentrációja 6KPGF esetén döntő többségben 200 pg/ml alatt volt, TXB₂ szintjük pedig általában 100-1000 pg/ml között, így a vizsgált kontroll plazmák által lefedett koncentráció-tartomány megfelelő volt. 6KPGF mérésnél az alsó határ (31 pg/ml) alatti koncentrációk ugyan előfordultak, de kisebb koncentrációknál a relatív szóródás már sokkal jelentősebb lett volna, noha abszolút értékben ezek a különbségek nem voltak olyan nagyok.

A hatások szórása segítségével meghatározott variációs együtthatók jelen esetben megegyeznek a külső vagy interassay variáció mértékével, mivel a meghatározások különböző, független mérősorozatokban történtek.

A külső variációs koefficiens tartalmazta módszerünkben:

- az extrakciós hibát
- a "0" plazma extraktum háttér különbségét az egyes sorozatokban
- s mivel a RIA tesztek költségessége miatt általában kb. 30 mintát összevártunk a mérésig, tehát ugyanazt a kontroll plazmát max. 1-3 alkalommal tudtuk mérni a tárolás miatt megjelenő hibák miatt, a kontroll plazmák előállításakor föllépő kihígítási hibák is megjelentek az interassay variációs együtthatóban, amely persze esetünkben nem szerencsés.

Fentieket figyelembe véve az átlagosan 16 %-os külső variációt elfogadhatónak lehet tartani, főként ha e vegyületek nehéz mérhetőségét figyelembe vesszük.

3.7.3. Mérősorozaton belüli szórás (intraassay variation)

A belső (intraassay) variációs koefficiens értékét a méréstartomány három szakaszán adtuk meg. Két mérősorozatban extraháltuk 5-5 oszlopon ugyanazt a 3 db 6KPGF és 3 db TXB₂ kontroll plazmamintát. A belső variációs együtthatót a mért koncentrációk átlaga és szórása segítségével határoztuk meg (16. Táblázat).

16. Táblázat

6KPGF (pg/ml)	I. (%)	II. (%)	Átlag (%)
31,2	8,4	10,6	9,5
62,5	11,1	8,5	9,8
250	8,2	7,8	8,0
TXB ₂ (pg/ml)			
62,5	6,8	9,6	8,2
250	7,7	8,9	8,3
1000	6,9	10,2	8,5

A belső variációs koefficiens 10 % alatt volt a teljes vizsgált tartományban, 6KPGF-re a 31,2-250 pg/ml tartományban átlagértéke 9,1 %, TXB₂ mérésnél 62,5-1000 pg/ml koncentráció esetén 8,3 % volt.

Az intraassay variációs koefficiens magában foglalta:

- az extrakciós hibát
- a RIA mérés hibáját.

A módszer méréssorozaton belüli szórása a mért prosztanoidokra nemzetközi szinten elfogadható volt.

3.7.4. A "vak" kérdése (procedure blank)

A vizsgálat arra adott felvilágosítást, hogy az extrakció lépései során vittünk-e be olyan anyagot, mely a méréskor a prosztanoid szinteket emelte volna. RIA puffer extrakciója alapján a "bevitt PG-tartalom" minden esetben a méréshatár alsó szintje alatt volt (6KPGF < 3 pg/ml, TXB₂ < 13 pg/ml).

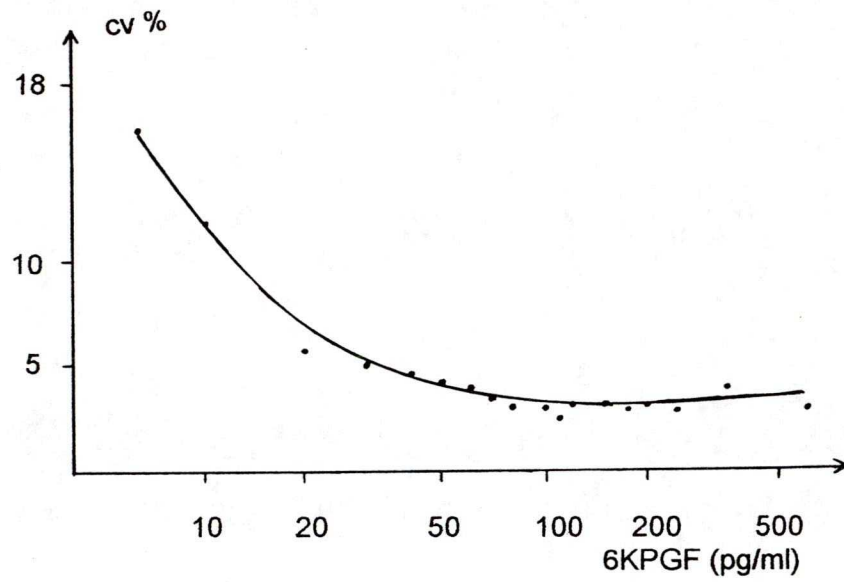
3.8.5. Pontosság (reprodukálhatóság, precision), méréstartomány, érzékenység

A párhuzamos RIA mérések véletlen hibáinak nagyságára utaló variációs koefficiens (a mért átlagérték és annak szórása alapján) az ismeretlen plazmák koncentráció-tartományában irodalmilag elfogadható szinten volt (6KPGF precízióprofil 12. ábra, TXB₂ 13. ábra). A TXB₂ RIA-nál a cv % minimuma 5 %, 6KPGF mérésnél 3 % körül mozgott, a párhuzamos TXB₂ szintek nagyobb szórását általában megfigyelhettük a standardoknál és a mintáknál is. Ennek lehetséges oka, hogy a TXB₂ antiszérum, mely zselatinos pufferben volt liofilizálva, (a gyártó hibájából) gyakran gombás befertőződést mutatott, feloldása nehézkes volt, s hosszas rázogatós után centrifugálással tisztítottuk meg.

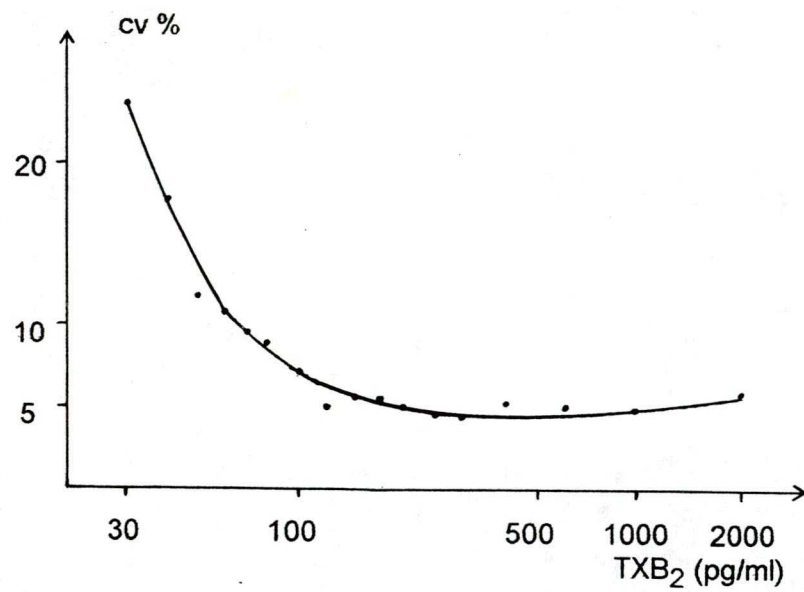
A 10 %-nál kisebb cv % értékekkel a precízióprofil alapján kijelölhető méréstartomány alsó határa 6KPGF meghatározásnál 11 pg/ml (4 pg/cső), TXB₂ mérésnél 70 pg/ml (5 pg/cső) volt. Felső határa 6KPGF-re legalább 600, TXB₂-re pedig ugyanez legalább 2000 pg/ml volt. Ennél magasabb koncentráció szintek mért mintáinkban nem voltak jellemzőek.

A módszer érzékenysége /kimutathatósági határa/ (a B₀-2SD értékhez tartozó koncentráció) 6KPGF-re 4 pg/ml, TXB₂-re 25 pg/ml volt.

12. ábra



13. ábra



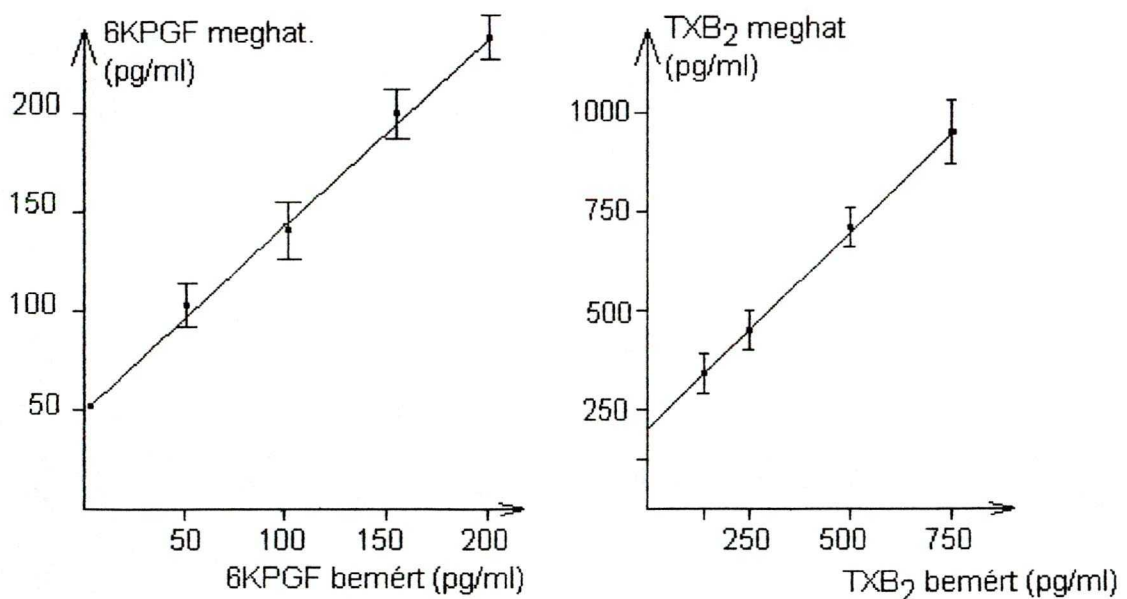
3.7.6. Megbízhatósági vizsgálat (accuracy)

Linearitás vizsgálat:

Kevert alapplazmához (pool) ismert mennyiségű 6KPGF és TXB₂ standardot adtunk 4-4 (esetleg 3-3) koncentrációban, majd a szokásos módon végeztünk extrakciót és RIA meghatározást.

Egy 6KPGF és egy TXB₂ reprezentatív méréssorozat eredményeit a 14. ábrán mutatom be, a tengelymetszet (b) az alapplazma koncentrációját adja meg, a meredekség (m) eltérése 1,00-től az interferáló anyagok jelenlétét mutatja. Az ábrán jelölt méréssorozat eredménye a 17. Táblázat első sorában található. A táblázatban további 3-3 méréssorozat eredményei is láthatók, az utolsó sorozatban csak 3-3 koncentrációban adtuk az alapplazmához a kontroll plazmákat.

14. ábra



17. Táblázat

6KPGF bemért (pg/ml)	m	TXB ₂ bemért (pg/ml)	m
51,2	0,982	196,4	1,009
22,0	0,931	523,0	0,989
110,4	1,087	143,0	0,967
127,0	0,894	625,0	1,015

A linearitás vizsgálatban a felvett pontokon húzható volt egyenes minden esetben, melyeknek meredeksége nem tért el jelentősen egytől.

Paralellitás vizsgálat:

2 db kevert plazma extraktum négyféle módon történt hígítása után is meghatároztunk RIA-val a 6KPGF és a TXB₂ tartalmát, megfelelően hígított "0" extraktum háttérű kalibrációs görbéről leolvasva. A lehígított mintákban meghatározott koncentrációkat (mért), visszaszorozva a hígítási tényezőkkel, meghatároztam, hogy az eredeti plazmában mekkora volt a koncentráció. Ezek átlagos értékét fogadtam el, s meghatároztam, ennek alapján mekkora szintet kellett volna a hígított mintákban mérnem (várt). A hibát százalékos nagyságban tüntettem fel (mért/várt*100) (18, 19. Táblázat).

18. Táblázat

6KPGF (pg/ml)	Mért	Várt	Kül. %	Mért	Várt	Kül %
Alapkonc.	184	176	4,5	73,6	81,4	- 9,6
1:2 hígítás	94	88	6,8	40,2	40,7	- 1,3
1:3 hígítás	56	59	-5,1	30,4	27,1	12,2
1:5 hígítás	34	35	-2,9	17,3	16,2	6,7
1:10 hígítás	17	18	-5,6	7,6	8,1	- 6,2

19. Táblázat

TXB ₂ (pg/ml)	Mért	Várt	Kül. %	Mért	Várt	Kül %
Alapkonc.	680	680	0	453	465	- 2,6
1:2 hígítás	363	340	6,8	220	232	- 5,2
1:3 hígítás	200	226	-11,5	0	0	0
1:5 hígítás	131	136	-3,7	93	92	1,1
1:10 hígítás	74	68	8,8	50	46	8,7

A paralellitás vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a mért-várt értékek az intraassay korrelációs együttható szintjén mozogtak, mely alátámasztja az alkalmazott módszer megbízhatóságát.

3.8. Az extrakciós módszer alkalmazása, humán plazmaminták feldolgozása

Kidolgozott módszerünkkel lehetőségessé vált a 6KPGF és TXB₂ szintek meghatározása bizonyos vizsgálati csoportokban (különböző mértékű érrendszeri veszélyeztetettség hatása) és kontrollálható lett különféle anyagok fenti prosztanoidokra gyakorolt befolyása.

3.8.1. Egészséges gyermekek és kamaszkorúak 6KPGF és TXB₂ szintje

Az érrendszeri megbetegedések szempontjából negatív családi anamnézisű, kontroll, egészséges fiatalok plazma prosztanoid szintjének meghatározása a későbbi vizsgálatainkhoz volt szükséges. A feldolgozásra alkalmas 85 leány és 53 fiú értékeit nemek és korcsoportok szerint bontottam fel. A nemi érés esetleges hatását figyelembe véve, a felbontás a serdülőkor előtti, alatti és utáni 6KPGF, TXB₂ és TXB₂/6KPGF (TX/6K) arány értékeket tükrözi (leányok 20. Táblázat, fiúk 21. Táblázat). A 6KPGF és a TXB₂ szintek a fiúkban enyhén magasabbak voltak, a TXB₂ szint az életkorral főként a leányokban kifejezetten csökkent. A TX/6K arány a lányokban kezdetben magasabb volt és folyamatosan csökkent, fiúknál a serdülőkor idején csökkent, majd nőtt. Nemek közötti lényeges differencia ebben a bontásban egyik vizsgált paraméterben sem volt.

20. Táblázat

Életkor	3 -11	12 -15	16 -19
Esetszám (n)	16	20	49
6KPGF (pg/ml)	52,9± 9,5	60,7± 7,7	49,3± 5,7
TXB ₂ (pg/ml)	295 ± 52	243 ± 28	183 ± 20 *
TX/6K	7,7± 1,6	5,3± 1,0	4,5± 0,5**

átlag ± SEM értékek, *: p < 0,02 és **: p < 0,01, különbség a 3 -11 és a 16 -19 éves korcsoport között

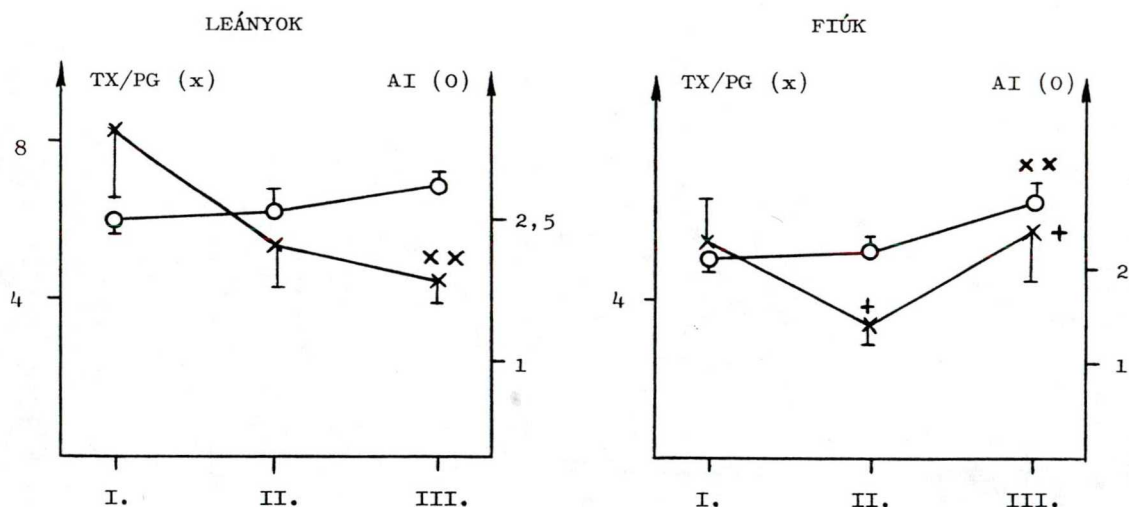
21. Táblázat

Életkor	3 -12	13 -16	17 -20
Esetszám (n)	17	19	17
6KPGF (pg/ml)	68,7± 9,8	79,9± 9,5	54,1± 6,9 ⁺
TXB ₂ (pg/ml)	311 ± 29	288 ± 26	246 ± 34
TX/6K	5,6± 0,9	3,5± 0,4 ⁺	5,8± 1,1 ⁺

átlag ± SEM értékek, ⁺: p < 0,05 különbség az előző korcsoporthoz képest

A PG és lipidanyagcsere összefüggéseinek vizsgálatára a homeosztatikus egyensúlyra utaló TX/6K arányt összevetettük a lipidprofil tükröző atherogén index (AI) változással, nemek és életkor szerint (15. ábra). Az AI szintén a lányokban volt magasabb a pubertáskorig, majd a fiúkban lényegesen megemelkedett (a TX/6K aránnyal együtt) a serdülőkor után.

15. ábra



3.8.2. 6KPGF és TXB₂ szintek fiatalkori infarktusos családok gyermekeiben

Az érrendszeri megbetegedés szempontjából veszélyeztetett helyzetben lévő gyermekekben jelentős eltérést találtunk a negatív családi anamnézisű gyermekekhez képest (22. Táblázat).

22. Táblázat

	Kontroll	Veszélyeztetett
6KPGF leány	(85) 52,7± 4,8	(77) 38,4± 3,4 *
fiúk	(53) 67,9± 5,4	(65) 38,7± 3,5 **
TXB ₂ leány	218,3±27,5	261,5±24,4
fiúk	282,1±28,9	258,5±33,0
átlag ± SEM (pg/ml) *: p < 0,01 , **		: p < 0,001

A 6KPGF szint mind a veszélyeztetett fiúkban, mind a leányokban lényegesen alacsonyabb volt, mely a fiúkban még kifejezettebb volt, s a TXB₂ enyhe csökkenésével járt együtt (mely azonban így, életkori bontás nélkül, nem volt számottevő). Az átlagéletkorban a kontrollok és a veszélyeztetettek között nem volt lényeges eltérés (2.1. pont).

Felmértük azt is, hogy a kontroll leányok ill. fiúk értékei alapján felállítható 10 percentiles 6KPGF szintnél (10 %-os küszöbérték) kisebb 6KPGF szint a veszélyeztetett gyermekek hány százalékában fordult elő. Ugyanezt a vizsgálatot TXB₂ esetén a felső 10 %-os küszöb, azaz a 90 percentiles érték kijelölésével végeztük el. A 23. Táblázat adatai a kontrollok alapján kijelölt küszöbértékeket és a kóros értékek százalékos gyakoriságát tünteti fel a veszélyeztetett gyermekekben. Látható, hogy a kóros értékek másfél-kétszer olyan gyakoriak voltak a pozitív anamnézisű gyermekekben ill. fiatalokban.

23. Táblázat

	Küszöbérték (pg/ml)	Gyakoriság (vesz.) (%)
6KPGF leány	14,5	19,6
fiú	11,3	16,9
TXB ₂ leány	409	16,7
fiú	430	16,9

Megfigyelhető, hogy bár a kontroll fiúkban a 6KPGF átlagos szintje a lányokénál magasabb, a kijelölt küszöbérték mégis a lányoknál magasabb, az eloszlásgörbe eltérő jellege miatt.

3.8.3. Korreláció a koleszterin-frakciók eltolódása és a plazma TXB₂ koncentráció között egészséges felnőttekben

Az egészséges felnőtteket nemek szerinti bontásban vizsgáltam. Mivel az életkorral változást kimutatni nem tudtam (ennél a viszonylag kis esetszámnál), az adatokat összevontan kezeltem.

A 6KPGF átlagos szintje (+/-SEM) nőkben 55,3+/-4,5 , férfiakban 54,1+/-4,6 pg/ml volt. A plazma TXB₂ szintben szintén nem találtunk nemi differenciát, a koleszterin-frakciókat illetően a férfiaknál találtunk eltolódást az atherogenitás felé (magasabb összkoleszterin és AI), a különbség azonban nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet (24. Táblázat).

24. Táblázat

	n	Össz-Ch (mmol/l)	TXB ₂ (pg/ml)	AI
Nők	41	5,5±0,3 *	276±27	3,8±0,3 **
Férfiak	37	6,2±0,3 **	265±36	5,3±0,4
Együtt	78	5,9±0,2 **	271±22	4,5±0,3 **

átlag ± SEM, * p < 0,05, ** p < 0,01 pozitív korreláció a TXB₂ szinttel

Az összkoleszterin és TXB₂ szint közt mindkét nemben pozitív korrelációt tapasztaltunk. Az AI és a TXB₂ között csak a nőkben találtunk szoros összefüggést (24,25. Táblázat).

25. Táblázat

		Korr. egyenes	r	F
Össz-Ch - TXB ₂	nők	28,1*X+120,5	0,325	4,60
	férfiak	50,8*X- 51,7	0,438	8,29
AI - TXB ₂	nők	38,7*X+127,1	0,482	11,83
	férfiak	25,4*X+129,6	0,294	3,30

Az összkoleszterin és a TX/6K szintén pozitív kapcsolatban volt egymással mindkét nemben (együttesen $Y=0,527 \cdot X+2,37$ $r=0,322$ $p<0,01$), s ez volt érvényes az AI és a TX/6K között is ($Y=0,371 \cdot X+3,81$ $r=0,287$ $p<0,02$). A HDL és a TX/6K között nem volt kimutatható összefüggés ($r=0,04$).

A 6KPGF egyik vizsgált paraméterrel sem mutatott szoros kapcsolatot. A korrelációs koefficiensek értéke a 6KPGF és az összkoleszterin ill. az AI között rendre 0,07 és 0,05 volt. A HDL-koleszterin és a 6KPGF közötti kapcsolat tendenciájában pozitív volt a férfiakban ($r=0,12$), nőkben viszont a tendencia negatív volt ($r=-0,23$).

3.8.4. Kúraszerű halfogyasztás hatása hiperkoleszterinémiás önkéntesek 6KPGF és TXB₂ szintjére

Háromhetes busafogyasztás hatását vizsgáltuk magas kiindulási koleszterin szinttel rendelkező 30 felnőttben. A vizsgált paraméterek egyikében sem találtunk nemi vagy életkor szerinti differenciát sem a kúra elején, sem a végén, s a két különböző mennyiségű (heti 1000 vagy 1800 g) busa hatása sem tért el egymástól jelentős mértékben. Így az összes vizsgálatba bevont személyt egységes csoportként kezeltük.

A halat az önkéntesek kedvelték, és a kúra során semmiféle mellékhatás nem lépett fel. A széleskörű vizsgálat eredményei közül a halfogyasztás 6KPGF és TXB₂ szintekre kifejtett hatását mutatom be (26. Táblázat).

A háromhetes halfogyasztás a plazma 6KPGF és TXB₂ szinteket nem befolyásolta jelentős mértékben. A vérlemezkek TXA₂-termelő kapacitását tükröző szérum TXB₂ szint azonban a kúra végére 27 %-kal csökkent. A vérlemezkeszám állandó értéken maradt.

26. Táblázat

	Kúra előtt T = 0	Kúra végén T = 3 hét	Két hét múlva T = 5 hét
Plazma 6KPGF (pg/ml)	53,7± 19,4	48,3± 19,8	48,3± 16,4
Plazma TXB ₂ (pg/ml)	341,7±248,1	388,3±270,9	325,5±172,0
Szérum TXB ₂ (ng/ml)	513 ±186	375 ±146 *	431±175
Trombocitaszám (G/l)	231 ± 42	219± 47	250 ± 63

átlag ± SD értékek, * p < 0,01 vs. kúra előtti érték

Két héttel a kúra befejezése után a trombociták TXB₂ termelő kapacitása a kiindulási érték felé mozdult el, a plazma TXB₂ szintben viszont ekkor (késleltetéssel) mutatkozott enyhe csökkenés.

Az egyénenkénti szérum TXB₂ szint változást illetően az összes 410 ng/ml feletti kiindulási szérum TXB₂ szint (a 30-ból 18 eset) csökkent a kúra végére, míg az alacsony értékeknél egyes esetekben növekedés volt tapasztalható. Mindez a TXA₂-termelés normalizálódására utalhat a kúra ideje alatt.

4. MEGBESZÉLÉS

A szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának első lépései, a folyamat kulcslépésének - ha van ilyen - tisztázása, s az atherogenezis megállítása, sőt visszafordítása minden, ezen a területen dolgozó, kutató hazai és külföldi szakember álma. Az egyre bővülő ismeretanyag apránként hozzájárul a tárgykör feltérképezéséhez. Aggodalommal töltheti el a téma ismerőit, hogy az érlelmeszesedés kórfolyamata sokkal hamarabb megkezdődik, mint azt régebben képzelték, évtizedekkel korábban, mint ahogy a klinikai tünetek megjelenének.

A korai elváltozások esetleges indikátorai lehetnek bizonyos potenciális biológiai jelentőségű anyagok felszabadulásában és lebomlásában bekövetkezett változások is. Munkám során az ebből a szempontból kiemelkedően fontosnak tartott PGI_2 és TXA_2 keringésben mérhető, stabil metabolitjának mérésére dolgoztam ki eljárást, majd olyan vizsgálati csoportokat gyűjtöttünk össze, melyekben a prosztanoid anyagcsere megváltozásait, eltolódásait tételeztük fel.

4.1. A C18-szilárdfázisú extrakcióval kombinált RIA módszer értékelése

A prosztanoidok biológiai mintában történő meghatározása számos nehézséget vet fel, kezdve a mintavétel módjától, időpontjától, egészen a mérésmódszer megbízhatóságáig. Mindezek a nehézségek betudhatók többek között a PG-ok kis koncentrációjának, bomlékonyságának, a képződésük és lebomlásuk érzékenységének külső stimulus hatására, a nem kellőképpen ismert szezonális, ciklusos és napi ingadozásuknak, mint erről az 1.7. pontban részletesen szó esett.

A PGI_2 és a TXA_2 kémiai módszerekkel közvetlenül nem is mérhető, keringésben lévő szintjükre elfogadottan a 6KPGF és TXB_2 metabolitok koncentrációjából következtetnek. Mivel a vizeletmintából történő analízisnél problémát jelenthet a mintagyűjtés standardizálása és a technikai problémák mellett az adott metabolit eredete is, ezért a vérből történő meghatározást tartottuk a leghízelgesebbnek.

Vizsgálataink során a kísérleti körülmények maximális standardizálására törekedtünk. A vérvétel mindig éjszakai pihenés után reggel, éhgyomorra történt (2.2. pont), adott vizsgálati sorozatban a vérvételt, a pipettázást és a mintakezelést gyorsan,

és lehetőleg ugyanazon személy végezte. Az egyes betegcsoportok kiválasztásánál törekedtünk arra, hogy az életkor, nem, életvitel (dohányzás, italfogyasztás, gyógyszerhasználat) szempontjából homogén legyen. A nemi érésükben, vagy azon túl lévő leányoknál és nőknél csak a hormonális antikoncípiensek befolyásoló hatását küszöböltük ki, a menstruációs ciklus fázisaira nem tudtunk tekintettel lenni, eredményeink ezért természetesen női átlagos értéket képviselnek. Egyes tanulmányok szerint a nőkben a ciklus változó ösztrogén szintje ellenére is állandó a kiválasztott PGI_2 és TXB_2 metabolit és az azt valószínűleg befolyásoló HDL szintje is (138,177).

A vérvételkor mindig ugyanolyan koncentrációban alkalmazott $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ gondoskodott a vér alvadésgátlásáról, az indometacin pedig megfelelő mennyiségű volt a ciklooxygenáz enzim, így a további PG-szintézis gátlásához (50). A haemolizált vérmintákat nem dolgoztuk fel, mert a PGI_2 eritrocitákhoz való kötődése megváltozott plazmaszinteket eredményezhetett volna (239). A vért azonnal, vagy legkésőbb (hidegen tartva) 8 percen belül centrifugáltuk 4°C -on, majd a plazma szeparálása után azonnal mélyhűtöttük. A tárolás -25°C -on történt, polipropilén csövekben, maximum egy hónapig.

A plazmaminták C18-extrakcióját a RIA mindig maximum 2 napon belül követte. Az extraktumok tárolása ez idő alatt is -25°C -on valósult meg.

Ezek a körülmények irodalmi adatok alapján megfelelőek voltak ahhoz, hogy a plazma 6KPGF és TXB_2 szintek ne változzanak a mintakezelés és tárolás során (124,147,157). Hasonlóan standardizált körülmények között, öt egymást követő napon ugyanazon betegtől levett plazmaminta 6KPGF és TXB_2 tartalma specifikus volt az egyénre, s csak kismértékű, 10-12 %-os variációs koefficiens mutatót (124). Mi ilyen irányú vizsgálatot nem végeztünk, de mivel a mérési módszerünk hasonló volt, feltehetően a hibaforrások döntő részét a fenti mintakezeléssel sikerült kiküszöbölni.

A mérésmódszer beállítására számos próbálkozás történt több, a világirodalomban közölt eljárás alapján. Műszerezettségünk és lehetőségeink alapján az érzékenységeben és specifikusságában megfelelő RIA módszer tűnt alkalmasnak, mégpedig a magyar gyártmányú ^{125}I -jelzett izotóptesztetek segítségével. A ^{125}I radioaktív izotóp 60 nap felezési idejű, mely a vele való munkavégzést kényelmessé teszi, a tríciummal ellentétben nem dúsulhat fel, specifikus aktivitása is nagyobb, és a sugárzás detektálása is egyszerűbb (108).

Könnyen beszerezhető, viszonylag olcsó, és nemzetközileg elfogadott minőségű tesztekkel, az Izotóp Intézet (Izinta) 6KPGF és TXB_2 RIA kitjeivel dolgoztunk, mely színvonalas munkát tett lehetővé. Sajnos más gyártmányú kittel való összemérésre nem volt lehetőségünk (illetve arról visszajelzés nem érkezett), de a gyártók szóbeli tájékoztatása szerint a 6KPGF teszt egyenértékű az angol Amersham

gyártmányú teszttel, és a TXB₂ kit sem marad el annak megfelelőjétől. Mint minden RIA tesztnek azonban, ezeknek a készítményeknek is megvannak a maguk korlátai, mivel a rendkívül alacsony, pg/ml-es méréstartományban az antiszérum specifikussága gátat szab a sokkomponensű minták PG-tartalmának korrekt meghatározásának. A plazmaminták direkt, közvetlen mérése nem volt eredményes, a kalibrációs görbe a 100-100 µl PG-mentes plazma-háttér jelenlétében, a TXB₂ meghatározásnál erősen torzult (7. ábra). A 6KPGF mérésnél a görbe csak enyhén módosult, sőt a kedvezőbb, alacsonyabb koncentráció tartományba tolódott 100 µl "0" plazma jelenlétében (6. ábra), azonban a minták értékelhetetlenül alacsonyak voltak, egészséges gyermekek plazmamintái kb. 5 %-ban voltak mérhetőek. A minták meghatározhatóságához szükséges, kb. 500 µl mennyiségű plazmatérfogat bevitele azonban a kalibrációs görbe minőségét jelentősen rontotta a 6KPGF mérésnél is.

A kalibrációs görbe felvételénél indokoltnak tűnt a PG-mentes plazmaháttér létrehozása (30,31), mert ezáltal a mintáinkban az extrakció során visszamaradt "háttér" átlagos mértékben kompenzáltuk, ezáltal jobban közelíteni tudtunk a minták valós PG-tartalmához. A mérendő mintákból összekevert alaplazma (pool-plasma) 6KPGF és TXB₂ tartalmát 1 % Norit A-val 10-15 perces kevertetés során kötöttük meg. Az eljárás megfelelő minőségűnek bizonyult (9., 10. Táblázat). A felhasznált RIA kitekben szintén csontszén szolgált második antitestként a felesleges szabad prosztanoidok eltávolítására.

Humán plazmaminták vizsgálatánál nemzetközileg szükségesnek tartott a RIA-t megelőző szelektív PG-extrakció, melynek többféle módja lehetséges (1.7. pont). Az egyszerű, egyféle oldószerrel vagy oldószer-keverékkel végzett többszöri extrakció (etilacetáttal, hexán-izopropanol eleggyel) utáni plazma háttér esetünkben a RIA paramétereit (Bo/T érték, a görbe karakterisztikus jellege) jelentősen kedvezőtlen irányba befolyásolta, így a vizsgált eljárásokat elvettem.

Ígéretesnek tűnt viszont az összetett, több szelektív mosási lépést is tartalmazó dietiléteres extrakció. Az eljárást a ³H-PGF_{2a} Izinta kit leírásában ajánlják a gyártók a plazma előkészítésére, illetve szerepel dr. Mucha I. dolgozatában a TXB₂ mérés előkészítésére (147). A dietiléteres extrakció során a RIA paraméterei a PG-mentes plazmaextraktum-háttérben sem torzultak jelentősen, a görbe enyhén jobbra tolódott ill. nem változott a 6KPGF és a TXB₂ mérésnél, a Bo/T érték enyhén csökkent. Az extrakció minősége bizonyos tekintetben megfelelő volt (alacsony "procedure blank", a méréstartományban állandó hatásfok), azonban a rendkívül alacsony extrakciós hatásfok alkalmazhatatlanná tette. A mérés hatásfoka 6KPGF-re hozzávetőlegesen 30, TXB₂-re kb. 40 % volt. Utóbbi az említett értekezésben pontosan kimérve 52 %-nak adódott (147), azonban az amúgy is várhatóan alacsony 6KPGF szint miatt ez a módszer nem volt használható.

Az AA metabolitok szelektív kinyerésére biológiai mintákból igen nagy segítséget nyújt a W. S. Powell által 1980-ban bevezetett C18-fázisú extrakció (175). Egyszerűsítve olyan eljárásról van szó, mely a savanyított minta prosztanoid tartalmának megkötése után az egyéb (lipidszerű) anyagokat szelektív mosásokkal eltávolítja, végül a prosztanoidokat közepesen poláros oldószerekkel eluálja, s az oldószer bepárlása után az extraktumot pufferben oldja vissza. Ez az egyszerűsített minta világszerte elterjedt, bár a lépések száma, s az alkalmazott oldószerek kisebb-nagyobb mértékben változóak. Kis átalakítással sikerült fecskendőre illeszthetővé tenni a Magyarországon előállított és könnyen beszerezhető C₁₈-láncokkal apolárosított szilikagél tartalmú Samplex C18 oszlopot, s a vizsgálatokat ezzel folytattam. Külföldről hasonló patronhoz hozzájutnunk akkoriban hosszadalmas lett volna és a folyamatos utánpótlás szintén gondot okozott volna, anyagi lehetőségeinket nem számítva.

Eljárásunk során csak az erősen savanyított plazma kötődött meg az oszlopon kellő erősséggel (6. Táblázat). Az egyes lépések során fellépő veszteségeket ³H-6KPGF, ¹²⁵I-6KPGF és ¹²⁵I-TXB₂ radioaktív antigént tartalmazó plazmák segítségével vizsgáltam meg, az egyes fázisokban megjelenő radioaktivitás alapján. A minták 6KPGF és TXB₂ tartalma átlagosan 95-99 %-ban maradt az oszlopon kétszeri felvitel után (13. Táblázat). A plazma kísérő anyagait a következő szelektív mosási lépések távolították el: víz - a nagyobb lipidmolekulák és egyéb gyengén kötődő poláros anyagok; 10 %-os etanol - foszfolipidek; petroléter - neutrális lipidek és nem túl poláris, nyíltláncú zsírsavak. Az egyes mosási lépések során nem történt jelentős szubsztrát-veszteség, a TXB₂ tartalom gyakorlatilag változatlan maradt, a 6KPGF kb. 1-1 %-kal csökkent minden lépésnél (6,13. Táblázat). Nagyobb ingadozást az etilacetátos fázis prosztaglandin tartalma mutatott, átlagos értéke 6KPGF-re 88,4+/-4,5 %, TXB₂-re 88,9+/-5,7 %-nak adódott 7 ill. 5 mérésorozat alapján.

Az alkalmazott Samplex oszlopot összehasonlítottam kétfajta nyugaton beszerezhető C18 fázissal. Megállapítottam, hogy a Sigma töltet nem, az irodalomban elterjedt Sep-Pak oszlop viszont 6KPGF mérésre valószínűleg jobb hatásfokkal alkalmazható, fentiekben vázolt nehézségek miatt azonban megelégedtünk a szintén jól alkalmazható Samplex oszloppal.

A C18-extrakcióval kombinált RIA eljárás minőségellenőrzéséhez számos kézikönyv és közlemény segítséget adott (23,92,108,124,216).

A 6KPGF és TXB₂ RIA paraméterei a PG-mentes plazma C18-fázisú extraktuma jelenlétében kismértékben eltolódtak a pufferes közegűhöz képest. A Bo/T érték mind a 6KPGF, mind a TXB₂ kitben az irodalmilag elfogadott 50 %-ot meghaladta az eredeti összeállításban, így ennek csökkenése az extraktum miatt nem okozott problémát. A zajsintet jellemző "vak" érték (NSB/Bo %) az irodalmilag elfogadott 5 % körüli értékre emelkedett, TXB₂ mérésnél enyhén meghaladta. A

kalibrációs görbe a 6KPGF RIA-nál alkalmazott ötszörös dúsítás ellenére sem tolódott el erősen, enyhe pozitív irányú eltolódása gyakorlatilag torzulásmentes volt (az IC_{50} - az 50%-os kötéshez tartozó antigén koncentráció - mintegy 10 pg/cső szinttel nőtt). A TXB_2 mérésnél hasonlóan kismértékű eltolódás volt tapasztalható (10,11. ábra, 7,8. Táblázat).

Az eljárás hatásfokára ismert 6KPGF ill. TXB_2 tartalmú kontroll plazmákkal végzett extrakció segítségével következtettem. A visszanyerés aránya a vizsgált tartományban közel állandó volt. Átlagos értéke a 6KPGF esetében $78,3 \pm 13,0$ %, TXB_2 esetén $82,7 \pm 13,4$ % volt (14,15. Táblázat). Ez az átlagos hatásfok nem túlságosan magas, más PG-okra a C18-extrakció esetleg jobb hatásfokkal is működik. N. Maurin hasonlóan végzett, a későbbiekben kicsit részletesebben vizsgált módszerében a hatásfokot 6KPGF-re szintén 80 %-ban állapította meg, W. Siess és F. Dray pedig Sep-Pak extrakciójával 75-85 %-os visszanyerést adott meg 6KPGF-re. A variációs koefficiens (a hatásfok százalékos szórása) a méréssorozatok (melyek átlagos száma egy-egy koncentrációban 12 volt) közötti különbségeket mutatja, mely így az ún. interassay vagy külső variációs koefficienssel egyezik meg. Értéke az extrakciós hibákból, az egyes RIA tesztek és a PG-mentes plazmák különbözőségéből, a tárolás és egyéb körülmények hibájából adódott össze. Sajnos kontroll szérum a nehezen mérhető prosztanoidokra nincs, így a kontroll plazmákat magunk állítottuk elő, folyamatosan készítettük. Az elért 16 %-os méréssorozatok közötti szórás ezért elfogadhatónak tartom. Más munkacsoportok szintén hasonló nagyságú külső variációt írtak le módszerük során (124,145).

A méréssorozaton belüli szórás ennél jóval kisebb volt, a koncentráció tartomány alsó, középső és felső részén sem érte el a 10 %-ot. Átlagos értéke 6KPGF-re a 31,2-250 pg/ml tartományban 9,1 %, TXB_2 -re a 62,5-1000 pg/ml koncentrációban 8,3 % volt (16. Táblázat). Nemzetközileg a 10 % alatti belső variációs koefficiens értékeket fogadják el, mely tehát technikánkban megfelelő volt.

Jó minőségű extrakciós eljárásra utal, hogy az extrakciós lépések során bevitt anyag, az ún. procedure blank gyakorlatilag elhanyagolható mértékű volt (3.7.4. pont).

A RIA fontos jellemzője a pontosság, reprodukálhatóság, mely a véletlen hibák nagyságáról tájékoztató adat; irodalmilag RIA eljárásoknál 5-6 %-ig fogadják el jó minőségűnek. A koncentráció tartomány alsó és felső végén a precízióprofil megemelkedik, így a 10 %-osnál kisebb variációs koefficienssel jellemezhető részt lehet korrekt méréstartományként elfogadni. A precízióprofil alapján az alsó határ 6KPGF mérésnél 11 pg/ml, TXB_2 meghatározásnál 70 mg/ml plazma koncentrációnál volt kijelölhető (ez a RIA extrakciós standardgörbéjén a 3,6 ill. a 14 pg/cső koncentrációnál lépett fel). Itt jegyzem meg, hogy a plazmában mért koncentrációkat mindig pg/ml egységben adtam meg, mely ugyan eltér az SI (pmol/l) egységtől, de a

használt RIA kitekben és az irodalomban is elterjedt, sok esetben még nem módosított a régi egység.

Plazmamintáink 6KPGF tartalma több esetben is alacsonyabb volt a 11 pg/ml szintnél, azonban a számításokból ezeket mégsem hagyhattam ki (pl. veszélyeztetett gyermekek), mert az az eredményt jobban meghamisította volna, mint az így fellépő pontatlanság. Normál, egészséges lakosság körében gyűjtött mintáinkban az ilyen alacsony szint nem volt jellemző.

Mintáink döntő többsége a módszerünkkel mérhetővé vált, és a méréstartományba esett. Feldolgozott mintáink 5 %-ában volt a 6KPGF szint túlzottan alacsony és értékelhetetlen (3 pg/ml-nél kisebb), míg a TXB₂ koncentrációt 1 %-ban találtuk túl magasnak (5000 pg/ml felett) vagy túl alacsonynak (15 pg/ml alatt, s ez esetenként aspirin vagy Colfarit szedésének következménye volt). Túlságosan magas (1200 pg/ml feletti) 6KPGF szintet egyetlen mintában sem mértünk.

Az általunk megállapított 6KPGF és TXB₂ szintek humán plazmában (melyeket majd a 4.2. pontban részletesen elemzek) egy nagyságrendbe estek a hasonló, C18-extrakcióval kombinált RIA eljárások eredményeként leközölt, és nemzetközileg döntően elfogadott koncentrációkkal (31,57,124,150). A vérvétel, mintakezelés és tárolás szempontjából hasonló, valamint a módszertanilag összevethető C18-extrakciós RIA meghatározás eredményeként N. Maurin a már idézett közleményében (124) 18-25 éves egészséges önkéntesek esetén 70-120 pg/ml-ben (átlag 92 pg/ml) határozta meg a 6KPGF szintjét. A TXB₂ méréshez etilacetáttal végzett 3-szori oldószeres extrakciót, a mi esetünkben ez szükségtelen volt, mivel a C18-extrakció megfelelő volt TXB₂-re is, így mindkét prosztanoidot egyazon módszerrel határoztuk meg. Maurin a Baker C18 oszlopon 80 %-os, reprodukálható visszanyerést tudott elérni. Bár ennek megfelelő hatásfokot értünk el mi is, Maurin módszere eltér a fázis minőségében, nem használ 10 %-os alkoholos és petroléteres mosást, 3 ml mintát visz az oszlopra és 7 ml etilacetáttal eluál, ill. más RIA kittel mér. Ennek ellenére a két módszer között nincsenek lényeges eltérések, bár a mi módszerünket vélem némileg precízebbnek. Megjegyzendő, hogy az említett közleményben a TXB₂-t más módon extrahálták, a meghatározott TXB₂ szintek mégis a miénkhöz hasonlóak voltak, 220-370 pg/ml (átlag 290 pg/ml). L. Roy, J. Mehta és P. Mehta munkacsoportja a nyolcvanas évek első felében számos tanulmányt leközölt, melyekben főként a PGI₂ érrendszeri szerepével foglalkoztak. C18-RIA módszerükkel az egészséges önkéntesek plazmái alapján az átlagos 6KPGF szintet 64 $\pm$ 14 pg/ml-re (n=23), a TXB₂-t 175 $\pm$ 35 pg/ml-re tették (185). Lényegében az általunk alkalmazottnak megfelelő módon végzett meghatározással R. J. T. Ouwendijk és munkatársai átlagosan 118 pg/ml TXB₂ szintet írtak le 17 egészséges felnőtt mintái alapján (163). A. V. Tokar és A. I. Negarae az Izinta RIA kittel végezte a mérést, s bár módszerüket

nem részletezték, 6KPGF-re 100, TXB₂-re 150 pg/ml körüli átlagos értéket kaptak 35-75 éves egészséges korosztályban (225). Az említett közleményekben megváltozott prosztanoid szinteket mutattak ki magasvérnyomás, májcirrhosis, trombocitosis és dohányzás esetén, mely utalhat e módszerek alkalmasságára és alkalmazhatóságára.

Annak oka, hogy más módszerekkel (HPLC-RIA, GC/MS) a fenti 6KPGF és TXB₂ koncentrációknál általában egy, esetleg két nagyságrenddel is alacsonyabb szinteket határoznak meg (43,145), a RIA-ban kifejlesztett antiszérum nem kellő specifikusságában kereshető. Ebben a nagyon alacsony koncentráció-tartományban nagyon nehéz pontosan mérni, s teljesen specifikus antitestet teljesen tisztán izolálni. Mintáink PG-tartalmának összemérésére HPLC vagy GC/MS módszerek valamelyikével nem volt lehetőségünk. Az alkalmazott eljárás mellett szól azonban az a tény is, hogy mi is és más kutatócsoportok is az egyes vizsgálati csoportok között tudtunk olyan különbségeket és összefüggéseket kimutatni, melyeket számos irodalmi tény alátámasztott, s melyekről bővebben a továbbiakban esik majd szó.

C18-extrakciós RIA módszerünk minőségellenőrzése során utolsóként a megbízhatósági vizsgálatra térek ki. Ennek lényege annak meghatározása, hogy a minta mért PG-tartalma mennyiben tér el annak valódi tartalmától. Mivel valódi kontroll szérum nem áll rendelkezésre, az ilyen esetben alkalmazható linearitás és paralellitás vizsgálatot végeztem el (3.7.6. pont). Kevert alaplazmához történő 6KPGF és TXB₂ standardok hozzáadása a mért prosztanoidok szintjét lineárisan növelte meg. Az egyenes meredeksége nem tért el jelentősen egytől (4-4 mérőssorozat alapján a meredekségek átlaga 0,974 és 0,995 volt 6KPGF és TXB₂ méréseknél). Ez azt mutatja, hogy az extrakció után az antiszérummal interferáló anyagok szintje minimális volt. A paralellitás vizsgálat a minták hígítása után a mért koncentrációcsökkenésből következtet a mérés megbízhatóságára, s szintén az interferáló komponensek mennyiségére ad felvilágosítást. Két minta négyféle hígítását (2-10-szeres) végeztem el, s megfelelő pufferes hígítású standardgörbéről olvastam le a koncentrációkat. A hígított minták mért értékének eltérése a várt értéktől a belső variációs koefficiens mértékét nem haladta meg sem a 6KPGF, sem a TXB₂ meghatározáskor.

A módszer minőségellenőrzése alapján úgy vélem, hogy sikerült egy jól alkalmazható, egyszerű tisztítási lépésekből álló, oldószertakarékos C18-extrakciós módszert kidolgozni, mely jól illeszthető volt az Izinta által készített 6KPGF és TXB₂ RIA tesztekhez. A viszonylag egyszerű extrakciós lépés elvégzése után a RIA kit jó hatásfokkal és minőséggel dolgozott. Az extrakció lehetővé tette e két eikozanoid szelektív kinyerését a bonyolult rendszert képviselő vérplazmából, s a 6KPGF szint méréséhez szükséges ötszörös dúsítást is lehetővé tette a RIA paramétereinek jelentős módosulása nélkül.

A módszer hátránya, hogy a 6KPGF mérésnél - a minta extrakció során történt ötszörös dúsítása után is - a mért koncentrációk zömmel a méréstartomány alsó szakaszára estek, ahol a RIA pontatlanabbá válik. A minta még nagyobb dúsítása (pl. tízszeresre) valószínűleg javítaná a minták mérhetőségét, de azt is alaposan meg kellene ebben az esetben vizsgálni, hogy a plazmaextraktum-háttér hogyan változtatná meg a RIA minőségét. Esetünkben mivel a vizsgálatok zöme gyermekeken történt, a levett vérmennyiség minimálisra csökkentése nagyon fontos szempont volt, s megelégedtünk a még megfelelő ötszörös dúsítással.

A fentiek ismeretében megvizsgáltuk a kidolgozott módszer gyakorlati alkalmazhatóságát különböző vizsgálati csoportok mintáinak feldolgozása során.

4.2. 6KPGF és TXB₂ szintek korai érlelmeszesedésben, prevenciós lehetőségek

Bár a múlt század közepétől megjelent tanulmányokban számos elképzelés látott napvilágot az érlelmeszesedés kialakulásának és kifejlődésének mechanizmusát illetően -, beleértve a hemodinamikai tényezők, bakteriális és virális patogének, zsírok, gyulladásos folyamatok szerepét -, az érlelmeszesedés a jelenleg leginkább elfogadott elképzelések szerint az érfalsérüléssel és a létrejött válaszreakciók sorozatával kezdődik. A humán atheroszklerózis lassan kifejlődő betegség, mely főként a nagy artériák intimális és szubintimális rétegét érinti. R. Ross és J. A. Glomset feltételezték, hogy az artériás endotélium sérülése a kiindulópont, az ismétlődő vagy folyamatos sérülésekkel a símaizomsejtek proliferációja, valamint a kötőszövet és a lipidek felhalmozódása következik be (183,184). Egyrészt az endotéliumból felszabaduló növekedési faktorok segítik elő a sejtszaporodást, más elképzelések szerint pedig a hiperkoleszterinémia a lipidakkumuláció és habossejt képződés kiváltó oka. Napjainkban egyre nagyobb teret nyer az érlelmeszesedés vírushipotézise is (146).

A normális funkciójú, intakt endotélium nontrombogén, gátolja a trombociták kitapadását. Az ép endotélium csak lamináris véráramlás esetén marad fenn, a véráramlás zavarai esetén (lelassult véráram vagy éppen a túl nagy nyírási igénybevétel, low/high shear stress) az endotél sejtszei sérülnek, s a trombociták először egy rétegben fedik be, majd az érfal többszöri sérülése következtében trombusok képződnek. Az érfalsérülés oka nem teljesen tisztázott, a véráramlás zavarain kívül a hipertenzió, vérelemezke faktorok, antigén-antitest komplexek, endotoxin, diétás problémák, dohányzás, anyagcsere zavarok, stressz, stb. is okként szerepelhetnek. A trombocita aggregációhoz számos mechanizmus hozzájárul: a külső kollagén, a véralvadási rendszer aktiválódása során szabaddá váló trombin, valamint a

trombocitákból felszabaduló szerotonin, ADP és TXA_2 mind-mind elősegíti a trombotikus folyamatot (210). A TXA_2 hatékony vérlemezke aggregátor és összehúzó anyag is egyben. Az aggregációt az intracelluláris kalcium mobilizálásával és a trombocitamembrán glükoprotein IIb-IIIa komplex receptorának konformációs változtatásával éri el, így szabaddá teszi a fibrinogén és von Willebrand faktor kötőhelyeket, s ezzel további trombociták megkötődését idézi elő (195). Az artériák koleszterin tartalma szintén növeli a kalcium permeabilitást és a TXB_2 szintet (199,212).

Az ismételt érfalsérülés lipidben gazdag atheroszklerotikus léziók kialakulását segíti elő, még normolipémiás egyedekben is. A lerakódott lipidek eltávolításáért az érfalba migráló monociták felelősek, de a zsírokkal megrakott habossejt makrofágok a plakkból már nem képesek eltávozni, sőt a belőlük felszabaduló vazoaktív faktorok (PGE_2 , szuperoxid anion) hozzájárulnak a folyamat súlyosbodásához.

Az érlemezsedésben a vérlemezkek aktiválódása mellett a koagulációs és a fibrinolitikus rendszer is fontos szerepet játszik. A trombin elősegíti a fibrin felszabadulását, mely a trombocita aggregátumot stabilizálja és állandósítja a trombuszt.

A trombociták szerepe az érlemezsedés kifejlődésében a fentiek alapján nagyon lényeges, amit az is igazol, hogy kis trombocitaszámú, azaz trombocitopénias nyulakban atheroszklerotikus léziók nem fejlődtek ki az érfal többszöri megsértése után sem (210).

A kiterjedt trombusok annyira megvastagodhatnak, hogy az érlument teljesen leszűkíthetik, a véráramlást elzárhatják (infarktus). Az érgörcs és a trombus-embolia szintén az atheroszklerotikus plakkok képződésének súlyos következménye.

Az endotelium felelős normál körülmények között az érfal relaxációjáért, ami megfigyelések szerint a plakkok kifejlődésével párhuzamosan csökken (22). Azért, hogy az endotelium meg tudja tartani az érfal nyugalmi helyzetét és a vér fluiditását, sejtei sokféle aktív anyagot szintetizálnak, nagy molekulákat, pl. fibronektint, plazminogén aktivátort, interleukin 1-et, és több kisebb tömegű növekedési faktort és egyéb anyagot, PGI_2 -t, endotél eredetű relaxációs faktort (EDRF, azaz nitrogén-monoxid, NO), endotelin-1-et, stb. (51,231). Ezeknek az anyagoknak a termelése intracelluláris messengerek (cAMP, cGMP, kalcium ionok) koncentrációjától függ, de feed-back hatás révén azok mennyiségére vissza is hatnak. Felszabadulásukat befolyásolja emellett az érfal egyéb sejtekkel történő kölcsönhatása (trombociták, leukociták) és a plazma komponensei (bradikinin, trombin, stb.).

A PGI_2 kiemelkedik az említett anyagok közül abban, hogy a vérlemezkek aggregációjának ma ismert leghatékonyabb gátlója, és erős vazodilatátor. Hatását az adenilát cikláz enzim aktiválásán keresztül fejti ki, és igen potens annak ellenére is,

hogy a cirkulációban gyorsan inaktiválódik (13,85,193). Meghatározott szintje ezért inkább a helyileg, az érszövetben felszabadult mennyiségére utal. Az érlelmeszesedés kezdetén koncentrációja átmenetileg emelkedik valamely kémiai vagy mechanikai stimulus hatására, majd a folyamat progressziójával a plakkok PGI_2 termelése lecsökken. Ebben fontos szerepet játszanak a felszabaduló lipidperoxidok (7,58,154,203). A PGI_2 termelő kapacitás az életkorral és számos más betegségben is csökken.

A PGI_2 több más jótékony hatással is rendelkezik. Ezek közül kiemelendő a símaizomsejtekben felhalmozott koleszterin-észterek hidrolíziséért felelős enzimek aktiválása, s a makrofágok koleszterin-észter akkumulációjának csökkentése, bizonyos növekedési faktorok gátlása (70,119). A trombusok fibrinartalmának oldódását a fibrinolízis növelésével segíti elő, illetve gátolja a trombociták fibrinogén kötőhelyeinek aktiválódását (143,144).

A trombociták alakváltozása (korong alakról tüskés gömbre), a szubendoteliumhoz tapadása, a szekréció és az aggregáció teljesen gátolható a vérlemezék PGI_2 előkezelésével. A PGI_2 a trombocita specifikus receptorához ($\text{PGE}_1/\text{PGI}_2$) kötődik, majd ennek következtében a sejten belüli cAMP szint emelkedik, s ez többek között bizonyos proteinek foszforilációját idézi elő a cAMP-függő protein kináz C-n keresztül. Ez a folyamat szintén részét képezi a vérlemezkefunkciók gátlásának és a PGI_2 sejtvédő hatásának (5,20,199).

Míg a PGI_2 kedvező hatásait döntően a cAMP szintjének emelésén keresztül fejti ki, az endotelium másik relaxáns anyaga, az EDRF az intracelluláris cGMP szintet emeli, s az aggregáción kívül a vérlemezke adhéziót gátolja jelentősen a sérült érfalhoz (231).

Élettani szempontból rendkívül fontos, hogy a PGI_2 és az EDRF potenciózzák egymás hatását (231).

Az érfal termel bizonyos érösszehúzó anyagokat is, melyek közül a 21 aminosavból felépülő endotelin-1 a tartós vérnyomásemelő tulajdonságával emelkedik ki, s szerepet játszhat a szívkoszorúér- és a bronhokonstriktor-tónus regulálásában. Ma még nem tisztázott, hogy az érfal miért termel valójában ilyen típusú anyagokat, s szerepük van-e az életveszélyes érfalsérülések gyors kijavításában és a hemosztázis fenntartásában (231). Bizonyos szerzők érfali TXA_2 termelést is kimutattak, melynek mennyisége a PGI_2 -nél három nagyságrenddel kisebbnek adódott (129). Nem zárható ki azonban, hogy a TXB_2 képződés az izolált -, esetleg atheroszklerotikus- érfalhoz tapadt vérlemezék miatt volt mérhető (46).

Az érlelmeszesedés szempontjából alapvető jelentőséggel bír az érfal-vérlemezke kölcsönhatás regulálásában és a homeosztázis fenntartásában a TXA_2 és a PGI_2 egyensúlya, mivel ezek biológiailag alapvetően ellentétes pólust képviselnek.

Általánosan elfogadott, hogy az olyan betegségekben, ahol tendencia mutatható ki a trombusok képződésére, a $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ arány eltolódik, megnő, vagy a PGI_2 csökkenése, vagy a TXA_2 emelkedése vagy mindkettő miatt; ugyanakkor a megnövekedett vérzési tendenciájú betegségekben az eltolódás ennek fordítottja (106,128,142,144).

Az aszpirinnel és egyéb nem szteroidális gyulladáscsökkentő szerekkel (NSAID) végzett állatkísérletek sikerei indukált érlelmeszesedésben azt jelzik, hogy a TXA_2 valóban lényeges szerepet játszik a trombusok kialakulásában (30,142). Ezt tükrözi az aszpirinterápia alkalmazásának statisztikája a koronáriainfarktus mortalitásának csökkenését illetően, illetve az instabil angina, a terhességi magasvérnyomás stb. kezelésében (165,231).

Az atheroszklerózis klinikai tüneteinek megjelenése esetén a trombociták féleletideje csökken, a plazma és/vagy a szérum TXA_2 metabolitok szintje vagy kiválasztása nő, míg az egyéb aktivitási faktorok (béta-tromboglobulin, 4-es vérlemezke faktor (PF4), PAF) koncentrációja és az in vitro aggregációs hajlam emelkedett vagy változatlan (112,165,205).

A felszabadult PGI_2 gyorsan metabolizálódik in vitro, a plazma proteinjei azonban képesek stabilizálni, így félelettartama jelentősen megnőhet. Bizonyos betegségekben azonban (TPP, akut miokardiális infarktus, diabetes) stabilitása jelentősen lecsökken, mely utal a hemosztatikus egyensúly megbomlására (206). A PGI_2 stabilitása szoros kapcsolatban van a plazma Apo A₁ (a HDL-koleszterin fő apolipoproteinje) szintjével (174,251).

Egyre több morfológiai tanulmány mutat rá, hogy az aorta és a szívkoszorúerek elváltozásai már gyermek sőt újszülöttkorban kimutathatók, az azonban nem bizonyított, hogy ezek az intima megvastagodással és habossejt felhalmozódással kísért zsíros csíkok alakulnak-e át később atheroszklerotikus plakkokká. Bizonyos azonban, hogy a második évtized felétől már jelentősen növekedett számban mutattak ki az aortában fibrotikus plakkokat és habossejt léziókat, jelentős lipid felhalmozódással és intima nekrozissal (1,12). A lipidlerakódás mind extra-, mind intracellulárisnak bizonyult. A koronáriákban a kórfolyamat később kezdődik, mint az aortában, de elváltozásai szintén fiatal korban kimutathatók.

Az érlelmeszesedés megelőzése tehát potenciális gyermekgyógyászati feladattá vált, beleértve a megbetegedés hajlamosító tényezőinek felmérését. Az érlelmeszesedés klasszikus felnőttkori rizikófaktorai gyermekkorban természetesen módosulhatnak, ezek megállapítása jelenleg vizsgálat tárgya.

Az olyan családokban, melyekben a veszélyeztető tényezők (hiperkoleszterinémia, magasvérnyomás, cukorbetegség stb.) halmozódnak, illetve az akut szív- és érrendszeri megbetegedés (koronáriainfarktus, agyvérzés stb.) fiatal korban vagy szintén halmozottan fordul elő, ott az utódokban is kimutathatóan nagyobb számban jelennek meg az érrendszerrel kapcsolatos rendellenességek. A betegségek kialakulásának megelőzésekor tehát érdemes és fontos súlyt fektetni a genetikailag veszélyeztetett helyzetben lévő gyermekek korai kiszűrésére (88,97).

Az érrendszeri homeosztázis fenntartásában megnyilvánuló szerepe miatt a PGI₂-TXA₂ rendszer gyermek- és ifjúkori változásairól gyűjtöttem adatokat, s megvizsgáltam az esetleges eltéréseket a családi anamnézistől függően. A fellelhető irodalomban egyetlen leírást találtam hasonló életkori szakaszokban végzett vizsgálatról. Ebben a PGI₂ enyhe csökkenését írták le születéstől felnőttkorig (93).

A vérplazmában a PGI₂ stabil metabolitjának, a 6KPGF-nek szintje a megvizsgált, érrendszeri megbetegedések szempontjából negatív családi anamnézisé, kontroll gyermekekben 3-19 ill. 20 életév között csak a fiúkban mutatott lényeges változást (20,21. Táblázat). A lányokban a serdülőkor idején (12-15 év) a 6KPGF szintje csak minimálisan emelkedett, pedig ebben a korban a nemi hormonok szintje hirtelen emelkedik. A nőkben az endogén ösztrogén szintet teszik felelőssé az atheroszklerózis kisebb kockázatáért, mivel menopauzában a megbetegedések gyakoribbá válnak (46). Az ösztrogén növeli a PG-ok szintéziséért felelős ciklooxygenáz enzim aktivitását, s ezúton az *in vivo* PGI₂ aktivitást, mely alátámasztja antiatherogén hatását. A PGI₂ szint regulálásában a ciklooxygenáz enzim tűnik sebességmeghatározónak (148).

A nemi érés során a fiúkban is enyhén megemelkedett a 6KPGF szint. Bizonyos tanulmányok a férfiakban a tesztoszteron szint és az érlelmeszedés rizikófaktorai ill. a megbetegedés gyakorisága között fordított kapcsolatot tudtak kimutatni (6). Az emelkedett tesztoszteron magasabb HDL-koleszterin szinttel járt együtt, a HDL pedig, mint említettem a PGI₂-t stabilizálja, s ez emelkedett szintet eredményezhet. Mindez felnőtt lakosságra volt igaz. Pubertáskorban azonban a PGI₂ stabilizálásában szerepet játszó HDL és a tesztoszteron szint között fordított kapcsolatot mutattak ki (12). A tesztoszteron PG-anyagcserére gyakorolt hatása tehát ellentmondásos, függhet az életkortól, s itt fontos megemlíteni, hogy az *in vitro* és az *in vivo* vizsgálatok eredményei sokszor ellentétesek lehetnek. Érdemes e helyen megjegyezni azt is, hogy míg a nőkben az ösztrogént védőfaktornak tartják, a férfiaknak külsőleg adott ösztrogén növelte a megbetegedés kockázatát, s ugyanilyen hatásúak lehetnek az ösztrogén és progeszteron tartalmú fogamzásgátlószerek (113). A progeszteront PG szintézist gátló hormonnak tartják (169).

A pubertáskor után a második évtized végéig a fiúkban jelentős csökkenést lehetett kimutatni a 6KPGF plazma koncentrációjában. Ennek feltételezhetően okai lehetnek a fiúkban fokozottan jelentkező érfali elváltozások. A megnövekedett lipidszállítás az intimába fokozott lipidperoxidációval társul, s a lipidperoxidok a PGI_2 szintetáz enzim ellenségei (58,154). A lipidperoxidok jelentős része az LDL-koleszterin módosult, oxidált formájában található (220). A folyamat az életkor előrehaladásával fokozódik és a kifejtett atheroszklerotikus plakkokban PGI_2 termelés már nem történik (7,203). A 6KPGF szint átmeneti emelkedése a serdülőkorban szintén felfogható e folyamat részeként, mintegy kompenzációs mechanizmus részeként. Átmeneti PGI_2 emelkedést az érlelmeszedés kezdeti szakaszában kísérletileg kimutattak, mely az aktiválódott vérlemezkékből felszabaduló faktorok (szerotonin /5-hidroxi-triptamin/, PAF és egyébek) aktiváló hatásának következménye is lehet (144,231). Valószínűnek tartom, hogy ez a mechanizmus erősebben érvényesül, mint a hormonális befolyás. Az, hogy a fiúkban a serdülőkor után a 6KPGF szint jelentős csökkenését lehetett kimutatni, mindenképpen utalhat az erősebb nemnél a nemi érés felépő veszélyeztetettségére a PGI_2 anyagcsere vonatkozásában.

A TXB_2 szinteket hasonlóan megvizsgálva a kontroll fiúkban enyhe, fokozatos csökkenést tapasztaltunk, a leányokban viszont ez a csökkenés sokkal jelentősebb, szignifikáns volt (20,21. Táblázat). Világirodalmi adatok a TXA_2 metabolitok szintjében általában kor és nem tekintében nem írnak le lényeges különbséget. Újszülöttekben az élet 3-5. napján tapasztalták a TXA_2 metabolit kiválasztásának növekedését, illetve hogy a kiválasztott mennyiség három éves korban összevethető a felnőttkori értékkel (41). Ez nem mond ellent saját eredményeinknek, mert a vizsgálatokat három éves, vagy annál idősebb gyermekekben végeztük, s felnőttekben, idős korban mi is magasabb TXB_2 szinteket mértünk (24 és 26. Táblázat), az emelkedés azonban nem volt matematikailag lényeges mértékű. A TXB_2 szint kisebb-nagyobb mértékű emelkedéséről felnőttekben az emelkedő életkorral több kutatócsoport is beszámolt (124,225).

Eredményünk, hogy a plazma TXB_2 szint a lányokban jelentősen csökkent a második évtizedben, valószínűleg nem a hormonális változások közvetlen következménye. Az ösztrogén, bár az érfali ciklooxygenáz enzimet aktiválja, a vérlemezkékben nem növelte a TXA_2 -termelést (148). A PGI_2 gátolja a vérlemezke foszfolipáz és ciklooxygenáz működését, ezáltal csökkenti a TXA_2 felszabadulást és a vérlemezke aktivitást (104,121). Valószínűnek tartom, hogy a PGI_2 ezen hatása - valamilyen mechanizmus révén - a leányokban jobban érvényesül ugyanakkora plazmaszintek esetén.

A nemi változások különbözősége ellenére a kontroll leányok és fiúk között lényeges nemi differenciát egyik korcsoportban sem találtunk sem a 6KPGF, sem a TXB₂ szintekben, sem a következőkben tárgyalandó TX/6K arányban.

Mivel a PGI₂-TXA₂ közötti egyensúly járul hozzá ahhoz, hogy a nyugalmi értónus fennmaradjon, a TX/6K arány kiszámítása is hasznos információt adhat. A kislányokban az arány enyhén magasabb volt, mint a hasonló korú fiúkban, azonban az életkorral fokozatosan csökkent, s ez főként a TXB₂ szint csökkenésének volt köszönhető. Fiúkban a TX/6K arány változása ettől eltért, a serdülőkorig szintén csökkent, azonban a 17-20 éves fiúkban már megemelkedett, magasabb lett, mint a lányokban, a 6KPGF erős csökkenésének következtében. Az ifjú fiatalemberekben megmutatkozó kedvezőtlen tendencia a TX/6K arány eltolódásában, összefügghet a férfiakban lipid-, vérnyomás- és egyéb oldalról (későbbiekben) megnyilvánuló természetesen nagyobb rizikóval.

Megfigyelhető, hogy a serdülőkor előtt, ha nem is jelentős mértékben, de a fiúkban volt enyhén magasabb a 6KPGF szint, s ezáltal kedvezőbb a TX/6K arány. A mért magasabb 6KPGF szint összefügghet azzal, hogy ebben az életkorban a fiúkban a HDL-koleszterin szint enyhén magasabb, mint a leányokban, majd kb. 13 éves kor után ez a fiúkban a lányok - nagyjából változatlan - szintje alá csökken (78,98). Ezt egyébként saját vizsgálataink is alátámasztják. A fehérbőrű fiúgyermekekben egyébként az összkoleszterin szint is alacsonyabb, s főként a diasztolés vérnyomás is kedvezőbb, mint a lányokban (12). A második évtized végére azonban minden említett paraméter kedvezőtlen irányba tolódik el, s a fiatal férfiak kedvezőtlenebb helyzetbe kerülnek nőtársaiknál.

Bár eredményünk időközben némileg módosult, a 3-18 éves kontroll fiúk és leányok 6KPGF és TXB₂ szintjeiről és eloszlásgörbéiről megjelent tanulmányainkban részletesen beszámoltunk (132,133).

A kórházunkban folyó szűrővizsgálat sokkal teljesebb volt annál, mint amit e dolgozatban lehetséges kifejtetni, s ami szorosan a prosztanoid anyagcseréhez kapcsolódik. Részletes eredményekről ezért nincs módomban beszámolni, röviden azonban mindenképpen szükséges foglalkozni - a PG szintekre gyakorolt jelentős befolyása miatt - a különböző atherogén illetve antiatherogén lipoprotein koleszterin-frakciók megoszlásával. Mint ahogy a két fő érrendszeri prosztanoid, a TXA₂ és a PGI₂ arányát, egyensúlyát tekintik általában elsődlegesnek az érfali elváltozásokban, ugyanúgy a különféle koleszterin-frakciók közül az LDL- és a HDL-koleszterin szintek arányát, vagy az ezzel rokon AI-et, tartják fontosnak az érlemezésedés kórfolyamatában, pl. az érfali lipidakkumulációban. Míg a koleszterin sejtbe történő

beáramlásáért (influx) az LDL felelős, a lipidek eltávolításában a HDL-koleszterinnek jut lényeges szerep.

A kontroll leányokban 3-19 éves kor között a TX/6K arány bemutatott csökkenésével ellentétesen változott az atherogén hajlamot tükröző AI, mivel az folyamatosan nőtt. Ennek oka a leányokban az életkorral emelkedő összkoleszterin szint, s mivel a szintje magasabb volt, mint a fiúkban, emellett a HDL kb. 14 éves korig a fiúkénál valamivel alacsonyabb, így az AI a lányokban magasabb volt.

Fiúkban az AI alacsonyabb szintről indult, a serdülőkorban alig emelkedett, viszont azután lényegesen megugrott, s gyakorlatilag elérte a leányokét. Az utóbbi emelkedésnek fő oka -az összkoleszterin enyhe, fokozatos emelkedésén túl- a HDL lényeges csökkenése, melyet mi is tapasztaltunk, és egyezik az irodalomban közölt adatokkal (12,98). Az érdekesség az, hogy a leányokban az AI fokozatos növekedését a TX/6K arány csökkenése képes mintegy kompenzálni; egymással ellentétesen változnak a serdülőkor után is. A leányokban a TXB₂ szint csökkenése és az összkoleszterin szint növekedése között szoros kapcsolatot találtunk (134). Az összkoleszterin emelkedése az LDL-koleszterinnek volt köszönhető. A fiúkban a megváltozott nemi hormon szintek miatt csökken le valószínűleg a HDL (98), ezután pedig a PGI₂ termelés, ill. a lányokénál fokozottabb érfa oxidációs folyamatok is jelentőssé válnak. A TX/6K és az AI együttes növekedése a fiúkban még fokozottabban utal a két nem közötti lényeges differenciára a nemi érése után.

A prosztanoid- és a lipidmetabolizmus összefüggései egyáltalán nem egyértelműek, ezért szinte minden felmerülő kapcsolatra lehet találni érvet és ellenérvet is. Számos tanulmány írt le, esetleg direkt összefüggést a 6KPGF és a HDL szintek között, alátámasztva ezt a HDL PGI₂-t stabilizáló, és felszabadulását segítő hatásával (109,215). Bizonyos esetekben a HDL-koleszterin TXA₂ felszabadulást gátló hatását is kimutatták (10), ezzel közvetlenül felelőssé téve a TX/6K arány csökkenéséért. A PGI₂ gátolja a trombociták TXA₂ termelését (104,121). Így lehetséges, hogy a lányokban a HDL és a PGI₂ védő hatásának következtében a vérlemezkék aktiválódása, s a felszabadult TXA₂ szintje csökken. Az LDL-koleszterinről általában azt tartják, hogy a vérlemezkék TXA₂ termelését növeli, azonban ennek ellentmondó eredmények is születtek (11,53), s a kontroll leányokban mi is hasonlóra következtettünk (134). Az oxidált LDL PGI₂ stimuláló hatását is leírták érendotél sejtekben (227). Általában fontos szerepe van annak, hogy a különböző koleszterin-frakciók egészséges vagy beteg emberből származnak (pl. mennyire módosult /oxidált/ formában van a lipoprotein), egészséges vagy beteg plazma prosztanoid termelését vizsgálják (egyéb plazmakomponensek jelenléte) és a kísérlet egyéb körülményei is lényegesek (11). A nők LDL-je általában kisebb sűrűségű, kevésbé atherogén frakciókat is jelentős mértékben tartalmaz, s ez a kapott eredményt

(pl. TXA_2 felszabadulás) jelentősen befolyásolhatja (9,138). Fentiek ismeretében nehéz következtetéseket levonni a prosztanoidok és a lipoproteinek szintje közötti összefüggésekre ebben a kevésbé vizsgált korosztályban.

Itt jegyzem meg, hogy a szérumban triglicerid szint emelkedését okozó rendellenességek nem fordultak elő számottevő mértékben sem a kontroll, sem a továbbiakban tárgyalandó veszélyeztetett gyermekekben, így, bár a trigliceridek is befolyásolhatják a prosztanoid szinteket, ezzel gyakorlatilag ebben az életkorban nem kell számolni ritka eseteket kivéve. Ezt azért is tartom fontosnak megjegyezni, mert az utóbbi időben az emelkedett triglicerid szintet felnőttekben, főként a nőkben független rizikótényezőként tartják számon.

A kontroll 3-19 ill. 20 éves korosztály átlagos 6KPGF és TXB_2 szintjének meghatározása bár önmagában is érdekes, fő célja a szűrővizsgálatban való felhasználása volt, a fiatalkori akut miokardiális infarktuson átesett szülők gyermekeiben már korán kimutatható esetleges rendellenességek kiszűréséhez szolgált kontroll értéként. Az átlagos kontroll értékek, és az érlelmeszesedés szempontjából veszélyeztetettnek tartott, pozitív családi anamnézisű hasonló korú gyermekek vizsgált prosztanoid szintjei a 22. Táblázatban szerepelnek. Életkori bontásban a kapott különbségeket nem mutatom be, mivel a részletes eredmények a szűrővizsgálatot vezető Mihai főorvosnő összefoglaló disszertációjában kerülnek majd bemutatásra (ill. már jelentek meg publikációkban), s a 3.8.2. pontban csak az általam különböző előadásokon bemutatott részeredményeket foglaltam össze.

Legfontosabb eredményünk, hogy mind a fiúkban, mind a lányokban a 6KPGF szint erőteljes csökkenését lehetett megfigyelni a kontroll értékhez képest. Rendre $38,7 \pm 3,5$ vs. $67,9 \pm 5,4$ pg/ml a fiúkban és $38,4 \pm 3,4$ vs. $52,7 \pm 4,8$ pg/ml a lányokban. Mindkét nemből statisztikailag szignifikáns volt az eltérés, de a fiúkban még kifejezettebb volt ($p < 0,001$). A családi anamnézis a TXB_2 szinteket gyakorlatilag nem befolyásolta.

A 6KPGF szint csökkenése, és ezzel a TX/6K arány eltolódása a 6KPGF anyagcserében mutatózó kóros változásokra enged következtetni. A 6KPGF szint csökkenésének oka a kisebb PGI_2 szintézisben vagy a túlzott degradációban kereshető. Mivel a korábbiakban már részleteztem bizonyos tényezők PGI_2 anyagcseréjére gyakorolt hatásait, így ezekre a továbbiakban csak utalok. A PGI_2 szintézisben résztvevő enzimek pl. ciklooxygenáz defektusa is szerepet játszhat, de valószínűbbnek tartom, hogy a veszélyeztetett gyermekekben kimutatható lipid rendellenességek (kórosan magasabb összkoleszterin és kisebb HDL szint) és fokozott lipidperoxidáció (ox-LDL) a PGI_2 -szintetáz gátlását okozhatja. A

veszélyeztetett családok gyermekeiben kimutathatóan magasabb volt a lipidperoxidok szintje, s ez korrelációban volt a TX/6K arány növekedésével (217,218). A fokozott lipidperoxidáció már önmagában is csökkent PGI_2 szinthez vezethet, s ehhez még hozzájárulhat a veszélyeztetett gyermekekben általunk szintén kimutatott HDL-koleszterin csökkenés, mely a PGI_2 kisebb stabilitásához, így fokozott degradációjához vezethet (170).

Az, hogy a veszélyeztetett fiúkban a 6KPGF deficiencia még erősebb volt, mint a lányokban, ezen a ponton is a nők kedvezőbb helyzetét mutatja.

A kontroll gyermekek 6KPGF szintje alapján kijelölhető, kritikusan alacsonynak tartott 10 percentiles küszöbérték leányokban 11,3 , fiúkban 14,3 pg/ml volt. A küszöbértéknél kisebb 6KPGF szintek a veszélyeztetett gyermekekben másfél-kétszer olyan gyakoriak voltak, mint a kontrollokban (23. Táblázat). Ugyanezt tapasztaltuk a TXB_2 szintek vizsgálatakor a felső 10, azaz 90 percentiles szintet kijelölve a kontrollok alapján. Ez a felső küszöbérték a leányokban 409, a fiúkban 430 pg/ml volt.

A fiatalkori infarktusos családok utódainak szűrővizsgálatában helye van a PGI_2 - TXA_2 rendszer tanulmányozásának, melyet röviden ismertetett eredményeink is alátámasztanak. A 6KPGF szint erős csökkenése a veszélyeztetett leányokban és fiúkban az érfal csökkent PGI_2 -termelésére vagy kisebb stabilitására utalhat, ezáltal az endotélium könnyebben károsodhat és valószínűleg károsodik is ezekben a gyermekekben.

Bécsben I. Virgolini és H. Sinzinger munkacsoportja 1984-1989 között PG-szűrést végzett 2800 személyen (234,235). Megállapították, hogy a PG-rendszer valamely rendellenességét mutató személyek 75 %-a már meglehetősen fiatalon klinikai tüneteket mutató érrendszeri betegségben szenvedett. A rendellenességek legnagyobb (45) százalékban a PGI_2 szintézis zavarai adódtak, míg 10 %-ban fordult elő annak csökkent stabilitása. Minden tizedik rendellenesség a TXA_2 -szintetáz tökéletlen működéséből fakadt.

Saját vizsgálati eredményeink összeegyeztethetők a bécsi atheroszklerózis-kutató munkacsoport tapasztalataival, sajnos a veszélyeztetett családok utódaiban mi is a 6KPGF szint csökkenését tartjuk legjellemzőbbnek, de a kiugróan magas TXB_2 szintek is gyakoribbak ezekben a gyermekekben, sőt kifejezetten alacsony szinteket is találtunk. Az idézett munkacsoport szerint a PGI_2 szintézis és lebomlás zavarai lehetnek familiárisak, nem familiárisak vagy veleszületettek. Mi jelentősnek tartjuk a familiáris érintettséget a fiatalkori infarktusos családokban. Ezt alátámasztja az az összefüggés is, - melynek részletes ismertetése ugyan meghaladja e dolgozat kereteit, - melyet a beteg szülő és gyermekei 6KPGF szintjei között tapasztaltunk. A beteg szülő és mindkét nemű gyermekeinek 6KPGF szintje egymással szignifikáns összefüggést mutatott (130). Ez az összefüggés genetikai meghatározottságra utal, azonban

természetesen hozzájárulhatnak a család összes tagját érintő helytelen táplálkozási szokások is. Az atherogén jellegű diéta a veszélyeztetett családokban a fokozott hajlam miatt nagyon káros lehet, ezért ezekben a családokban mindenképpen diétás megszorítás javasolt.

A komplex szűrővizsgálatról az érdeklődő majd dr. Mihai Klára folyamatban lévő nagydoktori disszertációjában olvashat, a témakörben megjelent publikációk (a már említetteken túl) a dolgozat végén megtalálhatók, a jegyzék tartalmazza a Budapesten dr. Szamosi Tamás vezetésével történő hasonló szűrőprogram eredményeit is, melyben szintén részt vettünk (131,135,217,218).

Az élet első két évtizedében a fentiekben vázolt változások és eltolódások kimutatása a PGI_2 és TXA_2 anyagcserét illetően meglehetősen újszerű. Természetesen a változásokat meghatározó, azokat előidéző mechanizmusok nem pontosan tisztázottak. A koleszterin és egyéb lipidek PG-anyagcserére gyakorolt hatása ma már bizonyított, de korántsem mentes az ellentmondásoktól.

A felnőttkori érrendszeri megbetegedések jelentős részénél kimutatták a koleszterin szint emelkedését és a TXA_2 cirkulációban mért, vagy kiválasztott metabolitjainak magasabb szintjét. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a trombociták és egyéb sejtek lipidtartalmának növekedése közvetlenül vagy közvetve a trombociták aktiválódását okozza, s ezért fokozott TXA_2 felszabadulás történik (10,11,165).

Mivel ebben a témában a világirodalmi adatok is viszonylag egységesek, kicsit a mérési módszer megbízhatóságának ellenőrzésére és a korábban leírt eredményeink alátámasztására, mi is megvizsgáltuk, hogy a felnőttkorú önkénteseinkben van-e kimutatható kapcsolat az összkoleszterin szint és a TXB_2 plazmában mért koncentrációja között. Normo- és hiperkoleszterinémiás önkéntesek adatait is feldolgoztuk, hogy az összkoleszterin szint minél szélesebb tartományt lefedjen, s így a TXB_2 -vel való összefüggés jól értékelhető legyen. Az összkoleszterin és az atherogén koleszterin-frakciók aránya (AI) a férfiakban enyhén magasabb volt, a TXB_2 szint viszont gyakorlatilag egyező volt (24. Táblázat, (172)). Ezek az eredmények az irodalom által elfogadottnak megfelelőek (98,124,138,225). Elvárásainknak megfelelően ezen túlmenően szoros pozitív összefüggést kaptunk a felnőtt lakosság összkoleszterin és TXB_2 szintje között mindkét nemből, mely a férfiakban volt az erősebb.

Az AI a TXB_2 -vel nem mutatott pozitív összefüggést a férfiakban, csak a nőkben. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy a nőkben az atherogén és az antiatherogén

koleszterin-frakciók aránya erősebben befolyásolhatja a trombociták aktivitását, mint a férfiakban, akikben inkább az összkoleszterin szint lehet a meghatározó. Érdekes ezt összevetni azokkal az ismeretekkel, melyek szerint az összkoleszterin szint ugyan nagyon fontos rizikófaktor az érrendszeri megbetegedésekben, de a nőkben talán a HDL-koleszterin szint csökkenése a legfontosabb veszélyeztető tényező. A HDL sokkal meghatározóbb szerepű nőkben, mint férfiakban (138).

Nem elhanyagolható az a tény sem, hogy magának az LDL-koleszterinnek sem egyforma a szerkezete. A nőkben több a kevésbé atherogén LDL partikulák száma, mint a férfiakban, tehát az összkoleszterin szint emelkedése a nőkben ezért is kevésbé veszélyes lehet (az összkoleszterin természetesen a magasabb HDL miatt is emelkedik).

Közvetlenül a HDL és a TXB_2 között nem volt összefüggés, melyben az is közrejátszhat, hogy a HDL szintek nem mozogtak széles skálán.

Az összkoleszterin és az AI a $TX/6K$ aránnyal is szoros pozitív összefüggést mutatott, mely az eikozanoidokban és a lipidekben kimutatható atherogén hajlam együttes megjelenésére utal. A korreláció valamivel gyengébb volt, mint pusztán a TXB_2 -vel való kapcsolat.

A $6KPGF$ szint a felnőttekben a fiatalokéval összeegyeztethető volt, átlagosan 50 pg/ml körüli (3.8.3. pont). Nem mutatott szignifikáns korrelációt sem az összkoleszterinnel, sem az AI-szel, sem a HDL-lel. A $6KPGF$ és a HDL közötti kapcsolat enyhén pozitív volt a férfiakban, ahogy ez a várakozásunknak megfelelt, nőkben azonban a kapcsolat negatív tendenciát mutatott. Az összefüggés nem volt matematikailag szignifikáns, mégis utalhat a férfiakban és a nőkben eltérő érési mechanizmusokra. Nem zárható ki, hogy az eredmények nagyobb vizsgálatszám esetén módosulnának.

A TXB_2 szint összefüggése az összkoleszterinnel és az AI-szel további bizonyítékot szolgáltat a PG- és a lipidanyagcsere kapcsolatára. Eredményeink alapján feltehető, hogy az érlelmeszesedés folyamatában tapasztalt trombocita aktiválódás nemek szerint eltérő, férfiakban az összkoleszterinnel, nőkben pedig főként az atherogén koleszterin-frakciók túlsúlyával hozható kapcsolatba.

A PGI_2 - TXA_2 rendszer a szív- és érrendszeri kutatások szerteágazó fejlődése ellenére továbbra is elismerten nagy jelentőségű. Számos megbetegedésben megfigyeltek fokozott vérlemezke aktivitást, érési elváltozásokat, az érlelmeszesedés klasszikus rizikófaktorainak emelkedését, ezért a betegségek gyógyítása ezeknek a rendellenességeknek a kezelésére irányul. Nagyon sokféle gyógyszer és gyógyhatású készítmény létezik, mely éppen a PGI_2 - TXA_2 rendszer atherogén, trombotikus irányú

eltolódását igyekszik az egyensúly felé visszabillenteni. Ilyenek a vérlemezke inhibitorok, melyek vagy közvetlenül az AA kaszkádon belül okoznak gátlást, vagy a trombociták cAMP szintjét emelik, vagy a trombin képződést akadályozzák meg (210).

Az első csoportba tartozó anyagok közül talán legismertebb az aszpirin (ASA), mely a trombociták ciklooxygenáz enzimének acetilálásán keresztül gátolja a TXA₂ képződést. Naponta kb. 1 mg/kg aszpirin szedése folyamatosan gátolja a trombocita ciklooxygenázt, míg az endoteliális PGI₂ szintézis gyakorlatilag zavartalan, és ilyen koncentrációban a gyomor nyálkahártyájára sem fejt ki izgató hatást (96). Az ASA jótékony hatásairól számos irodalom áll rendelkezésre, sok esetben sikeresen alkalmazzák a betegek kezelésében és a megelőzésben is (17,165,210).

A TXA₂ termelést gátolni lehet még a TXA₂ szintetáz inhibitoraival (imidazol, dazoxiben), illetve viszonylag új lehetőséget jelent a képződött TXA₂ kifejeződésének gátlása a vérlemezkek TXA₂/PGH₂ receptorain keresztül (sulotroban, daltroban). A TXA₂/PGH₂ receptorok száma akut miokardiális infarktusos betegekben nagyobb, ezért a receptor-antagonisták alkalmazása ígéretes lehet (34).

A PGI₂-TXA₂ arány javításának másik oldala a PGI₂ szintjének növelése. Ennek legkézenfekvőbb módja, az intravénás PGI₂ infúzió azonban nem okozott átütő sikereket, hatása korlátozott és ideiglenes volt (168,210,221), másrészt orálisan bomlékonysága miatt nem volt adható. Jelenleg is folynak azonban a kutatások a PGI₂ kémiaiailag stabil, de biológiai hatásaiban hasonló tulajdonságú analógjaival (iloprost, karbacyclin, cicaprost, 7-oxo-PGI₂, stb.), de az igazán megfelelő vegyület megtalálása még várat magára (144,155,162,240). PGI₂ analógokat állítottak elő és vizsgáltak a Chinoin Gyógyszerárugyárban is (119,207). Problémát jelent, hogy az ischémiás szívbetegségben valószínűleg nem csak a PGI₂ felszabadulás csökken, hanem a trombociták PGE₁/PGI₂ receptorai is kevésbé aktívak (94).

Az *in vivo* PGI₂ szintézist nagyon sokféle kémiai anyag befolyásolja (szteroidok, diuretikumok, vitaminok, stb.), ezek különböző összefoglaló tanulmányokban részletesen szerepelnek (17,144,231).

A rövidség kedvéért csak emlékeztetni szeretnék arra, hogy a jelenleg egyre szélesebb körben alkalmazott kalcium-csatorna blokkoló szerek (verapamil, nifedipin, stb.) szintén befolyásolhatják az eikozanoidok anyagcseréjét (95,228). Ezek a terápiás szerek blokkolják a szív- és érsejtekbe történő kalcium beáramlást. Az összefüggés felvetése azért is helytálló, mert a Ca-csatorna gátlóinak jótékony hatásai között szerepel az érfal-vérlemezke kölcsönhatás csökkentése, a membránfunkciók javítása és a sejtek LDL-felvételének csökkentése (194). Sok érösszehúzódást okozó hormon (vazopresszin, angiotenzin II) és a TXA₂ is az intracelluláris Ca-ion szinteket emeli.

Az érfal fő relaxáns anyagai, a PGI₂ és az EDRF, a cAMP és a cGMP szint emelésén keresztül végeredményben az intracelluláris kalcium szintet csökkentik (2). Az, hogy a PGI₂ és az NO szinergetikus hatású, felveti együttes alkalmazásuk lehetőségét. Állatkísérletek eredményei bizonyítják az együtt adott PGI₂ analóg, iloprost és az NO-donor, molsidomin jótékony hatását miokardiális ischémiából eredő mortalitásra és túlélési időre (68).

Leszögezhetjük tehát, hogy a prosztanoidok mérésére és vizsgálatára a jövőben is szükség lesz a farmakológiai és más jellegű kezelések követésekor illetve azok hatékonyságának ellenőrzésénél, kiegészítve természetesen lipid, aggregációs és egyéb meghatározásokkal.

Laboratóriumunk egyetlen hasonló jellegű kísérletben vett részt, a Kiskunfélegyházi Városi Kórházzal együttműködésben. Természetes táplálékkal, halhússal végzett diéta hatását vizsgáltuk a résztvevők bizonyos, az érrendszeri megbetegedésekkel kapcsolatos paramétereire, s annak kedvező hatását is tapasztaltuk.

Sok országban már kismértékű halfogyasztás is csökkentette a koszorúér megbetegedés gyakoriságát. A halhús és a különböző halolaj készítmények az esszenciális n-3 politelítetlen zsírsavak gazdag forrásai. Az n-3 zsírsavakat vízben élő állatok húzában lehet csupán megtalálni; ugyanakkor a sejtmembrán fontos alkotórészei, ezáltal nélkülözhetetlenek a normális sejtfunkciók fenntartásához (99,197). Egy számomra nagyon meggyőző tanulmány szerint a nyugati fejlett országok többségének táplálkozása igen szegény n-3 zsírsavakban ahhoz a diétához képest, melyen az ember evolúciója történt és amelyre genetikája alapozva van (201). Ez Magyarországra is érvényes.

A két legfontosabb n-3 politelítetlen zsírsav az eikozapentaénsav (EPA, 20:5 n-3) és a dokozahexaénsav (DHA, 22:6 n-3). Az n-3 zsírsavak a szérum triglicerid (TG) szintet jelentős mértékben és rövid idő alatt csökkentik, valószínűleg a máj VLDL szintézisének gátlásával és a vékonybélben a kilomikron-TG képződés csökkentésével (87). Ezen legfontosabbnak tartott hatásán túl a hal(olaj)fogyasztás további atheroszklerotikus rizikófaktorokat is kedvezően befolyásol. A hal(olaj) hatására történő vérnyomáscsökkenés, a vérlemezke aktivitás, a fibrinogén szint és a vérviszkozitás csökkenése jól dokumentált és különböző összefoglalókban is kiértékeltek (76,100,149). A halolajak hatása a koleszterin metabolizmusra nem egyértelmű, jótékony hatását nagyobb koncentrációban és hosszabb terápiában fejtik ki (76,192,248).

A hal illetve a halolaj hatása a kapott eredményekre (azonos időtartam és n-3 koncentráció esetén is) különböző lehet, pl. a busa (0,4-1,2 kg/hét) fogyasztása már három hét alatt jelentős csökkenést okozott az AI-ben primer hiperkoleszterinémias betegekben (91).

Ugyanezt tapasztaltuk a 3.8.4. pontban bemutatott kísérletünk során is, melyben az AI átlagosan 19 %-kal csökkent. Ennek oka lehet, hogy a vizsgált csoport napi koleszterin és telített zsír felvétele csökkent a kísérlet idején, azokat a busaételek részben helyettesítették. Másrészt az EPA felszívódása a halhúsból hatékonyabb lehet, mint a halolajakból (200). Lehetséges, hogy a halban lévő más egyéb komponensek is szerepet játszanak illetve a zsírsavak természetes környezete (pl. antioxidánsok) megváltozik az izolált olajokban (69).

Természetesen érdekesnek tűnt a hal(olaj)ak vérelemzke aggregációra kifejtett kedvező hatásai miatt megvizsgálni a busa PGI_2 - TXA_2 rendszerre illetve a szérum TXB_2 szintre kifejtett hatását.

A busakúra kétféle adagja (1,0 és 1,8 kg/hét, mely megfelelt 1,2 és 0,6 illetve 2,2 és 1,1 g/nap EPA és DHA bevitelnek) között ennél a viszonylag kis esetszámnál (n=30) nem találtunk az eredményekben lényeges különbséget. A napi EPA bevitel kisebb volt az átlagos irodalmi értéknél (5-6 g n-3 zsírsav naponta, tartomány 1-30 g/nap) (76).

A plazmában mérhető 6KPGF és TXB_2 szintek a kúra végén gyakorlatilag változatlanok voltak (26. Táblázat), s ez az irodalmi adatok többségével egyező eredmény. Az EPA-ból a 3 telítetlen kötést tartalmazó, 3-as szériájú prosztanoidok képződnek, tehát PGI_3 és TXA_3 . A PGI_3 a PGI_2 -vel csaknem azonos biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, míg a TXA_3 sokkal kisebb mértékben okoz vérelemzke aggregációt. Így a vérelemzkek sokkal kevésbé lesznek hajlamosak az egymáshoz és az érfalhoz tapadásra, és az érfal rezisztenciája fennmarad. Az eikozanoidok termelődésében történő eltolódás adja egyébként a legkézenfekvőbb magyarázatot arra, hogy a sok halat fogyasztók körében miért sokkal kevésbé gyakori a szívbetegség (231).

Nagyon fontosnak tartom, hogy a busafogyasztás hatására az inkubált szérumban felszabadult TXB_2 mennyiség jelentősen csökkent, mely a vérelemzkek TXA_2 -termelő kapacitásának csökkenésére utal. a szérum TXB_2 szint 513 ± 186 ng/ml-ről 375 ± 146 ng/ml-re csökkent (-27 %, $p < 0,01$). A kiindulási szérum TXB_2 szint összevethető a közölt irodalmi értékekkel, melyek egészséges egyénekben 250-550 ng/ml átlagos szintet közöltek le (11,96,139,209). Kísérletünkben hiperkoleszterinémias betegeket vizsgáltunk, akikben a vérelemzke aktivitás eleve fokozott lehetett az egészséges felnőttekhez képest.

A szérumban TXB_2 meghatározása a plazma TXB_2 méréshez bevezetett módszer segítségével történt, természetesen a szérumba adaptálva. A szérumban ezerszeresre hígítottuk az extrakció előtt, majd kétszeresre az extraktum visszaoldásakor, s RIA-háttérként hígított kevert PG-mentes szérumban használtunk. Az extrakciós hatásfokot változatlanul tekintettük.

A szérumban TXB_2 szint általunk tapasztalt csökkenése a busafogyasztás hatására jól egyezik más halhússal vagy halolajjal végzett különböző kúrák eredményeivel (86,248). A TXB_2 termelés csökkenése nem a trombocitaszám csökkenésének eredménye volt, mivel az változatlanul maradt. A vérlemezék csökkenő TXB_2 termelésének oka valószínűleg az, hogy a trombocita membránba n-3 zsírsavak épülnek be az AA rovására (197,201,214). Az összkoleszterin szint szintén tapasztalt csökkenése a diéta hatására, csökkent koleszterin beépülést eredményez a trombocitákba, s a koleszterin-tartalom csökkenése szintén csökkenti a vérlemezék aggregációs hajlamát (197).

Két héttel a kúra befejezése után a szérumban TXB_2 szint emelkedett a betegekben, viszont a plazma TXB_2 szintben ekkor tudtunk csak enyhe csökkenést kimutatni, mely utalhat arra, hogy a vérlemezék aktivitásának változása időben eltolva jelenik meg a plazma szintjében.

A hal(olaj) diéta más vérlemezkefunkciós paraméterekre is kedvezően hat. Ischémiás szívbetegekben normalizálólag hatott a béta-tromboglobulin és a PF4 szintekre (97). Esetünkben az extrém magas kiindulási TXB_2 termelést mutató betegekben a TXB_2 szint a kúra végére erősen csökkent, míg egyes esetekben az eredetileg alacsony szintek még emelkedtek is. Ez a normalizálódási tendencia az individuális eseteket tekintve a halfogyasztás különösen kedvező hatását bizonyítja. Ugyanezt a hatást a vérnyomás normalizálódásában is kimutatták (202). Az EPA és a DHA valószínűleg a vérlemezék $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ receptorainak működését, kifejeződését is gátolja (214).

Az érelmeszesedéssel kapcsolatos betegségek kezelésének a hal(olaj) fogyasztás tehát figyelemreméltó, természetes módja lehet (87,202,248). Az n-3 politelítetlen zsírsavak fokozott oxidációs hajlama miatt gondoskodni kell a halolajokban az antioxidáns kiegészítésről (54,69). Értékes megfigyelés az is, hogy a növényi olajokban található n-6 esszenciális zsírsavak, melyek szintén nélkülözhetetlen tápanyagok, és az n-3 zsírsavak egymás hatását potenciózzák, tehát együttes fogyasztásuk méginkább fontos (55).

Napjainkban a korszerű kezelések kialakítását célzó kutatások jelentős része előnyben részesíti a természetes anyagok felhasználását. Ezen kutatások közé tartozik az említett hal(olaj) fogyasztás témaköre.

A laboratóriumunkban folyó kutatásaink révén mi is szerettünk volna hozzájárulni a primer (és szekunder) megelőzés elősegítéséhez. A fiatalkori infarktusos családokban az újszerű jelzőparaméterek kiválasztása ennek a folyamatnak a részét képezte. Hasonló jellegű vizsgálatokat végeztünk hipertenzív, toxémiás és egyéb kóros terhességekben. A placentavérben a 6KPGF jelentősen csökkent szintjét mutattuk ki a kontroll terhes nőkhöz képest, és egyéb újszerű eredményeinkről is beszámoltunk (101,120,171). Az infarktusos szülők gyermekeinek vizsgálata során kimutatott PG és lipid eltérések felhívták a figyelmet e gyermekek valóban veszélyeztetett helyzetére és a szűrés jelentőségére. A betegségtudat kialakítása nélkül végzett diétás tanácsok (a zsíros ételek kerülése, halfogyasztás, fokozott rostbevitel főként a fiúkban) és a fizikai aktivitás szerepének kiemelése kedvező eredményeket hozhat. Ezt mutatja, hogy a fiatalkori infarktusos családok utódaiban az étrend (disznózsír helyett olaj használat, a zsír-liszt rántás kiiktatása, több zöldség a galuska, rizs, sütemények helyett, hal és csirkehús dominanciája), az életmód (dohányzás, fogamzásgátlók csökkentése) változtatása valamint a fizikai aktivitás növelése (rendszeres futás, úszás) az egy éves követési periódus alatt jelentősen csökkentette az összkoleszterin és a lipidperoxidok szintjét, emellett emelte a HDL-t a budapesti csoportban (217).

Ez a szép eredmény figyelemreméltó. Az adott tanácsok valószínűleg az eikozanoidokban is kedvező eltolódást indukálnak. Az n-3 és n-6 zsírsavak bevitelének kedvező hatásáról már szóltam. Egyéb diétás tanácsok különböző összefoglalókban találhatók (15,88,97). A fizikai aktivitás növekedése kontroll és beteg személyekben is kedvezően hatott a PGI₂ és más eikozanoidok szintjére, valamint a HDL-re (145,215). A mozgás és testedzés során a terhelésnek fokozatosnak kell lennie, mert a túlzott erőfeszítés káros lehet. A dohányzás (passzív formában is) TXA₂ növelő és PGI₂ csökkentő hatása jól ismert (4,165,177,204). A fogamzásgátló szerek hatására már utaltam a szteroid hormonok és a prosztanoid anyagcsere vonatkozásában (6,113). Általában a progeszteront tartják atherogén hormonnak és PGI₂ csökkentőnek (169). Végül nagyon fontos, bár nehezen vizsgálható szerepe van a lelki stressznek és más személyiségzavaroknak, feloldásában pszichológus munkája segíthet.

A fentiek figyelembevételével valószínűleg jelentős sikereket lehet elérni mind a primer, mind a szekunder megelőzésben. Az érlelmeszesedés lassú, évtizedekig tartó progressziójának ismeretében a megelőzésre minél hamarabb súlyt kell fektetni, hogy az étrend és életmód fokozatos megváltoztatásának segítségével gyógyszeres kezelésre sokkal kevesebb esetben legyen szükség. Munkám ehhez szeretett volna segítséget nyújtani.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A kidolgozott C18-extrakcióval kombinált RIA módszer fő jellemzői (átlag $\pm$ SD):

	6KPGF	TXB ₂
Bo/T (%)	42,5 $\pm$ 6,8	62,3 $\pm$ 8,2
NSB (%)	5,6 $\pm$ 1,4	5,4 $\pm$ 1,3
IC50 (pg/ml)	33,5 $\pm$ 6,2	41,7 $\pm$ 5,8
Extrakciós hatások (%)	78,3	82,7
Belső variációs együttható (intraassay variation) (%)	9,1	8,3
Külső variációs együttható (interassay variation) (%)	16,6	16,2
Méréstartomány (humán plazmában) (pg/ml)	11 - 600	70 - 2000
Érzékenység (detection limit) (pg/ml)	4	25
Megbízhatóság, linearitás	0,974	0,995
Humán plazmaminták mérhetősége (%)	94,8	99,2

A 6KPGF és TXB₂ szintek már fiatal gyermekekben (3-19 ill. 20 év) kimutathatóan változtak az életkor és az atheroszklerotikus veszélyeztetettség szerint. Serdülőkor után a fiúk kedvezőtlenebb helyzetbe kerültek, mint a leányok a 6KPGF szint erős csökkenése miatt. A veszélyeztetett gyermekekben a 6KPGF szint alacsonyabb volt. Összefüggést lehetett kimutatni a prosztanoidok és a koleszterin(frakciók) között főként felnőttkorban, mely utal együttes kezelésük lehetőségére. A férfiakban az összkoleszterin, nőkben az AI volt a meghatározóbb. A kúraszerű halhús fogyasztás sikeresen csökkentette (a kedvező lipidprofil eltolódáson túl) a vérdemezke aktivitásra utaló szérumban TXB₂ szintjét.

Köszönetnyilvánítás

Szeretettel mondok köszönetet Dr. Lusztig Gábor Professzor Úrnak, aki mint munkahelyi főnököm pályámon elindított és segített a kapcsolatfelvételben más kollégákkal. Köszönöm Dr. Mucha Istvánnak, hogy az Izotóp Intézetben egy hónapot tölthettem, anyagokat bocsátott rendelkezésemre, segítségemre volt az éteres extrakció vizsgálatánál és a szilárdfázisú extrakciós módszer szcintillációs méréseinek elvégzésénél.

Megköszönöm minden kollegámnak a Kutató Laborban a jó hangulatú összmunkát, dr. Mihai Klára főorvosnőnek a hosszú évekig tartó szoros együttműködést, közös előadásokat és publikációkat. Köszönet a könyvtárosok segítőkész munkájáért, családomnak a technikai segítségért, és mindenkinek, aki munkám elkészítésénél segítségemre volt.

Epilógus

A Bács-Kiskun Megyei Önkormányzat Kórházának Patológiai Osztályához tartozó Kutató Laboratórium 1993. március 1-én megszűnt, melyhez részben szülési szabadságom is hozzájárult, de fő oka az volt, hogy a kutatások személyi támogatói kisebbségben voltak és anyagi fedezete is jelentősen megcsappant. Dr. Mihai Klára vezetésével az infarktus szűrőprogram tovább folyik, vizsgálatainak körét más paraméterek felé csoportosítva. Ezúton is köszönet azért, hogy mindig támogatta laboratóriumunkat, és kiemelten Prof. Dr. Lusztig Gábornak, hogy életében mindent megtett a Laboratórium kutatásainak fennmaradásáért.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Angelini, A., G. Thiene, C. Frescura, G. Baroldi: Coronary arterial wall and atherosclerosis in youth (1-20 years): a histologic study in northern Italian population. *Int. J. Cardiol.* 28:361-370. (1990)
2. Antoni F., Csuka I., Romics L.: A szervezetben képződő nitrogénoxid (NO) szabadgyök szerepe. *Orv. Hetil.* 133:773-776. (1992)
3. Bálint, G. A., V. Varró: Antinomycin inhibits gastric mucosal protection by prostacyclin in rats. *Prostaglandins* 21:255-257. (1981)
4. Bálint, G. A., V. Varró: The effects of cigarette smoke on gastroduodenal mucosal endogenous prostacyclin level (Experimental and clinical observations). *Agents Actions* 19:224-227. (1986)
5. Bálint, G. A.: Prostacyclin-induced activation of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in rat antral and fundic gastric mucosa. *Acta Physiol. Hung.* 77:191-195. (1991)
6. Barrett-Connor, E., K.-T. Khaw: Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective population-based study. *Circulation* 78:539-545. (1988)
7. Beetens, J. R., M. C. Coene, A. Verheyen, L. Zonnekeyn, A. G. Herman: Biphasic response of intimal prostacyclin production during the development of experimental atherosclerosis. *Prostaglandins* 32:319-334. (1986)
8. Beilin, L. J., I. B. Puddey: How and when prostanoids influence renal blood flow? *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.* 15:45-99. (1984)
9. Beitz, J., H.-J. Mest: (n-3) PUFA rich diets modulate the PGI₂ inhibitory potency of low density lipoprotein (LDL) taken from venous blood of volunteers. *Agents Actions* 22:375-376. (1987)
10. Beitz, J., B. Kuklinski, Ch. Taube, H.-J. Mest: Influence of a plasma fraction of human blood, rich in high density lipoprotein, on in vitro formation of prostaglandin I₂ (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂). *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids* 35:37-39. (1989)
11. Beitz, J., N. A. Nikitina, Ch. Giessler, J. Beitz, V. P. Masaev, N. A. Perova, H.-J. Mest: Modulation of TXA₂ generation of platelets by human lipoproteins. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids* 40:57-61. (1990)
12. Berenson, G. S., S. R. Srinivasan, D. S. Freedman, B. Radhakrishnamurthy, E. R. Dalferes: Review: Atherosclerosis and its evolution in childhood. *Am. J. Med. Sci.* 294:429-440. (1987)

13. Best, L. C., T. J. Martin, R. G. G. Russell, F. E. Preston: Prostacyclin increases cyclic AMP levels and adenylate cyclase activity in platelets. *Nature* 267:850-851. (1977)
14. Binoux, M., W. Odell: Use of dextran coated antibody bound from free hormone: A critique. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36:303-310. (1973)
15. B  r  , G.: Nutrition and cardiovascular risk: The Hungarian experience. *Acta Cardiol.* 45:3-14. (1990)
16. Blair, I. A., S. E. Barrow, K. A. Waddell, P. J. Lewis, C. T. Dollery: Specific quantitative determination of 6-oxo-prostaglandin F_{1  } in human plasma. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*. Ed: B. Samuelsson, R. Paoletti, P. Ramwell, Raven Press, New York 11:197-205. (1983)
17. Boeynaems, J.-M.: Drugs influencing the vascular production of prostacyclin. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids* 34:197-204. (1988)
18. Borgeat, P., B. Samuelsson: Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3213-3217. (1979)
19. Born, G. V. R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-929. (1962)
20. Boxer, L. A., J. M. Allen, M. Schmidt, M. Yoder, R. L. Baehner: Inhibition of polymorphonuclear adherence by prostacyclin. *J. Lab. Clin. Med.* 95:672-678. (1980)
21. Bunting, S., R. Gryglewski, S. Moncada, J. R. Vane: Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* 12:897-913. (1976)
22. Bunting, S., S. Moncada, J. R. Vane: Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet* II:1075-1076. (1977)
23. Campbell, W. B., S. R. Ojeda: Measurement of prostaglandins by radioimmunoassay. *Meth. Enzymol.* Academic Press, Orlando, 141:323-341. (1987)
24. Carroll, M. A., B. Escalante, J. C. McGiff: Cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid: implications for blood pressure regulation. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 42:191-201. (1990)
25. Catella, F., D. Healy, J. A. Lawson, G. A. FitzGerald: 11-dehydrothromboxane B₂: A quantitative index of thromboxane A₂ formation in the human circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5861-5865. (1986)
26. Chen, R. F.: Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* 242:173-181. (1967)

27. Coker, S. J., J. R. Parratt, I. McA. Ledingham, I. J. Zeitlin: Thromboxane and prostacyclin release from ischaemic myocardium in relation to arrhythmias. *Nature* 291:323-324. (1981)
28. Dahl, M.-L., P. Uotila: Thromboxane formation during blood clotting is decreased by verapamil. *Prostagland. Leuk. Med.* 13:217-218. (1984)
29. Davis, T. M. E., E. Brown, D. R. Finch, M. D. Mitchell, R. C. Turner: In vitro venous prostacyclin production, plasma 6-keto-prostaglandin F_{1a} concentrations and diabetic retinopathy. *Br. Med. J.* 282:1259-1262. (1981)
30. Deckmyn, H., E. van Houtte, M. Verstraete, J. Vermeylen: Manipulation of the local thromboxane and prostacyclin balance *in vivo* by the antithrombotic compounds dazoxiben, acetylsalicylic acid and nafazatrom. *Biochem. Pharmacol.* 32:2757-2762. (1983)
31. Defreyn, G., H. Deckmyn, J. Vermeylen: A thromboxane synthetase inhibitor reorients endoperoxide metabolism in whole blood towards prostacyclin and prostaglandin E₂. *Thromb. Res.* 26:389-400. (1982)
32. Demers, L. M., M. C. Rees, A. C. Turnbull: Arachidonic acid metabolism by the non-pregnant human uterus. *Prostagland. Leuk. Med.* 14:175-180. (1984)
33. Desjardins-Giasson, S., J. Gutkowska, R. Garcia, J. Genest: Effect of angiotensin II. and norepinephrine on release of prostaglandins E₂ and I₂ by the perfused rat mesenteric artery. *Prostaglandins* 24:105-114. (1982)
34. Dorn, G. W., N. Liel, J. L. Trask, D. E. Mais, M. E. Assey, P. V. Halushka: Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 81:212-218. (1990)
35. Dubois, A., E. D. Dorval, L. Steel, N. P. Fiala, J. J. Conklin: Effect of ionizing radiation on prostaglandins and gastric secretion in rhesus monkeys. *Radiat. Res.* 110:289-293. (1987)
36. Ducharme, D. W., J. R. Weeks, R. G. Montgomery: Studies on the mechanism of the hypertensive effect of prostaglandin F_{2a}. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 160:1-10 (1968)
37. Dusting, G. J., S. Moncada, J. R. Vane: Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for the relaxation of coronary arteries by arachidonic acid. *Prostaglandins* 13:3-15. (1977)
38. Dusting, G. J., S. Moncada, J. R. Vane: Recirculation of prostacyclin (PGI₂) in the dog. *Br. J. Pharmacol.* 64:315-320. (1978)
39. Farman, N., P. Pradelles, J. P. Bonvalet: PGE₂, PGF_{1a}, 6-keto-PGF_{1a} and TXB₂ synthesis along the rabbit nephron. *Am. J. Physiol.* 252:F53-F59. (1987)

40. Fischer, S., B. Scherer, P. C. Weber: Prostacyclin metabolism in adults and neonates. Urinary profiles of 6-keto-prostaglandin F_{1a} and 2,3-dinor-6-keto-prostaglandin F_{1a} studied by gas-chromatography-mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* 750:127-133. (1983)
41. Fischer, S., C. Bernutz, H. Meier, P. C. Weber: Formation of prostacyclin and thromboxane in man as measured by the main urinary metabolites. *Biochim. Biophys. Acta* 876:194-199. (1986)
42. Fishman, A. P., G. G. Pietra: Handling of vasoactive materials by the lung. *N. Engl. J. Med.* 291:884-890. (1974)
43. FitzGerald, G. A., A.K. Pedersen, C. Patrono: Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 67:1174-1177. (1983)
44. FitzGerald, G. A., J. A. Oates, J. Hawiger, R. L. Maas, L. J. Roberts, J. A. Lawson, A. R. Brash: Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J. Clin. Invest.* 71:676-688. (1983)
45. Fleisher, L. N., A. R. Tall, L. D. Witte, R. W. Miller, P. J. Cannon: Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 257:6653-6655. (1982)
46. Fogelberg, M., O. Vesterquist, U. Diczfalusy, P. Henriksson: Experimental atherosclerosis: effects of oestrogen and atherosclerosis on thromboxane and prostacyclin formation. *Eur. J. Clin. Invest.* 20:105-110. (1990)
47. Folch, J., M. Lees, G. H. Sloane-Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226:497-509. (1957)
48. Folco, G. C., E. Granström, H. Kindahl: Albumin stabilizes thromboxane A₂. *FEBS Lett.* 82:321-324. (1977)
49. Forder, R. A., F. Carey: Measurement of human venous plasma prostacyclin and metabolites by radioimmunoassay. *Prostagland. Leuk. Med.* 12:323-346. (1983)
50. Förstermann, U., G. Hertting, B. Neufang: The importance of endogenous prostaglandins other than prostacyclin, for the modulation of contractility of some rabbit blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 81:623-630. (1984)
51. Förstermann, U., A. Mügge, S. M. Bode, J. C. Frölich: Response of human coronary arteries to aggregating platelets: importance of endothelium-derived relaxing factor and prostanoids. *Circ. Res.* 63:306-312. (1988)
52. Franco-Saenz, R., S. Suzuki, S. Y. Tan: Prostaglandins and renin production: a review. *Prostaglandins* 20:1131-1143. (1980)

53. Galle, J., A. Lückhoff, R. Busse, E. Bassenge: Low-density lipoproteins stimulate internal free calcium and prostacyclin release in endothelial cells. *Eicosanoids* 3:81-86. (1990)
54. Garrido, A., F. Garrido, R. Guerra, A. Valenzuela: Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids* 24:833-835. (1989)
55. Gazsó, A., D. Horrobin, H. Sinzinger: Influence of omega-3 fatty acids on the prostaglandin metabolism in healthy volunteers and patients suffering from PVD. *Prostaglandins in the Cardiovascular system*. Ed: H. F. Sinzinger, K. Schrör, Birkhauser, Basel, Agents Actions(suppl. 37):151-156. (1992)
56. Gecse, Á., A. Ottlecz, Zs. Mezei, G. Telegdy, F. Joó, E. Dux, I. Karnushina: Prostacyclin and prostaglandin synthesis in isolated brain capillaries. *Prostaglandins* 23:287-297. (1982)
57. Gibson, B. E. S., M. R. Buchanan, R. D. Barr, J. G. White: Primary thrombocythaemia in childhood: symptomatic episodes and their relationship to thromboxane A₂, 6-keto-PGE₁ and 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid production: a case report. *Prostagland. Leuk. Med.* 26:221-231. (1987)
58. Glavind, J., S. Hartmann, J. Clemmesen, K. E. Jessen, H. Dam: Studies on the role of lipoperoxides in human pathology II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 30:1-6. (1952)
59. Goehlert, U. G., N. M. K. Ng Ying Kin, L. S. Wolfe: Biosynthesis of prostacyclin in rat cerebral microvessels and the choroid plexus. *J. Neurochem.* 36:1192-1201. (1981)
60. Goldsmith, J. C., C. T. Kisker: Thrombin-endothelial cell interactions: critical importance of endothelial cell vessel of origin. *Thromb. Res.* 131-136. (1982)
61. Goppelt-Struebe, M., C. F. Koerner, G. Haussman, D. Gemsa, K. Resch: Control of prostanoid synthesis: role of reincorporation of released precursor fatty acids. *Prostaglandins* 32:373-385. (1986)
62. Gorman, R. R., S. Bunting, O. V. Miller: Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins* 13:377-388. (1977)
63. Gorman, R. R., R. D. Hamilton, N. K. Hopkins: Stimulation of human foreskin fibroblast adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels by prostacyclin (prostaglandin I₂). *J. Biol. Chem.* 254:1671-1676. (1979)
64. Granström, E., B. Samuelsson: Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: General considerations. *Adv. Prostagl. Thromb. Res.* Ed: B. Samuelsson, P. W. Ramwell, R. Paoletti, Raven Press, New York, 5:1-13. (1978)
65. Granström, E., M. Hamberg, G. Hansson, H. Kindahl: Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE₂: The reason for low assay reliability. *Prostaglandins* 19:932-957. (1980)

66. Green, K., M. Hamberg, B. Samuelsson, M. Smigel, J. C. Frölich: Measurement of prostaglandins, thromboxanes, prostacyclin and their metabolites by gas liquid chromatography-mass spectrometry. *Adv. Prostagland. Thromb. Res.* Ed: B. Samuelsson, P. W. Ramwell, R. Paoletti, Raven Press, New York, 5:39-94. (1978)
67. Gross, P. A., R. W. Schrier, R. J. Anderson: Prostaglandins and water metabolism: a review with emphasis on in vivo studies. *Kidney Int.* 19:839-850. (1981)
68. Gryglewski, R. J., J. Swies: Cardioprotection by molsidomine and iloprost in myocardial ischaemia in anaesthetized cats. Prostaglandins in the Cardiovascular system. Ed: H. F. Sinzinger, K. Schrör, Birkhauser, Basel, Agents Actions(suppl. 37):265-272. (1992)
69. Haglund, O., R. Luostarinen, R. Wallin, L. Wibell, T. Saldeen: The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *J. Nutr.* 121:165-169. (1991)
70. Hajjar, D. P., B. B. Weksler: Metabolic activity of cholesteryl esters in aortic smooth muscle cells is altered by prostaglandins I₂ and E₂. *J. Lipid Res.* 24: 1176-1185. (1983)
71. Hajtman B.: A biometria alapjai, SOTE jegyzet, Budapest (1976)
72. Hamberg, M., B. Samuelsson: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:899-903. (1973)
73. Hamberg, M., B. Samuelsson: Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3400-3404. (1974)
74. Hamberg, M., J. Svensson, T. Wakabayashi, B. Samuelsson: Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:345-349. (1974)
75. Hamberg, M., J. Svensson, B. Samuelsson: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2994-2998. (1975)
76. Harris, W. S.: Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.* 30:785-807. (1989)
77. Hay, C. R. M., A. P. Durber, R. Saynor: Effect of fish oil on platelet kinetics in patients with ischaemic heart disease. *Lancet* I:1269-1272. (1982)
78. Heald, F. P.: Atherosclerosis during adolescence. *Med. Clin. North Am.* 74:1321-1332. (1990)
79. Hedquist, P.: Basic mechanism of prostaglandin action on autonomic neurotransmission. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17:259-279. (1977)

80. Higgs, G. A., S. Bunting, S. Moncada, J. R. Vane: Polymorphonuclear leukocytes produce thromboxane A₂-like activity during phagocytosis. *Prostaglandins* 12:749-757. (1976)
81. Higgs, G. A., S. Moncada, J. R. Vane: Prostacyclin (PGI₂) inhibits the formation of platelet thrombi induced by adenosine diphosphate (ADP) in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 61:137. (1977)
82. Higgs, E. A., S. Moncada, J. R. Vane, J. P. Caen, H. Michel, G. Tobelem: Effect of prostacyclin (PGI₂) on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins* 16:17-22. (1978)
83. Higgs, G. A., S. Moncada, J. R. Vane: Prostacyclin (PGI₂) reduces the number of "slow-moving" leukocytes in hamster cheek pouch venules. *J. Physiol.* 280:55-56. (1978)
84. Hong, S., L. Levine: Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1730-1734. (1976)
85. Hopkins, N. K., R. R. Gorman: Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J. Clin. Invest.* 67:540-546. (1981)
86. Hornstra, G., A. C. van Houwelingen, G. A. A. Kivits, S. Fischer, W. Uedelhoven: Influence of dietary fish on eicosanoid metabolism in man. *Prostaglandins* 40:311-329. (1990)
87. Illingworth, D. R.: An overview of lipid-lowering drugs. *Drugs* 36(suppl.3):63-71 (1988)
88. Jacobson, M. S., D. E. Lillienfeld: The pediatrician's role in atherosclerosis prevention. *J. Pediatr.* 112:836-841. (1988)
89. Johnson, A. R., K. S. Callahan, S. C. Tsai, W. B. Campbell: Prostacyclin and prostaglandin biosynthesis in human pulmonary endothelial cells. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 17:531-551. (1981)
90. Johnson, R. A., D. R. Morton, J. H. Kinner, R. R. Gorman, J. C. McGuire, F. F. Sun, N. Whittaker, S. Bunting, J. Salmon, S. Moncada, J. R. Vane: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 12:915-928. (1976)
91. Joó I.: A busafogyasztás újabb klinikai tapasztalatai. *Med. Univ. Ter. Mell.* 1990 szept.:22-23.
92. Juvancz I., Paksy A.: *Orvosi biometria, Medicina, Budapest* (1982)
93. Kaapa, P., L. Viinikka, O. Ylikorkala: Plasma prostacyclin from birth to adolescence. *Arch. Dis. Child.* 57:459-461. (1982)

94. Kahn, N. N., H. S. Mueller, A. K. Sinha: Impaired prostaglandin E₁/I₂ receptor activity of human blood platelets in acute ischemic heart disease. *Circ. Res.* 66:932-940. (1990)
95. Kai, I., K. Ogawa, T. Ito: Effects of peripheral vasodilation caused by verapamil, nifedipine and nitroglycerin on plasma prostaglandins and thromboxane concentrations. *Jpn. Heart J.* 23:941-949. (1982)
96. Kallmann, R., H. K. Nieuwenhuis, P. G. De Groot, J. van Gijn, J. J. Sixma: Effects of low doses of aspirin 10 mg and 30 mg daily, on bleeding time, thromboxane production and 6-keto-PGF_{1α} excretion in healthy subjects. *Thromb. Res.* 45:355-361. (1987)
97. Kashani, I. A., P. R. Nader: The role of the pediatrician in the prevention of coronary heart disease in childhood. *Jpn. Heart J.* 27: 911-922. (1986)
98. Kirkland, R. T., B. S. Keenan, J. L. Probstfield, W. Patsch, T.-L. Lin, G. W. Clayton, W. Insull: Decrease in plasma high-density lipoprotein cholesterol levels at puberty in boys with delayed adolescence. Correlation with plasma testosterone levels. *JAMA* 257:502-507. (1987)
99. Knapp, H. R., I. A. G. Reilly, P. Alessandrini, G. A. FitzGerald: In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 314:937-942. (1986)
100. Knapp, H. R.: Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular function in man. *Klin. Wochenschr.* 68(suppl.20):33-39. (1990)
101. Kovács, A. G., A. Makáry, J. Pető, Gy. Steinmetz: Deficiency of c-GMP levels in placental circulation in hypertensive pregnancies: possibility of decreased endothelium-derived relaxing factor activity. *Hypertens. Pregn. -megjelenés alatt* (1994. jan)
102. Kunze, H., W. Vogt: Significance of phospholipase A for prostaglandin formation. *Ann. NY Acad. Sci.* 180:123-125. (1971)
103. Lanza, F. L.: Endoscopic studies of gastric and duodenal injury after the use of ibuprofen, aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Am. J. Med.* 77:(1A)19-24. (1984)
104. Lapetina, E. G., C. J. Schmitges, K. Chandrabose, P. Cuatrecasas: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and prostacyclin inhibit membrane phospholipase activity in platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:828-835. (1977)
105. Lapetina, E. G., M. M. Billah, P. Cuatrecasas: The phosphatidylinositol cycle and the regulation of arachidonic acid production. *Nature* 292:367-369. (1981)
106. Larrue, J., C. Lerroux, D. Daret, H. Bricaud: Decreased prostaglandin production in cultured smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aorta. *Biochim. Biophys. Acta* 710:257-263. (1982)

107. Larrue, J., D. Daret, J. Demond-Henri, C. Allières, H. Bricaud: Prostacyclin synthesis by proliferative aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 50:63-72. (1984)
108. László F., Janáky T.: *Radioimmunoassay*. Medicina, Budapest (1986)
109. Lefer, A. M.: Prostacyclin, high density lipoproteins, and myocardial ischemia. *Circulation* 81:2013-2015. (1990)
110. Levine, L., M. A. Moskowitz: Alpha- and beta-adrenergic stimulation of arachidonic acid metabolism of cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:6632-6636. (1979)
111. Lorenz, R. L., C. W. Hamm, H. Riesner, W. Bleifeld, P. C. Weber: A prospective study of the diagnostic value of urinary thromboxane in patients presenting with acute chest pain. *J. Internal Med.* 227:429-434. (1990)
112. Löbel, P., E. Steinhagen-Thiessen, K. Schrör: Cholestyramine treatment of type IIa hypercholesterolaemia normalizes platelet reactivity against prostacyclin. *Eur. J. Clin. Invest.* 18:256-260. (1988)
113. Luria, M. H.: Review: Estrogen and coronary arterial disease in men. *Int. J. Cardiol.* 25:159-166. (1989)
114. MacDermot, J., P. J. Barnes: Activation of guinea pig pulmonary adenylate cyclase by prostacyclin. *Eur. J. Pharmacol.* 67:419-425. (1980)
115. MacIntyre, D. E., J. D. Pearson, J. L. Gordon: Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells. *Nature* 271:549-551. (1978)
116. Makáry, A., M. Pataki, G. Lusztig, I. Stadler, S. Virág: Effect of prostacyclin (PGI₂) on atherosclerosis in rabbits. *Abstract Book of the 5th International Conference on Prostaglandins, Florence*, 224. (1982)
117. Makáry, A., M. Pataki, É. Kolthay, G. Lusztig: The effect of heparin on prostacyclin production of rabbit aorta. *Proceedings of the 5th International Dresden Lipid Symposium*, Ed: H. Haller, M. Hanefeld, W. Jaross, W. Leonhardt, H. Hude, Dresden, 309-312. (1985)
118. Makáry, A., M. Pataki, E. Tóth, G. Lusztig: The effect of hypoxia and hypokinesia on prostacyclin (PGI₂) production of vessel wall. *Exp. Pathol.* 32:251-253. (1987)
119. Makáry, A., É. Kolthay, M. Pataki, J. Pető, G. Kovács, G. Lusztig: Inhibition of ACAT activity after 7-oxo-PGI₂ treatment in cholesterol-fed rabbits. *Exp. Toxic. Pathol.* 44:105-107. (1992)
120. Makáry A., Pető J., Kovács A. G., Steinmetz Gy.: Egyszerű laboratóriumi vizsgálatok alkalmazása a terhességi toxaemia szűrésére. I. In vivo trombocita aggregáció. *Lab. Diagn.* 21:250-253. (1992)

121. Malmsten, C., E. Granström, B. Samuelsson: Cyclic AMP inhibits synthesis of prostaglandin endoperoxide (PGG₂) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68:569-576. (1976)
122. Marcus, A. J., B. B. Weksler, E. A. Jaffe, M. J. Broekman: Synthesis of PGI₂ from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 66:979-986. (1980)
123. Marcus, A. J., M. J. Broekman, B. B. Weksler, E. A. Jaffe, L. B. Safier, H. L. Ullman, K. Tack-Goldman: Interactions between stimulated platelets and endothelial cells in vitro. *Philos. Trans. R. Soc.* 294:343-353. (1981)
124. Maurin, N.: Routine measurement of thromboxane B₂ and the prostacyclin metabolite 6-keto-prostaglandin F_{1a} in plasma. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 36:1174-1179. (1986)
125. McCulloch, R. K., J. Summers, R. Vandongen, I. L. Rouse: Role of thromboxane A₂ as a mediator of platelet-activating-factor-induced aggregation of human platelets. *Clin. Sci.* 77:99-103. (1989)
126. McGiff, J. C., N. A. Terragno, K. U. Malik, A. J. Lonigro: Release of a prostaglandin E-like substance from canine kidney by bradykinin. *Circ. Res.* 31:36-43. (1972)
127. McGiff, J. C.: Prostaglandins, prostacyclin and thromboxanes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21:479-509. (1981)
128. Mehta, J. L., D. Lawson, P. Mehta, T. Saldeen: Increased prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4511-4515. (1988)
129. Mehta, J. L., W. W. Nichols: The potential role of thromboxane inhibitors in preventing myocardial ischaemic injury. *Drugs* 40:657-665. (1990)
130. Mihai K., Tímár S., Pető J., Kolthay É., Jancsó T., Lusztig G.: Fiatalkori infarktuson átesett szülők utódainak komplex szűrővizsgálata Kecskeméten. III. Összefüggés a szülők és utódaik laboratóriumi vizsgálati eredményei között. *Bács-Kiskun Megyei Orvosok-Gyógyszerészek Évkönyve 1990.*, Szerk: Lusztig G., Ligeti Zs., Kecskemét, 270-277. (1990)
131. Mihai K., Pető J., Kolthay É., Makáry A., Tímár S., Lusztig G.: Plazma prosztaciklin és tromboxán koncentráció egészséges gyermekekben és fiatalkori myocardialis infarctusban megbetegedett szülők utódaiban. *Orv. Hetil.* 132:1627-1629. (1991)
132. Mihai K., Pető J., Kolthay É.: Plazma prosztaciklin koncentráció 3-18 éves korban. *Lab. Diagn.* 18:47-49. (1991)
133. Mihai K., Pető J., Makáry A., Kolthay É.: Plazma tromboxán koncentráció 3-18 éves korban. *Lab. Diagn.* 18:50-52. (1991)

134. Mihai, K., J. Pető, A. Makáry, S. Tímár: Association between total cholesterol and thromboxane B₂ levels in offspring of parents suffering from premature coronary artery disease. *Prostaglandins in the Cardiovascular system*. Ed: H. F. Sinzinger, K. Schrör, Birkhauser, Basel, Agents Actions(suppl. 37):190-196. (1992)
135. Mihai, K., J. Pető, É. Kolthay, A. Makáry, S. Tímár: Balance of prostacyclin and thromboxane in offspring of parents with premature coronary arterial disease. *Int. J. Cardiol.* 35:13-18. (1992)
136. Miki, M., K. Ogawa, M. Hirata, H. Kitaguchi, Y. Funahara: Prostacyclin release from the coronary vascular wall by vasoactive agents. *Thromb. Res.* 35:665-679. (1984)
137. Miller, T. A.: Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage. *Am. J. Physiol.* 245:G601-G625. (1983)
138. Miller, V. T.: Dyslipoproteinemia in women. Special considerations. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 19:381-398. (1990)
139. Minuz, P., S. E. Barrow, J. R. Cockcroft, J. M. Ritter: Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostacyclin and thromboxane biosynthesis in patients with mild essential hypertension. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30: 519-526. (1990)
140. Moncada, S., R. J. Gryglewski, S. Bunting, J. R. Vane: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665. (1976)
141. Moncada, S., A. G. Herman, E. A. Higgs, J. R. Vane: Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.* 11:323-344. (1977)
142. Moncada, S., J. R. Vane: Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *Br. Med. Bull.* 34:129-135. (1978)
143. Moncada, S., E. A. Higgs: Arachidonate metabolism in blood and the vessel wall. *Clin. Haematol.* 15:273-292. (1986)
144. Moncada, S., R. M. J. Palmer, E. A. Higgs: Prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor: biological interactions and significance. In: *Thrombosis and Haemostasis*, Ed: M. Verstraete, J. Vermeylen, H. R. Lijnen, J. Arnout, Leuven Univ. Press, Leuven, 597-618. (1987)
145. Mouritz-Andersen, T., I. W. Jensen, P. N. Jensen, J. Ditzel, J. Dyerberg: Plasma 6-keto-PGF_{1α}, thromboxane B₂ and PGE₂ in Type 1 (insulin dependent) diabetic patients during exercise. *Diabetologia* 30:460-463. (1987)
146. Mozar, H. N., D. G. Bal, S. A. Farag: The natural history of atherosclerosis: an ecologic perspective. *Atherosclerosis* 82: 157-164. (1990)

147. Mucha I.: Az arachidonsav metabolizmusa terhes tengeri malac reproduktív szöveteiben és a tromboxán B₂ radioimmunoassay kidolgozása. Kandidátusi értekezés, Budapest (1985)
148. Murota, S., W.-C. Chang, Y. Koshihara, I. Morita: Importance of cyclooxygenase induction in the biosynthesis of prostacyclin. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*. Ed: B. Samuelsson, R. Paoletti, P. Ramwell, Raven Press, New York, 11:99-104. (1983)
149. Nagy G.: Az omega-zsírsavak. *Med. Univ. Ter. Mell.* 1991. jan.: 2-8.
150. Nakashima, Y., T. Kawashima, H. Nandate, A. Yashiro, A. Kuroiwa: Sustained-release nifedipine (nifedipine-L) suppresses plasma thromboxane B₂ and 6-keto-prostaglandin F_{1α} in both young male smokers and nonsmokers. *Am. Heart J.* 119:1267-1273. (1990)
151. Namima, M., K. Okamoto: Modulatory action of prostaglandin D₂ on the release of ³H-norepinephrine from rat cerebellar slices. *Jpn. J. Pharmacol.* 43:197-204. (1987)
152. Needleman, P., S. Moncada, S. Bunting, J. R. Vane, M. Hamberg, B. Samuelsson: Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 261:558-560. (1976)
153. Nosko, M., R. Schulz, B. Weir, D. A. Cook, M. Grace: Effects of vasospasm on levels of prostacyclin and thromboxane A₂ in cerebral arteries of the monkey. *Neurosurgery* 22:45-50. (1988)
154. Okuma, M., H. Takayama, H. Uchino: Generation of prostacyclin-like substance and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats. *Prostaglandins* 19:527-536. (1980)
155. Oliva, D., S. Nicosia: PGI₂-receptors and molecular mechanisms in platelets and vasculature: State of the art. *Pharmacol. Res. Commun.* 19:735-765. (1987)
156. Oliw, E. H., R. P. Guengerich, J. P. Oates: Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. Isolation and metabolism of four epoxide intermediates. *J. Biol. Chem.* 257:3771-3781. (1982)
157. Oliw, E., E. Granström, E. Anggard: The prostaglandins and essential fatty acids. In: *Prostaglandins and related substances*, Ed: C. Pace-Asciak, E. Granström, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Chapter 1., 1-44. (1983)
158. Olsson, A. G., L. A. Carlson: Clinical, hemodynamic and metabolic effects of intraarterial infusions of prostaglandin E₁ in patients with peripheral vascular disease. *Adv. Prost. Thromb. Res.* 1:429-432. (1976)

159. Omini, C., S. Moncada, J. R. Vane: The effects of prostacyclin (PGI₂) on tissues which detect prostaglandins (PG's). *Prostaglandins* 14:625-632. (1977)
160. Onoe, H., R. Ueno, I. Fujita, H. Nishino, Y. Oomura: Prostaglandin D₂, a cerebral sleep-inducing substance in monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4082-4086. (1988)
161. Orchard, M. A., C. Robinson: Stability of prostacyclin in human plasma and whole blood: studies on the protective effect of albumin. *Thromb. Haemost.* 46:645-647. (1981)
162. Orekhov, A. N., V. V. Tertov, A. V. Mazurov, E. R. Andreeva, V. S. Repin, V. N. Smirnov: "Regression" of atherosclerosis in cell culture: effects of stable prostacyclin analogues. *Drug Dev. Res.* 9:189-201. (1986)
163. Ouwendijk, R. J. T., F. J. Zijlstra, J. H. P. Wilson, I. L. Bonta, J. E. Vincent: Raised plasma thromboxane B₂ levels in alcoholic liver disease. *Prostagland. Leuk. Med.* 10:115-122. (1983)
164. Pace-Asciak, C.: Isolation, structure and biosynthesis of 6-keto-prostaglandin F_{1a} in the rat stomach. *J. Am. Chem. Soc.* 98:2348-2349. (1976)
165. Packham, M. A., J. F. Mustard: The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Sem. Hematol.* 23:8-26. (1986)
166. Panganamala, R. V., A. C. Gillespie, A. J. Merola: Assay of prostacyclin synthesis in intact aorta by aqueous sampling. *Prostaglandins* 21:1-7. (1981)
167. Pataki, M., A. Makáry, S. Virág, G. Lusztig: Antiatherogenic effect of prostacyclin (PGI₂) and the alteration of PGI₂ and TXA₂ production of the aorta in cholesterol-fed rabbits. *Acta Morph. Hung.* 32:38. (1984)
168. Payton, C. D., J. J. F. Belch, J. J. M. Boulton: Successful treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura by Epoprostenol infusion. *Lancet* i:927-928. (1985)
169. Peplow, P., J. Y. Jeremy: Antiestrogens: Structure, mode of action and relationship to eicosanoids. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids* 37:241-254. (1989)
170. Pető, J., K. Mihai, A. Makáry: Low level of prostacyclin as a risk of ischaemic heart disease. *Int. J. Cardiol.* 30:237-239. (1991)
171. Pető J., Makáry A., Steinmetz Gy., Kovács A. G.: Egyszerű laboratóriumi vizsgálatok alkalmazása a terhességi toxemia szűrésére. II. Lipid és lipidperoxid meghatározások. *Lab. Diagn.* 21:254-257. (1992)
172. Pető, J., K. Mihai, I. Joó, A. Makáry: Association between total cholesterol and plasma thromboxane B₂ in human adults. *Prostaglandins in the Cardiovascular system*. Ed: H. F. Sinzinger, K. Schrör, Birkhauser, Basel, Agents Actions(suppl. 37):210-214. (1992)

173. Pieroni, J. P., W. H. Lee, P. Y.-K. Wong: Separation of six major prostacyclin metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 230:115-120. (1982)
174. Podolsky, A., A. Vichytil, J. Pidlich, H. Sinzinger: Impaired PGI₂-stabilization in septic shock patients. *Prostaglandins in the Cardiovascular system*. Ed: H. F. Sinzinger, K. Schrör, Birkhauser, Basel, Agents Actions(suppl. 37):204-209. (1992)
175. Powell, W. S.: Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilil silica *Prostaglandins* 20:947-957. (1980)
176. Rampart, M., C. van Hove, H. Bult, M. Claeys, A. G. Herman: Mechanism of complement-induced stimulation of prostacyclin production by isolated rabbit peritoneum. *Prostaglandins* 25:245-261. (1983)
177. Rangemark, C., G. Benthin, E. F. Granström, A. Wennmalm: Cigarette smoking and urinary excretion of markers for platelet/vessel wall interaction in healthy women. *Abstract Book of the 7th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds*. Ed: F. G. Lorenzini, Florence, p. 269. (1990)
178. Remuzzi, G., E. C. Rossi, R. Misiiani, D. Marchesi, G. Mecca, G. de Gaetano, M. B. Donati: Prostacyclin and thrombotic microangiopathy. *Semin. Thromb. Haemost.* 6:391-394. (1980)
179. Rink, T. J., T. J. Hallam: What turns platelets on? *Trends in Biochem. Scis.* 9:214-219. (1984)
180. Robert, A.: Prostaglandins and the gastrointestinal tract. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, Ed: L. R. Johnson, Raven Press, New York, 1407-1434. (1981)
181. Robertson, R. M., D. Robertson, J. Roberts, R. L. Maas, G. A. FitzGerald, G. C. Friesinger, J. A. Oates: Thromboxane A₂ in vasotonic angina pectoris. Evidence from direct measurements and inhibitor trials. *N. Engl. J. Med.* 304:998-1003. (1981)
182. Rosenkranz, B., C. Fischer, J. C. Frölich: Prostacyclin metabolites in human plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* 29:420-424. (1981)
183. Ross, R., J. A. Glomset: The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 295:369-420. (1976)
184. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N. Engl. J. Med.* 314:488-500. (1986)
185. Roy, L., J. Mehta, P. Mehta: Increased plasma concentrations of prostacyclin metabolite 6-keto-PGF_{1α} in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.* 51:464-467. (1983)

186. Rózsa I., Banai J., Tihanyi K., Vámosi-Nagy I., Szántó I., Kun M.: Prostaglandin (PGI₂) mérése humán gyomor- és nyombél-biopsziákból. *Kísérl. Orvostud.* 35:285-288. (1983)
187. Salmon, J. A., D. R. Smith, R. J. Flower, S. Moncada, J. R. Vane: Further studies on the enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide into prostacyclin by porcine aorta microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 523:250-262. (1978)
188. Samuelsson, B.: On the incorporation of oxygen in the conversion of 8,11,14-eicosatrienoic acid to prostaglandin E₁. *J. Am. Chem. Soc.* 87:3011-3013. (1965)
189. Samuelsson, B., M. Goldyne, E. Granström, M. Hamberg, S. Hammarström, C. Malmsten: Prostaglandins and thromboxanes. *Ann. Rev. Biochem.* 47:997-1029. (1978)
190. Samuelsson, B.: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220:568-575. (1983)
191. Saunders, R. D., L. A. Horrocks: Simultaneous extraction and preparation for high-performance liquid chromatography of prostaglandins and phospholipids. *Anal. Biochem.* 143:71-75. (1984)
192. Saynor, R., D. Verel: Eicosapentaenoic acid, bleeding time, and serum lipids. *Lancet* II:272. (1982)
193. Schafer, A. I., M. A. Gimbrone, R. I. Handin: Endothelial cell adenylate cyclase: Activation by catecholamines and prostaglandin I₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1640-1647. (1980)
194. Schneider, W., G. Kober, P. Roebruck, H. Noack, M. Alle, G. Cieslinski, N. Reifart, M. Kaltenbach: Retardation of development and progression of coronary atherosclerosis: a new indication for calcium antagonists? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39(suppl.):17-23. (1990)
195. Shattil, S. J., L. P. Brass: Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J. Biol. Chem.* 262:992-1000. (1987)
196. Shikano, M., T. Ito, K. Ogawa, T. Satake: Effects of selective thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) in patients with coronary artery disease during exercise. *Jpn. Heart J.* 28:663-674. (1987)
197. Siess, W., B. Scherer, B. Böhlig, P. Roth, I. Kurzmann, P. C. Weber: Platelet-membrane fatty acids, platelet aggregation, and thromboxane formation during a mackerel diet. *Lancet* I:441-444. (1980)
198. Siess, W., F. Dray: Very low levels of 6-keto-prostaglandin F_{1α} in human plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 99:388-398. (1982)

199. Siess, W.: Mechanisms of platelet inhibition by prostacyclin: New aspects. In: Prevention and Noninvasive Therapy of Atherosclerosis, *Atheroscl. Rev.*, Ed: A. Leaf, P. C. Weber, Raven Press, New York 21:159-164. (1990)
200. Silverman, D. I., J. A. Ware, F. M. Sacks, R. C. Pasternak: Comparison of the absorption and effects on platelet function of a single dose of n-3 fatty acids given as fish or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1165-1170. (1991)
201. Simopoulos, A. P.: Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54:438-463. (1991)
202. Singer, P., I. Berger, K. Lück, C. Taube, E. Naumann, W. Gödicke: Long-term effect of mackerel diet on blood pressure, serum lipids and thromboxane formation in patients with mild essential hypertension. *Atherosclerosis* 62:259-265. (1986)
203. Sinzinger, H., W. Feigl, K. Silverbauer, R. Oppolzer, M. Winter, W. Auerswald: Prostacyclin (PGI₂) generation by different types of human atherosclerotic lesions. *Exp. Pathol.* 18:175-180. (1980)
204. Sinzinger, H., I. Virgolini: Do passive smokers have an increased risk of thrombosis? *Wien Klin. Wochenschr.* 101:694-698. (1989)
205. Sinzinger, H., I. Virgolini, P. Fitscha: Platelet kinetics in patients with atherosclerosis. *Thromb. Res.* 57:507-516. (1990)
206. Sinzinger, H., P. Fitscha, B. Tiso: Decreased prostaglandin-I₂ stability in acute myocardial infarction. *Thromb. Res.* 57:677-684. (1990)
207. Spokál, J., M. Kovács, I. Stadler, G. Galambos, G. Kovács: Effect of prostacyclin derivatives on platelet factor 3 availability. *Thromb. Res.* 47:117-121. (1987)
208. St-Clair, R. W.: Metabolism of the arterial wall and atherosclerosis. *Atheroscler. Rev.* 1:61-117. (1976)
209. Stampfer, M. J., J.A. Jakubowski, D. Faigel, R. Vaillancourt, D. Deykin: Vitamin E supplementation effect on human platelet function, arachidonic acid metabolism and plasma prostacyclin levels. *Am. J. Clin. Nutr.* 47:700-706. (1988)
210. Stein, B., V. Fuster, D. H. Israel, M. Cohen, L. Badimon, J. J. Badimon, J. H. Chesebro: Platelet inhibitor agents in cardiovascular disease: an update. *J. Am. Coll. Cardiol.* 14:813-836. (1989)
211. Sterin-Borda, L., E. S. Borda, M. F. Gimeno, M. A. Lazzari, E. del Castillo, A. L. Gimeno: Contractile activity and prostacyclin generation in isolated coronary arteries from diabetic dogs. *Diabetologia* 22:56-59. (1982)
212. Stuart M. J., J. M. Gerrard, J. G. White: Effect of cholesterol on production of thromboxane B₂ by platelets in vitro. *N. Engl. J. Med.* 302:6-10. (1980)

213. Svensson, J., M. Hamberg, B. Samuelsson: Prostaglandin endoperoxides. IX. Characterization of rabbit aorta contracting substance (RCS) from guinea pig lung and human platelets. *Acta Physiol. Scand.* 94:222-228. (1975)
214. Swann, P. G., C. A. Parent, M. Croset, P. Fonlupt, M. Lagarde, D. L. Venton, G. C. Le Breton: Enrichment of platelet phospholipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibits thromboxane A_2 /prostaglandin H_2 receptor binding and function. *J. Biol. Chem.* 265:21692-21697. (1990)
215. Symons, J. D.: Longitudinal and cross-sectional studies of the relationship between 6-keto $PGF_{1\alpha}$ and high density lipoproteins. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids* 39:159-165. (1990)
216. Szabó A., Morvay J.: Analitikai módszerek a klinikai kémiában. A kémia újabb eredményei, Akadémiai Kiadó, Budapest 57:177-224. (1984)
217. Szamosi, T., I. Gara, I. Venekei, A. Jávör, R. Ceskel, J. Knoll: Serum lipids, lipid peroxides and the care of children with high risk atherosclerotic family history. *Atherosclerosis* 68:111-115. (1987)
218. Szamosi, T., K. Mihai, J. Pető, A. Makáry, J. Kramer: Potential markers of the atherosclerotic process in high-risk children. *Clin. Biochem.* 24:185-187. (1991)
219. Szczeklik, A., R. J. Gryglewski, J. Musial, L. Grodzinska, M. Serwonska, E. Marcinkiewicz: Thromboxane generation and platelet aggregation in survivors of myocardial infarction. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 40:66-74. (1978)
220. Szczeklik, A., R. J. Gryglewski: Low density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and inhibit prostacyclin (PGI_2) biosynthesis in arteries. *Artery* 7:488-495. (1980)
221. Szczeklik, A., R. J. Gryglewski: Treatment of vascular disease with prostacyclin. In: *Clinical Pharmacology of Prostacyclin*. Ed: P. J. Lewis, J. O'Grady, Raven Press, New York, 159-167. (1981)
222. Tateson, J. E., S. Moncada, J. R. Vane: Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* 13:389-399. (1977)
223. Taylor, B. M., R. J. Shebuski, F.F. Sun: Circulating prostacyclin metabolites in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224:692-698. (1982)
224. Terragno, D. A., K. Crowshaw, N. A. Terragno, J. C. McGiff: Prostaglandin synthesis by bovine mesenteric arteries and veins. *Circ. Res.* 36,37(suppl.1):76-80. (1975)
225. Tokar, A. V., A. I. Negarae: Prostaglandins in elderly humans with normal and high arterial pressure. *Gerontology* 34:82-87. (1988)
226. Tremoli, E., G. Folco, E. Agradi, C. Galli: Platelet thromboxanes and serum-cholesterol. *Lancet* I:107-108. (1979)

227. Triau, J. G., S. N. Meydani, E. J. Schaefer: Oxidized low density lipoproteins stimulates prostacyclin production by adult human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis* 8:810-818. (1988)
228. Vallotton, M. B., C. Gerber-Wicht, W. Dolci, R. W. Rivest: Effect of different calcium channel blockers on angiotensin II- and vasopressin-induced prostacyclin biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15:598-603 (1990)
229. van den Bosch: Intracellular phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta* 604:191-246. (1980)
230. Vane, J. R.: The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 23:360-373. (1964)
231. Vane, J. R., E. E. Anggard, R. M. Botting: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* 323:27-36. (1990)
232. Viinikka, L., O. Ylikorkala: Measurement of thromboxane B₂ in human plasma or serum by radioimmunoassay. *Prostaglandins* 20:759-766. (1980)
233. Viinikka, L., P. Karrola, R. Pokela, O. Ylikorkala: Lack of effect of ischemia and dipyridamole on prostacyclin production in arteriosclerosis obliterans. *Prostaglandins* 21:821-826. (1981)
234. Virgolini, I., J. O'Grady, B. A. Pescar, H. Sinzinger: Defects in the prostaglandin system -heredity, prevalence and vascular risk analysis. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids* 40:227-237. (1990)
235. Virgolini, I., P. Fitscha, J. O'Grady, B. A. Pescar, H. Sinzinger: Viennese initiative for prostaglandin screening (VIP-screening). *Abstract Book of the 7th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds*. Ed: F. G. Lorenzini, Florence, p. 77. (1990)
236. Vrbancak, J. J., T. D. Eller, D. R. Knapp: Quantitative analysis of 6-keto-prostaglandin F_{1a} using immunoaffinity purification and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 425:1-9. (1988)
237. Weerasekera, D. A., E. N. Kuollapis, J. B. Kim, G. J. Barnard, W. P. Collins, F. Kohen, H. R. Lindner: Chemiluminescence immunoassay of thromboxane B₂. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*. Ed: B. Samuelsson, R. Paoletti, P. Ramwell, Raven Press, New York 11:185-190. (1983)
238. Weksker, B. B., A. J. Marcus, E. A. Jaffe: Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3922-3926. (1977)
239. Willems, C., H. V. Stel, W. G. van Aken, J. A. van Mourik: Binding and inactivation of prostacyclin (PGI₂) by human erythrocytes. *Br. J. Haematol.* 54:43-52. (1983)

240. Willis, A. L., D. L. Smith, C. Vigo, A. F. Kluge: Effects of prostacyclin and orally active stable mimetic agent RS-93427-007 on basic mechanisms of atherogenesis. *Lancet* II:682-683. (1986)
241. Wilson, C. H., N. H. Andersen, S. S. Tynan: A single platelet aggregometric assay for pro- and antiaggregatory prostanoids. *Prostagland. Leuk. Med.* 9:415-426. (1982)
242. Wiqvist, N., O. Widholm, S. J. Nillius, B. Nilsson (eds): Dysmenorrhoea and prostaglandins. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*(suppl.87):5-117. (1979)
243. Wolfe, L. S., F. Coceani: The role of prostaglandins in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 41:669-684. (1979)
244. Wolfe, L. S.: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J. Neurochem.* 38:1-14. (1982)
245. Wong, P. Y.-K., D. A. Terragno, N. A. Terragno, J. C. McGiff: Dual effects of bradykinin on prostaglandin metabolism: Relationship to the dissimilar vascular actions of kinins. *Prostaglandins* 13:113-125. (1977)
246. Wu, K. K., A. C. Papp, E. C. Manner, E. R. Hall: Interaction between lymphocytes and platelets in the synthesis of prostacyclin. *J. Clin. Invest.* 79:1601-1606. (1987)
247. Yamamoto, S., Y. Hayashi, T. Yano, N. Ueda, S. Kawamura, F. Ogushi, K. Nakamura: Enzyme immunoassay of thromboxane B₂ and 6-keto-prostaglandin F_{1α} as a substitute for radioimmunoassay. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*. Ed: B. Samuelsson, R. Paoletti, P. Ramwell, Raven Press, New York 11:181-184. (1983)
248. Yetiv, J. Z.: Clinical applications of fish oils. *JAMA* 260:665-670. (1988)
249. Ylikorkala, O., J. Kaila, L. Viinikka: Prostacyclin and thromboxane in diabetes. *Br. Med. J.* 283:1148-1150. (1981)
250. Ylikorkala, O., P. Jouppila, P. Kirkinen, L. Viinikka: Maternal prostacyclin, thromboxane and placental blood flow. *J. Obstet. Gynecol.* 145:730-732. (1983)
251. Yui, Y., T. Aoyama, H. Morishita, M. Takahashi, Y. Takatsu, C. Kawai: Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-1 (Apo A-1). *J. Clin. Invest.* 82:803-807. (1988)
252. Zusman, R. M., H. R. Keiser: Prostaglandin E₂ biosynthesis by rabbit renomedullary interstitial cells in tissue culture. Mechanisms of stimulation by angiotensin II, bradykinin and arginine vasopressin. *J. Biol. Chem.* 252: 2069-2071. (1977)