

B4604

**SZABAD GYÖKÖK SZEREPE  
NEONATOLÓGIAI KÓRKÉPEKBEN**

*Doktori (Ph.D.) tézisek*

**HRACSKÓ ZSUZSANNA**



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2009

## **Bevezetés és célkitűzések**

Az oxigén az aerob élet kialakulásának és létezésének feltétele, emellett azonban káros hatása is ismert. A sejtekben az intermedier anyagcsere során, illetve enzimatikus és nem enzimatikus úton reaktív oxigén származékok (ROS) keletkeznek. Ezek egy része párosítatlan elektront tartalmaz, vagyis szabad gyök, melyekre jellemző a nagyfokú reaktivitás. Az élettani folyamatok során ROS termelődése elsősorban a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációhoz, és a normális celluláris aerob metabolizmushoz kötött, de a ROS lehet exogén eredetű is. A szabad gyökök a szervezetben részt vesznek számos fiziológias folyamatban, mint a kórokozók elleni nem specifikus védelemben, vagy a szignál-transzdukcióban, így nem csak károsak, sőt nélkülözhetetlenek. A szervezet ezért nem a ROS teljes kiirtására törekszik, hanem a megfelelő pro- és antioxidáns egyensúly fenntartására. Ha az egyensúly a pro-oxidánsok felé billen, oxidatív stresszről beszélünk.

Az oxidatív stressznek számos betegség és kórfolyamat patogenezisében ismert központi szerepe (pl.: ischaemiás károsodás, atherosclerosis, daganatos megbetegedések, Alzheimer-kór, az öregedés folyamata stb.).

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

Munkánk alapvető célja az IUGR patomechanizmusának részletesebb vizsgálata és megértése volt. Ennek érdekében vizsgáltuk az antioxidáns státuszt, és az oxidatív stressz indukálta károsodást normális és alacsony súlyú magzatok

esetében. Vizsgáltuk továbbá a születés módjának és az acidózisnak az újszülöttek antioxidáns státuszára gyakorolt hatását.

### **Anyagok és módszerek**

A minták a SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról származtak. Kontrollnak (n=182) tekintettük azokat a mintákat, ahol az újszülött tömege  $3250 \pm 550$ g, születés utáni 5 perces Apgar-értéke 7-10, és 37-40. gesztációs héten jött világra. Az IUGR csoportba (n=41) sorolt babák tömege  $1950 \pm 450$ g, és a 37-40. gesztációs héten születtek. A császármetszés (CS), a spontán vaginális születés (VSZ) és az epidurális érzéstelenítés összehasonlításban a kontroll csoport mintái szerepeltek. 54 koraszülöttektől származó mintán az acidózis szerepét vizsgáltuk.

Köldökzsinórvérből történő mérések: Születés után néhány ml vért gyűjtöttünk a köldökzsinórból EDTA-s Vacutainer csövekbe. Az így nyert plazmát és vörösvértestet centrifugálással szeparáltuk. A

mintákból spektrofotometriás módszerek segítségével meghatároztuk a fehérje, karbonil-protein és glutation (GSH) tartalmat, a fontosabb antioxidáns enzimek aktivitását (szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz, glutation-reduktáz, glutation-S-transzferáz, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz), a nitrit és peroxinitrit szintet, és a lipidperoxidáció mértékét. Ez utóbbinál a fotometriás mérést vörösvértesten, plazmán és vörösvértestmembrán preparátumokon is elvégeztük, illetve az eredményeket filtrációs mérésekkel erősítettük meg. A DNS-károsodás és repair vizsgálatát fluoriméter segítségével végeztük.

A mérésekhez Thermo Spectronic Biomate 5 UV-Vis fotométert és 2 csatornás (Hansatech, King's Lynn, UK) fluorimetert használtunk.

Az *arteria umbilicalis*ből történő vizsgálat: Az endotheliális NO-szintáz (ecNOS) enzim expresszióját vizsgáltuk reverz-transzkriptáz PCR reakcióval. Az RNS-t az *arteria umbilicalis*ből nyertük. Random hexamerek segítségével reverz transzkripciót, majd az ecNOS fehérjét kódoló génre tervezett primerek segítségével PCR reakciót hajtottunk végre. Belső

kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk. A PCR amplifikációt PTC 150-16 Minicycler-ben (MJ Research) és PTC-200 Peltier Thermal Cyclerberben (MJ Research) végeztük. A reakciók során keletkező fragmentumok detektálását 1,8 %-os agaróz gélen végeztük elektroforézissel. Az ethidium-bromidos festéssel detektált géleket GDS 7500 gél dokumentációs rendszerrel digitalizáltuk. Az analízist GelBase/GelBlot™ Pro Gel Analysis Software (UVP) segítségével.

### **Eredmények és értékelésük**

Munkám alapvető célja az IUGR patomechanizmusának vizsgálata és részletesebb megértése volt, és ezt a kérdést az oxidatív stresszel kapcsolatos paraméterek felderítésével kívántuk megközelíteni. A SZTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikától kapott nagyszámú minta azonban lehetővé tette számunkra, hogy egyéb szempontokat is figyelembe vegyünk vizsgálatainknál.

Számos egymásnak igencsak ellentmondó közlemény látott napvilágot, melyek azt vizsgálják, melyik születési mód a legkíméletesebb az oxidatív stressz szempontjából az anya és a magzat számára egyaránt. Saját méréseink értékeléséből az tűnik ki, hogy habár van némi eltérés a különböző születési módok között, ezek az eltérések nem következetesek és nem szignifikánsak. Érdekes volt azonban, hogy az epidurális érzéstelenítéssel született újszülöttek esetében mindig kedvező értékeket tapasztaltunk, vagyis fájdalom kiiktatása nemcsak a magzat vérkeringését serkenti, hanem nagymértékben csökkenti az oxidatív stressz mértékét is.

A mérési eredmények, és a statisztikai értékelés azt mutatja, hogy az IUGR-ban szenvedő újszülöttek antioxidáns védelme a koraszülöttekéhez hasonlóan fejletlen. Az össz-antioxidáns kapacitás, és a redukált glutation antioxidáns molekula szintje is szignifikáns mértékben alacsonyabb az érett újszülöttekhez képest. Az utóbbi nemcsak kisebb koncentrációban van jelen, hanem szintje gyakorlatilag minimálisnak tekinthető. A teljes GSH

redox ciklus vizsgálatára szükségünk volt, hogy magyarázatot találjunk a jelenségre. A GSH-készlet regenerációjáért felelős enzimek aktivitása, különösen a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim esetében szignifikánsan alacsony volt. A GSH szintézis mértéke is szignifikánsan elmaradt a kontrollcsoporthoz képest. A GSH-t kofaktorként felhasználó enzimek szempontjából azonban nem találtunk eltérést az IUGR csoportban. További vizsgálatainkból az is kiderült, hogy nemcsak a oxidatív, hanem a nitroztatív stressz is jelentős az IUGR újszülöttek köldökvérében. Így arra következtetünk, hogy ezen paraméterek additíven járulnak hozzá a GSH-depléciohoz.

Az oxidatív károsodás mértéke minden vizsgált paraméter esetében szignifikánsan magasabb, míg az antioxidáns enzimek aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt IUGR mintákban.

Szintén kimutattuk, hogy az ecNOS expressziója több, mint 2-szeres az IUGR-s babák köldökartériájában.

A magas ecNOS expresszió valószínűleg egy adaptációs válasz a magzati keringésben uralkodó



magas perifériás rezisztenciára. A magas NO szint tehát egy kompenzációs mechanizmus eredménye. Az NO, mint vasodilatátor hatékonyan járulhat hozzá a renyhe magzati vérkeringés sekentéséhez. Másrészt viszont figyelembe kell venni azt is, hogy az IUGR babák SOD aktivitása igencsak alacsony. A SOD enzim felel a szuperoxidgyök közömbösítéséért. Hiányos enzimaktivitás esetén a szuperoxid-szint növekszik. A szuperoxid gyök könnyedén reagál a NO-al, és a reakciójukból keletkezik a stabil és toxikus peroxinitrit. A peroxinitrit citoxitása több szinten is érvényesül. Egyrészt LP-t iniciál, másrészt megtámadja a –SH csoportokat, fehérje-degradációt és GSH-depléciót okozva. Harmadrészt a DNS-t károsítja.

A LP-nak vörösvértetek esetében különösen nagy jelentősége van. Ezek a sejtek ugyanis képesek arra, hogy a saját átmérőjüknél kisebb kapillárisokba is átjussanak. A membrán integritás alapvető feltétele a megfelelő deformációs képességnek. Amint azt az LP mérések és a filtrációs kísérletek is mutatják, IUGR mintákban a vörösvértetek nem kellőképpen

intaktak. A magas LP értékek és az alacsony filtrációs sebesség arra utal, hogy a rugalmasság csökkenésével a vörösvértestek nem tudják teljes mértékben ellátni szállítófunkciójukat.

A GSH hiánya szintén súlyos következménye a peroxinitrit toxicitásnak.

A végső konklúzió, hogy IUGR magzatoknál a túlzott ecNOS expresszió egy kompenzációs mechanizmus a magzati-anyai vaszkulátúrában uralkodó magas rezisztenciára, így ezáltal a vérkeringés hivatott serkenteni. A magas NO szint azonban alacsony antioxidáns védelemmel párosul, így ezeknél a magzatoknál a vérkeringést serkentő mechanizmus egy extra oxidatív stresszt eredményez. Mivel a vazodilatációra, a keringés serkentésére, vagyis a magas NO koncentrációra ezeknek a magzatoknak feltétlenül szüksége van, a terápiás lehetőséget az antioxidáns védelem megerősítésében látjuk, ami egyrészt mérsékelhetné az oxidatív stressz okozta szöveti károsodás mértékét, másrészt a gyökök eliminálásával lehetővé tenné a NO-nak, hogy kifejtsen kedvező értágító hatását,

ahelyett, hogy peroxinitritté alakulva stresszorként viselkedjen.

### **Következtetések**

- A császármetszés nem előnyösebb szülési mód az oxidatív stressz szempontjából, viszont az epidurális érzéstelenítésnek kedvező a hatása.
- IUGR újszülöttek antioxidáns státusza jelentős fejletlenséget mutat.
- Elsőként vizsgáltuk a teljes GSH redox ciklust IUGR újszülötteknél: a szignifikáns GSH-hiány az alacsony szintetizációs ráta, a nagy mennyiségű szabad gyök és a GSH-t regeneráló enzimek csökkent aktivitásának következménye.
- A vörösvértestmembránok károsodása jelentős IUGR újszülötteknél, ami csökkent szállítófunkciót eredményez.

- Jelentős az eltérés az ecNOS expresszióban; IUGR újszülötteknél egy adaptációs mechanizmus alakult ki a magas perifériás rezisztencia kompenzálására.

## **Közlemények**

### **A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:**

**Hracsko Z, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS:** Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. In Vivo 21(4):703-6, 2007. **IF: 1,143**

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

**IF:1,6**

**Hracsko Z**, Hermes E, Ferencz A, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS: Endothelial nitric oxide synthase is up-regulated in the umbilical cord of pregnancies complicated with intrauterine growth retardation In Vivo, In press, 2009.

**Folyóiratban megjelent, idézhető összefoglalók:**

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

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

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

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

### **Absztrakt kötetben megjelent összefoglalók**

**Hracskó Zs**, Orvos H, Novak Z, Varga IS: Oxidatív lipid, illetve fehérje károsodás és antioxidáns státusz IUGR újszülöttekben. MSZKT III. Konferenciája, Debrecen, 2005.

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

Nemzeti Egészségügyi Programok Kongresszus  
Budapest, 2007.

**Egyéb, a disszertáció témájához nem kapcsolódó  
közlemény:**

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

**IF: 6,283**

**Folyóiratban megjelent, idézhető összefoglalók:**

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

Monostori P, **Hracsko Z**, Karg E, Varga IS, Haszon I, Papp F, Sumegi V, Berecki CS, Túri S: The transient withholding of erythropoietin modifies the oxidative stress in haemodialysis. ISIRR, Novi Sad, Serbia S2-P-10, 2007.

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

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



## **Absztrakt kötetben megjelent összefoglalók**

Monostori P, Túri S, **Hracskó Zs**, Haszon I, Sümegi V, Bereczki Cs: Epoetin beta és darbepoetin alfa kezelés uraemiás betegeknél. Az oxidatív stressz szerepe. Magyar Nephrológiai Társaság XXIII. Nagygyűlése, Eger, Hypertonia és Nephrológia (10) S76, 2006.

Monostori P, **Hracskó Zs** és mtsai: Az oxidatív stressz követése hemodializált betegek eritropoetin-kezelésének felfüggesztése után. Pro Medicina Nemzeti Egészségügyi Programok Kongresszus, Budapest, 2007.

**Hracskó Zs**, Sarusi I, Novak Z, Varga IS: Oxidatív fehérje károsodás kimutatása patkány bronchoalveolaris mosatban ismételt mintavételi technika segítségével. MSZKT IV. Kongresszusa, Pécs, Folia Hepatologica 11(S3):20, 2007.