

I.

 Original Contribution

GLUTATHIONE STATUS IN RETINOPATHY OF PREMATUREITY

ANDREA PAPP,* ILONA NÉMETH[†], ESZTER KARG,[†] and ESZTER PAPP[†]

*Department of Ophthalmology and [†]Department of Pediatrics, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Hungary

(Received 16 December 1998; Revised 8 February 1999; Accepted 8 February 1999)

Abstract—This study examines the glutathione status of red blood cells in patients with retinopathy of prematurity (ROP) both in vivo and after an in vitro oxidative challenge. Fifty ROP patients of different ages (between 6 weeks and 6 years), born prematurely (gestational age: 28.7 ± 1.3 weeks; birth weight: 1210 ± 313 g; mean $\pm$ SD) suffering either from active ROP (<3 months old; $n = 12$) or from a visual handicap due to preceding ROP (3 months–6 years; $n = 38$) as well as control patients of similar age and maturity ($n = 56$) were included. Infants with active disease have the lowest levels of reduced glutathione (GSH), the highest levels of oxidized form (GSSG), the highest GSSG/GSH ratios and the greatest fall in GSH after an in vitro oxidative challenge. After an in vitro oxidative stress, defective glutathione recycling was found in patients with preceding ROP and was suggested as a factor predisposing to oxidative hemolysis. The glutathione redox ratio was warranted as a biochemical screen for active ROP in premature infants. © 1999 Elsevier Science Inc.

Keywords—Reduced/oxidized glutathione, Redox ratio, Glutathione recycling, Free radicals

INTRODUCTION

Retinopathy of prematurity (ROP) is a disease of the incompletely vascularized immature retina, characterized by retinovitreal neovascularization, and possibly retinal detachment and blindness [1,2]. ROP was the original classical manifestation of oxygen toxicity due to excessive oxygen administration in extremely premature infants. Although oxygen therapy has subsequently been restricted and is now precisely controlled in modern neonatal intensive care units, the disease remains a major cause of blindness in childhood. Such cases are currently more frequent as a consequence of the increased rate of survival of the most premature infants [3].

In several studies, logistic regression analysis has demonstrated that the gestational age and the frequency of blood transfusions are the only parameters independently associated both with the occurrence of ROP and with its severity [4–7]. We hypothesized that, as anemia and immaturity are common pathologic signs of the disease, the red blood cells (RBCs) of ROP patients might display a special susceptibility to reactive oxygen intermediates (ROIs). On the supposition of an imbalance

between the production of ROIs and the antioxidant protective capacity of the RBCs, a study of ROP patients of different ages was carried out.

Red blood cells handle the permanent intracellular oxidative stress through the combined activities of superoxide dismutase, catalase and the glutathione-dependent defense system. The most important intracellular antioxidant, glutathione, is present mainly in a reduced form (GSH), and at a far lower concentration in an oxidized form (GSSG) [8]. The efficient recycling of GSSG to GSH through the inter-related enzyme systems glutathione reductase (E.C. 1.6.4.2) and glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD; E.C. 1.1.1.49) is a requirement for adequate antioxidant protection [8]. The aim of the present study was to acquire information on the glutathione antioxidant status of the RBCs in ROP patients in different stages of the illness, and to assess the recycling capacity of the RBCs after an in vitro oxidative insult related to the antioxidant protection of hemoglobin (Hb).

MATERIALS AND METHODS

Patients

We studied 50 ROP patients of different ages (between 6 weeks and 6 years), who had been born prematurely (gestational age: 28.7 ± 1.3 weeks; birth weight:

Address correspondence to: Ilona Németh, MD, PhD, Department of Pediatrics, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Hungary, H-6701, POB: 471. Tel: +36 (62) 455-332/1112; Fax: +36 (62) 455-329; E-Mail: nemethil@pedia.szote.u-szeged.hu.

Table 1. Description of ROP Patient Population

ROP stages	Age				Sex M/F	Number of patients
	6 Weeks–3 months	3 Months–1 year	1–3 Years	3–6 Years		
1–2	2	5	—	—	3/4	7
2–3	6	2	5	5	8/10	18
4–5	4	7	7	7	17/8	25
Number of patients	12	14	12	12	28/22	50
Gestational age (weeks)	29.2 ± 2.2	28.8 ± 1.6	28.7 ± 1.3	27.6 ± 2.7		
Birth weight (g)	1300 ± 285	1226 ± 250	1210 ± 313	1096 ± 196		

1210 ± 313 g; mean ± SD). Twelve patients were studied at the time of their ROP screening at the Perinatal Intensive Care Unit of Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Hungary. Fourteen infants and 24 children suffering from a visual handicap due to preceding ROP were studied at the ophthalmological follow-up clinic (Table 1). Their biochemical data were compared with those of controls of similar age ($n = 56$), who had also been born prematurely (gestational age: 29.2 ± 1.5 weeks; birth weight: 1305 ± 283 g), and treated with the same therapeutic principles, including oxygen therapy, but who had recovered without bronchopulmonary dysplasia or ROP.

The first ophthalmologic examinations were carried out at a postconceptional age of 34–36 weeks. Subsequently pupillary dilatation indirect ophthalmoscopy was used to evaluate the severity of retinal manifestation of ROP. Staging was based on the International Classification of ROP [10]. This study was approved by the Scientific Committee and the Ethical Council of Albert Szent-Györgyi Medical University.

Biochemical assays

Highly sensitive and specific separate determinations of GSSG and GSH + GSSG concentrations were carried out by a previously published method [11]. This is a combination of standard methods [8,12–14] used after validation for accurate determination, especially of GSSG values in the presence of much higher concentrations of GSH (maximum 50 times), in the presence of Hb and its oxidation products, and after sample storage.

To avoid artifactual oxidation of GSH in blood or in assay conditions, samples for GSSG measurement (25 μ L of whole blood collected over ethylenediaminetetraacetate [EDTA]) were hemolyzed within 15 min after venipuncture with cold buffer in the presence of *N*-ethylmaleimide (*N*-ethylmaleimide [NEM]; final concentration 0.02 M in 0.01 M phosphate buffer containing 0.005 M EDTA) [13]. The reaction of NEM with GSH results in the formation of a stable complex, that prevents

its possible oxidation to GSSG. After incubation with NEM for 60 min at 25°C metaphosphoric acid (final concentration 3%, w/v) was used to precipitate proteins [8]. Supernatant can be stored at -20°C (maximum 6 d) until spectrophotometric determination of GSSG. As NEM is an inhibitor of glutathione reductase, it was separated from the supernatant by gel filtration with Sephadex G-10 and controlled by measuring the absorbance of NEM at 315 nm [14] immediately before GSSG measurement.

For measuring the total concentration of GSH + GSSG according to Tietze [13], 25 μ L of whole blood anticoagulated with EDTA was immediately hemolyzed in 2.5 ml of cold 0.01 M sodium phosphate buffer containing 5 mM EDTA, pH = 7.5, and stored at -20°C until spectrophotometric analysis (maximum wait: 6 days). The possible oxidation of GSH to GSSG catalyzed by heme compounds during storage has no influence on the total amount of GSH+GSSG.

The same standard glutathione assay mixture was used for the analysis of GSSG and GSSG + GSH concentrations. Reagents were dissolved in 0.1 M sodium phosphate/0.005 M EDTA buffer, pH = 7.5; the final volumes were 1.0 mL. Components were added in the following order: 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) (0.6 μ M), GSSG (0.4 mL of supernatant after NEM removal) or GSH + GSSG (25 μ L of hemolysate), glutathione reductase (10 μ g) and NADPH (0.2 μ M). The combined actions of DTNB and NADPH in the presence of glutathione reductase result in a reaction cycle the rate of which depends on the concentration of GSH + GSSG recorded at 412 nm during the first 6 min.

Reduced glutathione (μ mol) and GSSG (nmol) concentrations were calculated by using 5–100 nmol GSSG standards and expressed with reference to Hb determined simultaneously by the cyanmethemoglobin method [11]. As the main role of GSH is the protection of Hb, it is necessary to correct the measured GSH for the actual Hb value as described by the authors of standard methods [8,12,13].

The 'GSH stability test' according to Beutler [15] was

described to measure the capacity of the glutathione redox system to protect Hb after an *in vitro* oxidative stress. Acetylphenylhydrazine (APH) (0.33 mM) was added to the whole blood sample, together with sufficient glucose. After incubation at 37°C for 60 min with APH, RBCs deficient in G6PD, but not the normal ones, suffer a marked fall in GSH level, accompanied by a pronounced Hb oxidation [15]. The proportion of oxidized derivatives of Hb (metHb and hemichrome) along with the concentration of GSH before and after APH incubation was determined by the method of Winterbourn [16] and Tietze [13] respectively.

Statistical analysis

Clinical data on the patients are reported as means $\pm$ SD ($x \pm$ SD), whereas results of biochemical analyses are shown in figures as means $\pm$ standard errors ($x \pm$ SEM). Statistical analyses included both parametric (variance analysis, Tukey test and Student's *t*-test) and nonparametric tests (Wilcoxon rank test). When the variances between pairs of groups differed significantly from each other ($p < .05$ in the *F*-test), we used the Welch test (*d* probe) instead of a *t*-test to compare the mean values. Correlations between parameters were characterized by calculation of the linear regression and correlation coefficients. The significance level for all tests was taken as $\alpha = .05$.

RESULTS

Reduced glutathione and GSSG values for the various groups are shown in Fig. 1. A highly increased GSSG/GSH was seen in the patients younger than 3 months old with simultaneous active ROP, as compared either with the controls of the same age or the ROP patients of any older age (Fig. 1).

There was a significant negative correlation between the GSH oxidation (measured either as GSSG concentration, or as the ratio GSSG/GSH) and the total Hb concentration in the ROP patients less than 3 months old ($r = -0.596$, $n = 12$, $p < .001$ for GSSG; $r = -0.546$, $n = 12$, $p < .001$ for GSSG/GSH). Thus, the extent of *in vivo* oxidative stress showed a correlation with the extent of anemia in these premature with simultaneous active ROP.

The ratio of GSH concentrations after and before an *in vitro* oxidative stress with APH, the 'residual GSH ratio' measured in the various patient groups is shown in Fig 2. Greater fall in GSH was seen in all the ROP patient groups as compared with the controls. After an *in vitro* APH challenge, the proportions of oxidized derivatives of Hb (metHb + hemichrome) could not exceed the

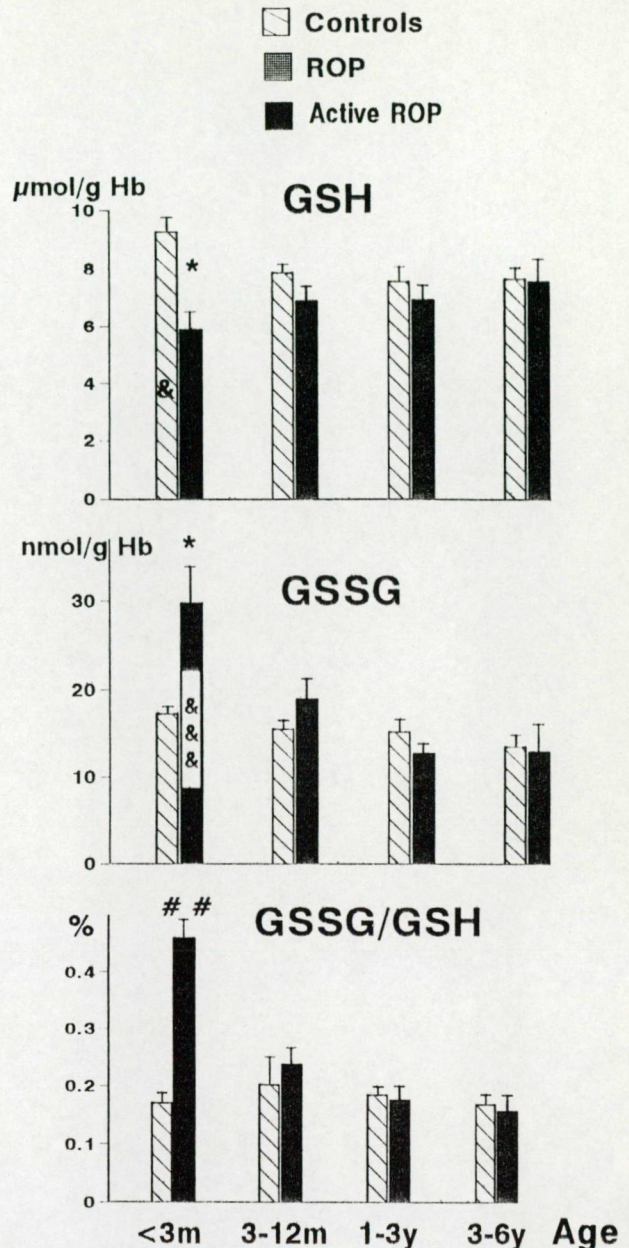


Fig. 1. Concentration of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and their molar ratio (GSSG/GSH) in whole blood of controls and ROP patients of different ages (mean $\pm$ SEM). Statistical significance: * $p < .05$, ** $p < .001$ vs. different age groups ($n = 12-16$); * $p < .05$ vs. controls ($n = 12-16$); # $p < .01$ vs. controls and different age groups.

increased levels of the controls in the active ROP patients, but it was higher in each of the other age groups (Fig. 2). The defective recycling of GSH was associated with an increase in Hb oxidation in ROP patients, with the exception of the youngest ones, where Hb oxidation had already occurred as a physiologic phenomenon in the neonatal period.

There was a highly significant negative correlation

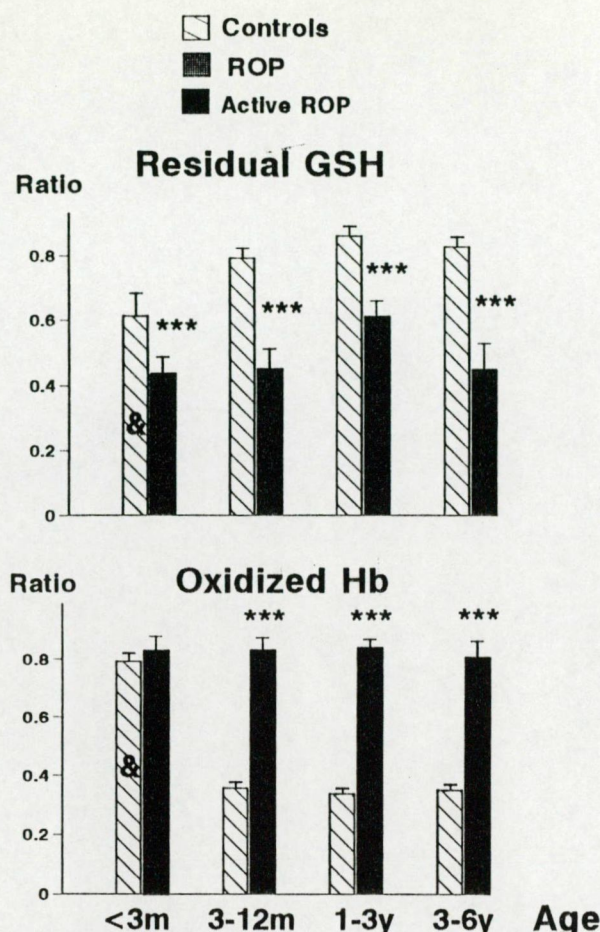


Fig. 2. Ratio of GSH concentrations (residual GSH) and methemoglobin + hemichrome proportions (oxidized Hb) after/before an in vitro oxidative challenge with acetylphenylhydrazine (mean $\pm$ SEM). Statistical significance: * $p < .05$ vs. age groups ($n = 12-16$); *** $p < .001$ vs. controls ($n = 12-16$).

between the GSH recycling and the Hb oxidation caused by APH both in the controls ($r = -0.608$, $n = 56$, $p < .001$) and in the patients with ROP; ($r = -0.597$, $n = 50$, $p < .001$). Greater GSH depletion was accompanied by a more extensive oxidation of Hb after a calibrated in vitro oxidative stress.

DISCUSSION

The retina is one of the organs most directly exposed to high oxygen tension, and the endothelial cells of its microvessels as well as the cells of the retinal epithelium are highly susceptible to ROI injury. There is a great similarity between the human retina and the RBCs concerning their membrane structure (very long chain unsaturated fatty acids with a marked susceptibility to oxidative insult), their metabolism (high demands for glucose and oxygen) and their antioxidant mechanisms

[17,18]. Therefore, the oxidative status of the RBCs can be used as a biological index of retinal oxidative injury [19,20]. On the other hand, there is increasing evidence that the efficient glutathione recycling of the RBCs is involved in the protection against oxidative damage not only of the RBCs themselves, but also of other tissues (e.g., lung) in premature infants [9,11,21].

Besides its direct antioxidant activity [22] and its nature as a cofactor for enzymatic reactions through glutathione peroxidase, GSH is a direct scavenger of free hemin [23]. Hemin with its hydrophobic nature, is a more potent catalyst of lipid peroxidation in RBC membrane than nonheme irons, and plays a significant role in the acceleration of RBC destruction [24].

In the control patients in the present study, the GSH concentration was highest in the youngest patient group (Fig. 1) in accordance with the results of previous studies, where the RBCs of healthy newborn babies (both term and preterm) displayed a higher GSH content [9,21] and a more efficient GSSG recycling after an in vitro oxidative insult compared with adults [9].

A reduced GSH together with an increased GSSG, resulting in a high ratio GSSG/GSH, was present in our study in the premature less than 3 months old simultaneously with the clinical signs of the acute phase of ROP (Fig. 1). This finding suggested that the GSSG/GSH was a reliable parameter of an oxidative injury present in the most immature and most susceptible babies with active ROP.

The significant negative correlation found between the GSH oxidation and the Hb concentration in the premature with active ROP confirmed our hypothesis that the permanent oxidative stress contributed to the development of anemia due to oxidative hemolysis through a GSH-depleting mechanism. The possibility of a defective GSH synthesis as a cause of the reduced GSH concentration in the newborn period has recently been excluded [26].

In another recent study on prematures with chronic lung disease and 31% ROP incidence whose gestational age was similar to that in our group, a significantly reduced GSH concentration was similarly measured in the RBCs on day 28 as compared with the controls [27]. The prolonged oxidative stress, together with the suspected loss of riboflavin, a coenzyme for glutathione reductase, were suggested to result in the impaired GSH recycling [27].

Evidence from previous studies indicated that the GSH recycling capacity was more important in resisting oxygen toxicity than the GSH concentration itself [9,27,28]. The activity of the first and key enzyme of the hexose-monophosphate shunt, G6PD, and the level of its mRNA are rapidly and transiently enhanced in human cell lines in different tissues after sustained oxidative

stress [28,29]. A method of calibrated in vitro oxidative challenge with APH was evolved by Beutler [15] to recognize patients with defective G6PD activity resulting in insufficient GSH recycling. Subjects with reduced recycling capacity are in danger of oxidative hemolysis after the administration of oxidant drugs or during infection [30–32]. In the present study a reduced GSH recycling was proven both in active ROP patients and in infants and children with sequelae of preceding ROP as compared with that of the controls. On the basis of this finding, we suggest that a defective GSH recycling capacity of RBCs could be a factor predisposing to oxidative hemolysis and ROP.

We used an in vitro test to measure the functional protective antioxidant capacity of the RBCs, rather than to determine the activities of the antioxidant enzymes (glutathione reductase or G6PD) separately. Previous studies have already revealed that caution is necessary in interpreting the protective role of antioxidant enzymes on the basis of their activities measured in the hemolysate, because the physiologic activity, and not the in vitro activity of the enzymes, is related to their protective capacity [31]. On the other hand, the G6PD activity was previously demonstrated to be higher in neonatal RBCs than in a non-neonatal control group [33,34].

We hypothesized that exhaustion of the GSH supply, partly due to insufficient recycling, has a pathogenetic role in the development of ROP in premature infants. In such cases both RBCs and nucleated cells are particularly susceptible to acute oxidative stress. Our biochemical investigations were carried out after the acute oxidative insult causing ROP had taken place, during the usual ROP screening or later checks. Our results suggest that a prospective study is warranted during the early perinatal period to prove that the RBC glutathione redox ratio, an in vivo oxidative stress index in premature infants, might be a reliable parameter facilitating the early recognition of patients in immediate danger of ROP development.

Acknowledgements — This study was supported financially by the Hungarian Research Fund (OTKA F20262; T22562), and the Hungarian Ministry of Welfare (ETT 625/13; 631/08).

REFERENCES

- [1] Phelps, D. L. Retinopathy of prematurity. *Curr. Prob. Pediatr.* 22:349–371; 1992.
- [2] Flynn, J. T.; Tasman, W., eds. *Retinopathy of prematurity. A clinician's guide*. New York: Springer-Verlag; 1992.
- [3] Gibson, D. L.; Sheps, S. B.; Uh, S. H.; Schechter, M. T.; McCormick, A. Q. Retinopathy of prematurity-induced blindness: birth-specific survival and the new epidemic. *Pediatrics* 21:241–246; 1995.
- [4] Sacks, L. M.; Schaffer, D. B.; Anday, E. K.; Peckham, G. J.; Delivoria-Papadopoulos, M. Retrolental fibroplasia and blood transfusion in very low-birth-weight infants. *Pediatrics* 68:770–774; 1981.
- [5] Cooke, R. W. I.; Clark, D.; Hickey-Dwyer, M.; Weindling, A. M. The apparent role of blood transfusions in the development of retinopathy of prematurity. *Eur. J. Pediatr.* 152:833–836; 1993.
- [6] Hesse, L.; Eberl, W.; Schlaud, M.; Poets, C. F. Blood transfusion. Iron load and retinopathy of prematurity. *Eur. J. Pediatr.* 156: 465–470; 1997.
- [7] Inder, T. E.; Clemett, R. S.; Austin, N. C.; Graham, P.; Darlow, B. A. High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. *J. Pediatr.* 131:541–544; 1997.
- [8] Srivastava, S. K.; Beutler, E. Accurate measurement of oxidized glutathione content of human, rabbit, and rat red blood cells and tissues. *Anal. Biochem.* 25:70–76; 1968.
- [9] Clahsen, P. C.; Moison, R. M. W.; Holtzer, C. A. J.; Berger, H. M. Recycling of glutathione during oxidative stress in erythrocytes of the newborn. *Ped. Res.* 32:399–402; 1992.
- [10] The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. An international classification of retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 74:127–133; 1984.
- [11] Németh, I.; Boda, D. Blood glutathione redox ratio as a parameter of oxidative stress in premature infants with IRDS. *Free Radic. Biol. Med.* 16:347–353; 1994.
- [12] Akerboom, T. P. M.; Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77:373–382; 1981.
- [13] Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27:502–522; 1969.
- [14] Güntherberg, H.; Rapaport, S. Eine Methode zur Bestimmung des oxydierten Glutathions. *Acta biol. med. germ.* 20: 559–563; 1968.
- [15] Beutler, E. The glutathione instability of drug-sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. *J. Lab. Clin. Med.* 49:84–95; 1957.
- [16] Winterbourn, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.* 186:265–273; 1990.
- [17] Puertas, F. J.; Diaz-Llopis, M.; Chipont, E.; Romá, J.; Raya, A.; Romero, F. J. Glutathione system of human retina: enzymatic conjugation of lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 14:549–551; 1993.
- [18] De La Paz, M. A.; Zhang, J.; Fridovich, I. Antioxidant enzymes of the human retina: effect of age on enzyme activity of macula and periphery. *Curr. Eye Res.* 15:273–278; 1996.
- [19] Thornalley, P. J.; McLellan, A. C.; Lo, T. W. C.; Sönksen, P. H. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin. Sci.* 91:575–582; 1996.
- [20] Prashar, S.; Pandav, S. S.; Gupta, A.; Nath, R. Antioxidant enzymes in RBCs as a biological index of age related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 71:214–218; 1993.
- [21] Shahal, Y.; Bauminger, E. R.; Zmora, E.; Katz, M.; Mazor, D.; Horn, S.; Meyerstein, N. Oxidative stress in newborn erythrocytes. *Ped. Res.* 29:119–121; 1991.
- [22] Winterbourn, C. C.; Metolicwa, D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 314:284–290; 1994.
- [23] Shviro, Y.; Shaklai, N. Glutathione as a scavenger of free hemin. A mechanism of preventing red cell membrane damage. *Biochem. Pharmacol.* 36:3801–3807; 1987.
- [24] Chiu, D. T.-Y.; van den Berg, J. J. M.; Kuypers, F. A.; Hung, I.-J.; Wei, J.-Sh.; Liu, T.-Z. Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of hemin release. *Free Radic. Biol. Med.* 21:89–95; 1996.
- [25] Jain, S. K. The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. *Semin. Hematol.* 26:257–276; 1989.
- [26] Lavoie, J.-C.; Chessex, P. Development of glutathione synthesis and γ -glutamyl transpeptidase activities in tissues from newborn infants. *Free Radic. Biol. Med.* 24:994–1001; 1998.
- [27] Moison, R. M. W.; Haasnoot, A. A.; Van Zoeren-Grobbe, D.; Berger, H. M. Red blood cell glutathione and plasma sulfhydryl in



- chronic lung disease of the newborn. *Acta Paediatr.* 86:1363–1369; 1997.
- [28] Suttorp, N.; Kastle, S.; Neuhoof, H. Glutathione redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hyperoxia. *Lung* 169:203–214; 1991.
- [29] Ursini, M. V.; Parrella, A.; Rosa, G.; Salzano, S.; Martini, G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem. J.* 323:801–806; 1997.
- [30] Beutler, E. Genetic disorders of red cell metabolism. *Med. Clin. North America* 53:813–824; 1969.
- [31] Yoshida, A. Hemolytic anaemia and G6PD deficiency. *Science* 179:532–537; 1973.
- [32] Baechner, R. L.; Nathan, D. G.; Castle, W. B. Oxidant injury of caucasian glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red blood cells by phagocytosing leukocytes during infection. *J. Clin. Invest.* 50:2466–73; 1971.
- [33] Butenandt, O. Glutathione, glutathionperoxydase, glutathionreduktase, glucose-6-phosphat dehydrogenase, lactatdehydrogenase und katalase in erythrocyten von neugeborenen, sauglingen und kindern und ihre beziehung zur heinzkörperbildung. *Z. Kinderheilk.* 111:149–161; 1971.
- [34] Beutler, E.; Blume, K. G.; Kaplan, J. C.; Lohr, G. W.; Ramot, R.; Valentine, W. N. International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br. J. Haematol.* 35:331–340; 1977.

ABBREVIATIONS

- APH—acetylphenylhydrazine
 G6PD—glucose-6-phosphate-dehydrogenase
 GSH—reduced glutathione
 GSSG—oxidized glutathione
 GSSG/GSH—glutathione redox ratio
 Hb—hemoglobin
 NEM—N-ethylmaleimide
 RBCs—red blood cells
 ROIs—reactive oxygen intermediates
 ROP—retinopathy of prematurity

II.

A RETROSPECTIVE OPHTHALMOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDY ON THE ANTIOXIDANT DEFENSE CAPACITY OF PATIENTS SUFFERING FROM RETINOPATHY OF PREMATURITY

A. PAPP, I. NÉMETH, S. PELLE

Dept. Ophthalmology and Pediatrics, Albert Szent-Györgyi

Medical University, Szeged, Hungary

INTRODUCTION

Even though there is a long list of aethiological factors leading to retinopathy of prematurity (ROP) such as hyperoxia, hypoxia, immaturity (low birth weight and gestational age), apnoe, anaemia, blood transfusions, sepsis, light exposition, vitamin E deficiency, oxygen radicals etc., the precise pathogenesis of this disease is still unknown (1,2). Supposing that a special susceptibility of ROP-patients to the free oxygen radicals does exist (eg. some kind of trace element or vitamin deficiency causing decreased activity of antioxidant enzymes), which can be detected later, even in childhood, a retrospective study of patients of different ages (born prematurely) suffering from severe ROP was carried out. Becasuse of the special similarity between the erythrocytes' cell membrane and the infant retina both in their structure (very long chain unsaturated fatty acids) and antioxidant defense systems (glutathione-peroxidase, superoxid dismutase, vitamin E) we have chosen the erythrocytes as a model to demonstrate and follow the oxidative status of our patients.

MATERIALS and METHODS

The study was carried on 36 patients of different ages (3 month-18 years) born prematurely suffering from severe ROP (stage 4 or 5) in comparison with the controls at the same age. The concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathiones were determined (1), and their molar ratio (GSSG/GSH) as an index of the oxidative stress in vivo was used. GSH stability test according to Beutler (2) was measured, i.e. the residual GSH (%) after in vitro incubation with acetylphelylhydrazine (APH) at 37°C for 1 hour reflecting the susceptibility of red blood cells (RBC) to oxidative stress. Hemoglobin oxidation in response to APH was followed by measuring the amounts of metHb and haemichrome (oxidized derivates of Hb) as % of total Hb. Blood selenium concentrations were determined by fluorimetric method (4).

RESULTS

The glutathione redox system of the ROP patients above 3 months of age is already balanced, showing no sign of an oxygen radical injury. In patients at the age of 3 months we could see the signs of an acute oxidative stress (GSSG/GSH ↑) (Fig. 1).

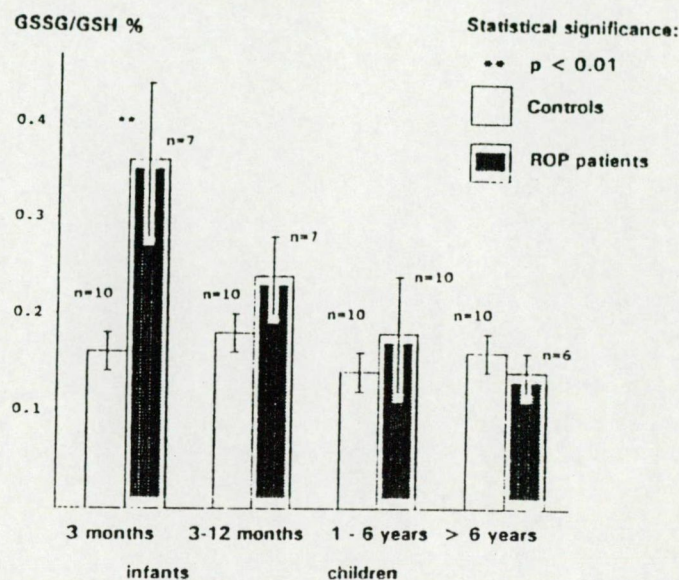


Fig. 1 The redox ratio of RBC in ROP patients and in controls

Nevertheless, following an *in vitro* oxidative stress an increased susceptibility of RBC was found in all of our patient-groups (Fig.2).

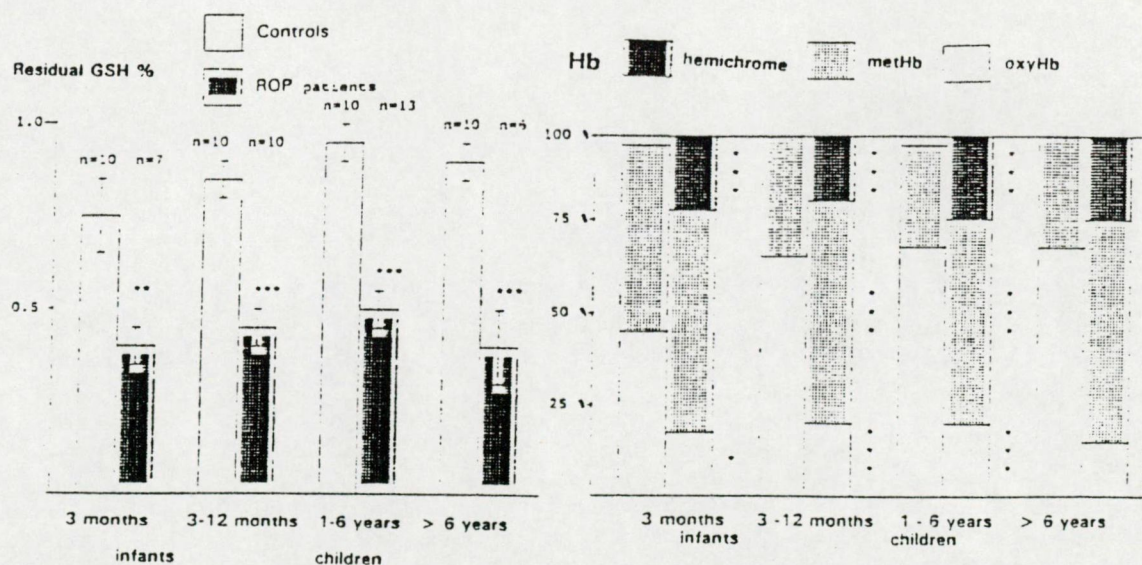


Fig. 2 The stability of GSH and oxidation of hemoglobin after an *in vitro* oxidative stress

The ratio of residual and initial amounts of GSH was decreased and the amount of oxidized derivatives of Hb was increased, which means that the Hb denaturation was increased (Fig. 2). The selenium levels were low in all of our ROP patient groups especially in 3-month old patients (Fig. 3).

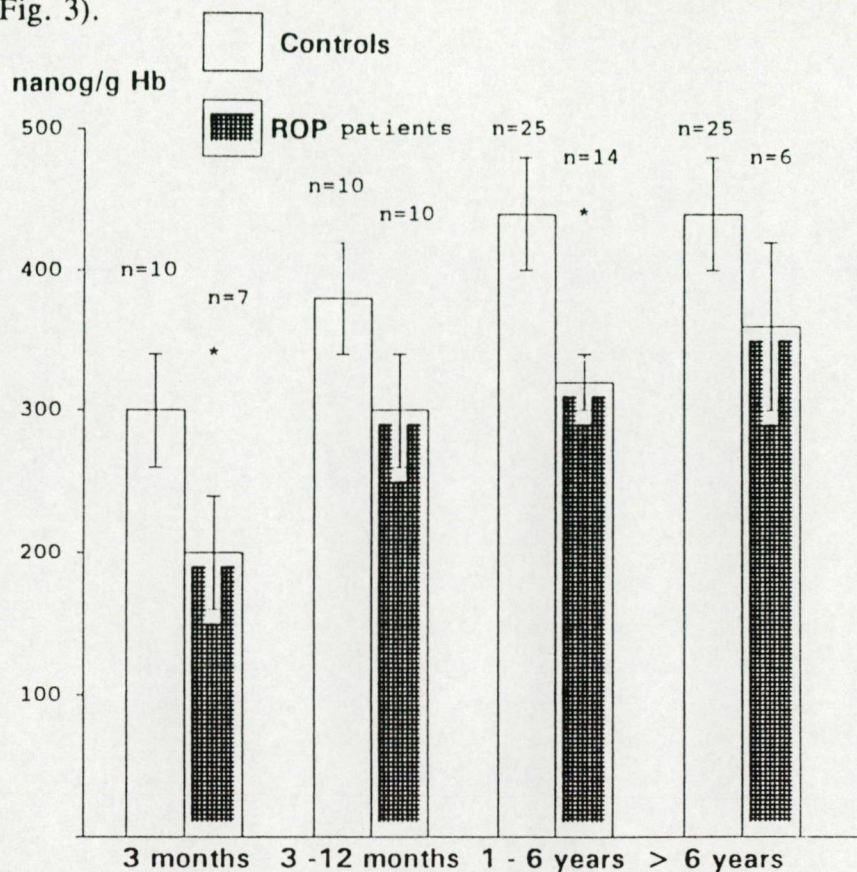


Fig. 3 Blood selenium concentrations in ROP patients and in controls

Conclusions:

1) The signs of an acute oxidative stress could only be seen in the 3-months-old patients supporting the Saugstad hypothesis (7) that ROP is a part of the 'Oxygen Radical Disease of Prematurity' together with bronchopulmonary dysplasia, respiratory distress syndrome and necrotizing enterocolitis.

2) Selenium is not only an integral part of GSH-Px enzyme, but has an antioxidant role in itself (in regeneration of vitamin E) the very low selenium levels measured in all of our patient groups indicate a reduced antioxidant capacity of RBC especially in patients of 3 months. Selenium depletion might play an important role in the pathogenesis of ROP. On the basis of our results a prospective study should be carried out during the perinatal period in order to control the oxidative stress and the antioxidant capacity of the premature infants paying special attention to the selenium supply.

SUMMARY

Oxygen radical injury may be one of the factors leading to retinopathy of prematurity (ROP). Supposing, that premature infants may have defects in their antioxidant systems which can be detected later, even in childhood, a retrospective study of 36 patients of different ages (born prematurely) suffering from severe ROP was carried out. According to our results, the signs of an acute oxidative stress could only be seen in the 3 month-old patients' erythrocyte glutathione redox system which was independent from the clinical severity of retinopathy. However, following an in vitro oxidative stress an increased susceptibility of erythrocytes was found in all of our patient groups, i.e. the ratio of residual and initial amounts of reduced glutathione was decreased and the amount of oxidated derivatives of haemoglobin was increased. The very low selenium levels measured in all of our patient groups indicate that selenium depletion even in Hungary might play an important role in the pathogenesis of ROP.

REFERENCES

- 1) Editorial: Retinopathy of prematurity. *Lancet*, 337: 83, 1991.
- 2) Editorial: Oxygen restriction and retinopathy of prematurity. *Lancet*, 339: 961, 1992.
- 3) Tietze F.: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*: 27: 502-22, 1969.
- 4) Beutler E.: The glutathione instability of drug-sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. *J. Lab. Clin. Med.* 49: 84-95; 1957.
- 5) Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R.W.: Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem. J.* 220: 685-92; 1984.
- 6) Lalonde L., Jean Y., Roberts K.D., Chapdelaine A., and Bleau G.: Fluorimetry of selenium in serum or urine. *Clin. Chem.* 28: 172-74: 1982.
- 7) Saugstad O.D.: Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paed. Scand.* 79: 881-892, 1990.

III.

**A ONE-YEAR OPHTHALMOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FOLLOW-UP
STUDY ON PREMATURES WITH HIGH RISK OF RETINOPATHY**

A. PAPP, I. NÉMETH, S. PELLE, P. TEKULICS

Dept. Ophthalmology and Pediatrics, Albert Szent-Györgyi Medical University and
Children's Hospital, Szeged, Hungary

INTRODUCTION

Free radicals are created in the human body even under normal condition, but during oxygen treatment, phototherapy, blood transfusions, they are generated in increased quantity. The antioxidant protection against free radicals consists of the plasma antioxidants and the erythrocytes defense system. From the plasma antioxidants we measured the free sulfhydryl groups of proteins and sulfur containing aminoacids. The most important intracellular antioxidant defense system is the erythrocyte's glutathione redox system. Selenium is an integral part of the glutathione peroxidase enzyme acting in the enzyme's active site, and as an active antioxidant in itself. By measuring the selenium levels, we can get information not only about the glutathione peroxidase activity in an indirect way, also but about the antioxidant capacity. Supposing that patients suffering from ROP may have decreased antioxidant capacity, we tried to find biochemical parameters which explain the increased susceptibility for this particular disease.

MATERIALS and METHODS

We carried out our one-year study on 60 previously oxygen-treated infants weighed less than 2000 g (1529 ± 302 g, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$), gestational age: 32.8 ± 3.1 weeks ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$). The ophthalmological and biochemical examinations were carried out at the same time, started at the age of 6 weeks when the ROP-screening was begun. We examined the biochemical data of the available mothers as well, supposing the mother's responsibility for the child's antioxidant defense capacity, because of the nutritional factors and habits during pregnancy, for example vitamin and trace element supply.

According to their ophthalmological status, the patients were divided into 3 groups: 1) ROP free group ($n=27$; gestational age: 33.7 ± 2.5 weeks; birth weight

1707±306 g; $\bar{x} \pm \text{S.D.}$): the fundus was normal. 2) ROP suspect group (n=28; gestational age 32.3± 3.2 weeks; birth weight: 1418±273 g): the abnormal tortuosity of retinal vessels and the pale periphery, this group required special attention, they were given vitamin E (30 mg oral dosis 2-times a week). 3) Mild ROP group (n=5; gestational age 29.8±3.0 weeks; $p < 0.01$; birth weight: 1310± 330 g; $p < 0.05$): the stage 1-2 and 2-3, different types of junction between the vascular and avascular part of the retina from a demarcation line to a highly elevated ridge. None of the patients suffered from severe, stage 4-5 ROP.

Concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathiones, their molar ratio (GSSG/GSH) as an index of the oxidative stress *in vivo* (1). GSH stability test: Residual GSH (%) after *in vitro* incubation with acetylphelylhydrazine (APH) at 37°C for 1 hour (2). Hemoglobin oxidation in response to APH: amounts of metHb and haemichrome (oxidized derivates of Hb) as % of total Hb (3). 4) Blood selenium concentration as an indirect parameter of GSH-Px activity (4). The number of free sulfhydryl groups of the plasma was determined using Ellmann's reagent (5).

RESULTS

The gestational age and the birth weight of ROP patients were significantly lower than those of patients in the other two groups . We found differences neither in concentrations and ratios nor in stability of glutathiones between the patient groups according to their ROP state. On the other hand the concentrations of plasma's free sulfhydryl groups measured in our 5 ROP patients were significantly lower than the others. The same tendency was seen in case of their mothers (Fig.1). The selenium levels in ROP patients and their mothers showed the same relationship (Fig.2).

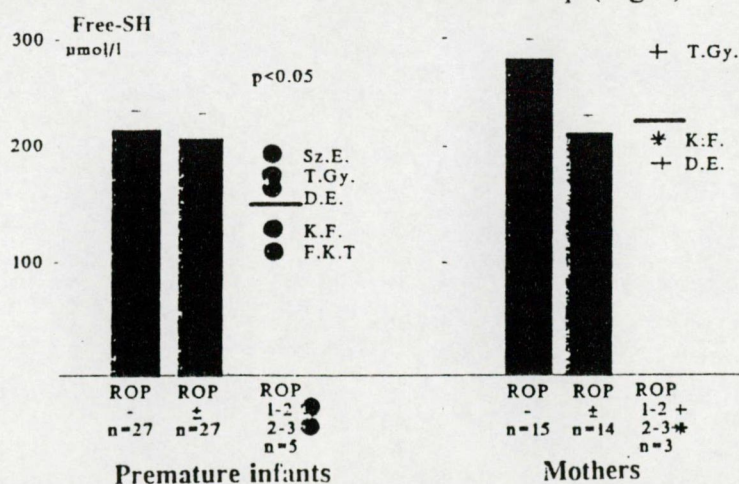


Fig.1 Concentration of plasma free sulfhydryl groups in prematures and their mothers

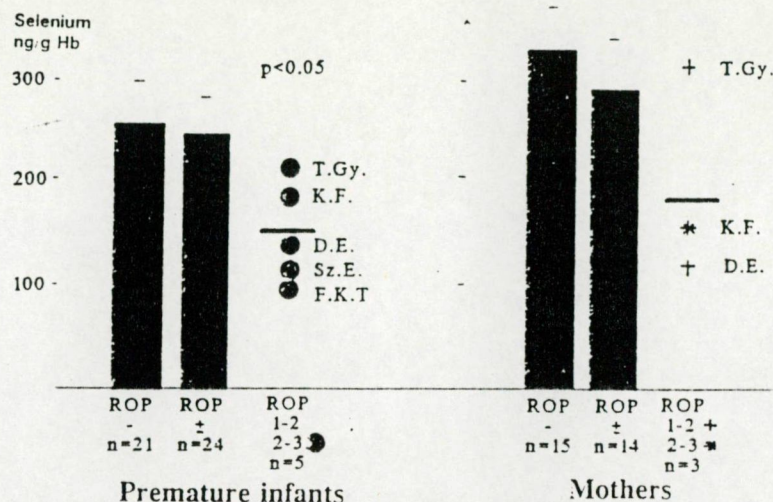


Fig. 2 Concentration of selenium in erythrocytes of prematures and their mothers

In the ROP-suspect babies at the age of 6 months we could already see ophthalmologically the positive effect of vitamin E, i.e. the avascular, pale periphery began to be vascularised, a regression was seen. A second biochemical investigation was carried out in 12 of our vitamin E treated patients Fig 3. Both the number of free sulfhydryl groups and selenium levels were increased.

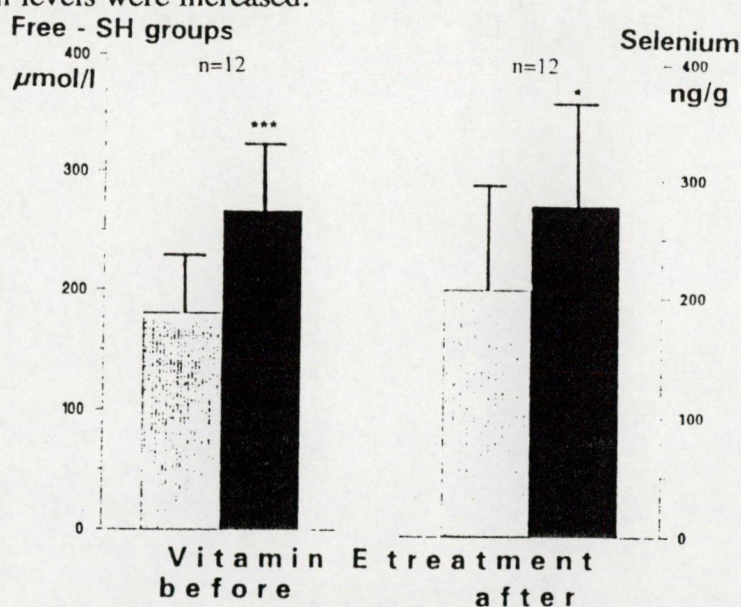


Fig. 3 Concentrations of free sulfhydryl groups and selenium in prematures after vitamin E treatment

Conclusions: 1) The fact that during our screening for ROP we could only diagnose 5 mild ROP from 60 high-risk prematures leads us to the conclusion, that the treatment of prematures at the Perinatal Intensive Care Unit of our University and the secondary treatment at Children's Hospital is very careful. 2) The present study suggests that selenium

depletion might play an important role in the pathogenesis of retinopathy of prematurity. 3) Vitamin E supplementation seems to have a positive effect on prevention of ROP development. 4) Considering the fact that a close correlation was found between the antioxidant capacity of the mothers and babies, we can conclude, that improvement of the mothers antioxidant capacity during pregnancy could be very useful in the prevention of ROP and even other oxygen radical diseases of prematurity.

SUMMARY

The study was carried out on 60 oxygen-treated premature infants weighed less than 2000 g and on their mothers. Both the ROP screening and the biochemical tests were started at the age of 6 weeks. There was no difference in the biochemical parameters of the red blood cells' antioxidant defense capacity (the glutathione stability and the oxidative status of the haemoglobin after an in vitro oxidative stress), but the concentrations of free sulfhydryl groups in the plasma, and the blood selenium levels were significantly lower in ROP patients (n=5) than in the others. The same tendency was seen in the mothers. Vitamin E treatment of ROP suspect infants seemed to have a positive effect against ROP development. The close correlation found between the antioxidant capacity of the mothers and babies suggest that the supplementation of feeding with sulfur containing aminoacids (methionin, cystein) during pregnancy would improve the antioxidant capacity of prematures, like an antioxidant cocktail suggested in literature (selenium+vitamin E) given to the high-risk mothers before delivery could be very useful in prevention of ROP.

REFERENCES

- 1) Tietze F.: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*: 27: 502-22, 1969.
- 2) Beutler E.: The glutathione instability of drug-sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity. *J. Lab. Clin. Med.* 49: 84-95; 1957.
- 3) Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R.W.: Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem. J.* 220: 685-92; 1984.
- 4) Lalonde L., Jean Y., Roberts K.D., Chapdelaine A., and Bleau G.: Fluorimetry of selenium in serum or urine. *Clin. Chem.* 28: 172-74: 1982.
- 5) Koster J.F., Biemond P., and Swaak A.J.G.: Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumathoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 45: 44-46, 1986.

IV.



Az antioxidáns védekezőképesség retrospektív, biokémiai vizsgálata retinopathia praematurorumban

Papp Andrea dr., Németh Ilona dr.* és Pelle Zsuzsanna dr.

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szeged, Szemészeti Klinika (megbízott igazgató: Hammer Helga dr.)

*Gyermekklinika (igazgató: Pintér Sándor dr.)

A szabad oxigéngyök teória szerint retinopathia praematurorum akkor jön létre, ha a perinatális időszakban képződött szabad oxigéngyökök mennyisége túllépi az éretlen szervezet antioxidáns védekezőképességét. A szerzők a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Szemészeti Klinikáján 36, különböző életkorú és különböző súlyosságú retinopathia praematurorum miatt gondozott betegnél biokémiai vizsgálatokat végeztek antioxidáns védekezőképességük retrospektív megítélésére. Eredményeik szerint az akut oxidatív stressz csak a 3 hónapos retinopathiás betegeken volt közvetlenül kimutatható a vörösvértest glutathion redoxrendszerén, a betegség klinikai súlyosságától függetlenül. A 3 hónaposnál idősebb csecsemő- és gyermekbetegekben a glutathion redoxrendszer már kompenzált állapotú, sem az akut, sem a krónikus oxidatív stressz jeleit nem mutatja. *In vitro* létrehozott oxidatív stresszhatásra azonban minden betegcsoportban kimutatható volt a fokozott érzékenység, mely a redukált glutathion stabilitásának csökkenésében és hemoglobin oxidációs termékek arányának emelkedésében nyilvánult meg. Az antioxidáns védekezőképesség csökkenésének egyik feltételezett oka a glutathion peroxidase enzim csökkent működése, melyet az összes betegen mért alacsony vörösvérsejt-szelénszint bizonyított. Eredményeik arra utalnak, hogy a szabad oxigéngyökök iránti fokozott érzékenység retinopathia praematurorumos betegeken minden életkorban kimutatható, és a szelén alultápláltság hazánkban — mint a latens antioxidáns-hiány oka — a betegség kialakulását elősegítő egyik tényező lehet.

Kulcsszavak: szabad oxigéngyök, antioxidáns védekezés, retinopathia praematurorum, glutathion redox rendszer, szelén

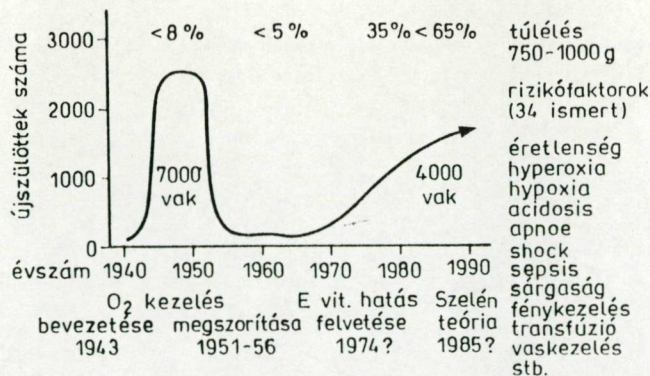
A retrospective, biochemical study on the antioxidant defense capacity of patients suffering from Retinopathy of Prematurity. Oxygen radical injury may be one of the factors leading to Retinopathy of Prematurity. It occurs when the body's natural antioxidant capacity is overwhelmed by the free oxygen radicals produced during the perinatal period. Supposing, that premature infants may have defects in their antioxidant systems which can be detected later, even in childhood, a retrospective study of 36 patients of different ages (born prematurely) suffering from different stages of Retinopathy of Prematurity was carried out. According to our results, the signs of an acute oxidative stress could only be seen in the 3 month-old patients' erythrocyte glutathione redox system which was independent of the clinical severity of retinopathy. However, following an *in vitro* oxidative stress an increased susceptibility of erythrocytes was found in all our patient groups, which means, that the ratio of residual and original amounts of reduced glutathione was decreased and the amount of oxidated derivatives of haemoglobin was increased. As selenium is an integral part of glutathione peroxidase enzyme, the very low selenium levels measured in all of our patient groups indicate a reduced glutathione peroxidase activity. The present study suggests, that selenium depletion even in Hungary might play an important role in the pathogenesis of Retinopathy of Prematurity.

Key words: free oxygen radicals, antioxidant capacity, retinopathy of prematurity, glutathione redox system, selenium

A koraszülöttek retinopathiája — a továbbiakban ROP, régebbi nevén retrolentális fibroplasia — az éretlen, még nem teljesen vascularizált retina oxidációs károsodásának következménye, mely érújdonképződéssel, hegesedéssel járhat és vaksághoz vezethet. A fejlett egészségügyi kultú-

rájú országokban még ma is a gyermekkori vakságok mintegy 40%-áért a ROP a felelős. Az irodalom egy második ROP-epidémiáról számol be az 1965–70-es évektől kezdődően (1. ábra). Az újabb esetek kialakulásáért azonban már nem az elhúzódó, korlátozás nélküli oxigénkezelés a felelős, így a betegség a továbbiakban nem tekinthető iatrogén eredetűnek, mely az ok kiküszöbölésével eliminálható lenne. Az első epidémiában döntő szerepet játszó oxigénkezelés kontrollálása a ROP-os esetek számának nagymértékű csökkenését okozta, de a betegséget végleg-

Rövidítések: ROP: retinopathia praematurorum; GSH: redukált glutathion; GSSG: oxidált glutathion; GSH-Px: glutathion peroxidase enzim; Se: szelén; AFH: acetilfenilhidrazin; SOD: szuperoxid diszmutáz enzim; Cat: catalase enzim



1. ábra: A ROP előfordulási gyakorisága és rizikófaktorai

sen megszüntetni nem sikerült. Az újabb esetek kialakulásában fontos szempont, hogy a Perinatális Intenzív Terápiás Centrumok működése nyomán nagymértékben megnöttek az éretlen, igen alacsony súlyú koraszülöttek túlélési esélyei (4, 10–12, 15, 21, 23, 27, 32, 38). A számos hajlamosító tényező (melyek közül legfontosabbak az éretlenség és az oxigénkezelés) ismerete ellenére a betegség oka, pathomechanizmusa még nem tisztázott (11, 12).

A szabad oxigéngyök teória szerint ROP akkor jön létre, ha a perinatális időszakban képződött szabad oxigéngyökök mennyisége túllépi az éretlen szervezet antioxidáns védekezőképességét (4, 7, 13, 21, 23, 33). Számos irodalmi adat mutat arra, hogy a ROP kialakulásában igen nagy biológiai különbségek vannak. Sem a koraszülött éretlensége (születési súly, gesztációs kor), sem az oxigénkezelés módja (CPAP, PEEP-lélegeztetés), illetve időtartama, sem pedig az eddig leírt 34 hajlamosító tényező (acidosis, apnoe, IRDS, sepsis, shock, hypoxia, hyperoxia, felnőttvértanszfúziók, a vasháztartás változása, korai vaskezelés, fénykezelés stb.) figyelembevételével sem jósolható meg a ROP létrejötte, illetve súlyossági foka (3, 11–13, 27, 28, 32). Ezért egyéni különbség tételezhető fel az oxigéngyökök iránti érzékenységekben, melyben öröklött antioxidáns enzimgyengeség, vitaminhiány (E, A, C) és/vagy nyomelemhiány (szelén, cink) egyaránt szerepet játszhatnak.

Jelen munkánk során célunk a klinikánkon ROP miatt gondozott csecsemő- és gyermekbetegek antioxidáns védekezőképességének retrospektív biokémiai vizsgálata volt. Kerestük azt a biokémiai eltérést, ami a ROP-os betegek oxidatív stressz iránti specifikus érzékenységre utal, és a betegségekre való fokozott hajlamot magyarázza. Megvizsgáltuk az aktív oxigéngyökök hatástalanításában döntő szerepet játszó vörösvértest glutathion redox rendszert, mivel az oxidált (GSSG) és redukált glutathion (GSH) pillanatnyi aránya az oxidatív stressz legérzékenyebb indikátora (25, 26). E rendszer oxidatív stresszhatásra bekövetkező kimerülése után a hemoglobin molekula védelme sem kielégítő, hemoglobin oxidációs termékek mutathatók ki (35). A glutathion peroxidase (GSH-Px) enzim működésére, mely a retina antioxidáns rendszerének leglényegesebb eleme (18, 24), a vörösvérsejt-szelénszintek mérésével indirekt módon tudunk következtetni (29, 30, 36).

1. táblázat: Betegeink megoszlása a ROP súlyossági foka és életkoruk szerint

ROP stádium	Életkor				6 év felett	Beteg-szám
	3 hó	3 hó–1 év	1–3 év	3–6 év		
IV–V.	—	7	7	4	3	21
II–III.	5	1	1	1	3	11
I–II.	2	2	—	—	—	4
Betegszám	7	10	7	5	6	Összesen 36

Beteganyag és vizsgálati módszerek

A Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Szemészeti Klinikáján 36, különböző súlyossági fokú ROP miatt gondozott csecsemő- és gyermekbetegetől 3 ml-nyi EDTÁ-val alvadásgátló vért vettünk, melyhez minden esetben szülői beleegyezést kértünk. A vizsgálatokat előzetes protokoll alapján végeztük, melyet az Egyetem Tudományetikai Bizottsága jóváhagyott.

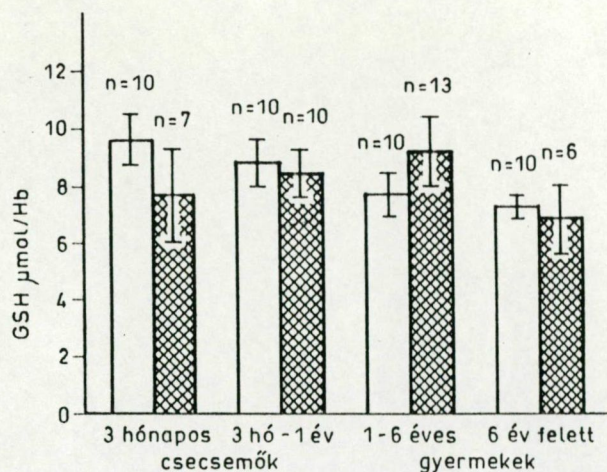
Betegeink életkor és ROP súlyossági fok szerinti megoszlása az 1. táblázatban látható. Átlagos születési súlyuk: 1222 ± 265 g, a gesztációs koruk: 29 ± 1 hét volt ($\bar{x} \pm S. D.$), a szélső értékek: 850–1640 g, ill. 24–31. hét voltak. A kontrollcsoportokat a Gyermekklinika kisebb sebészeti beavatkozásokon átesett, illetve a klinika koraszülött ambulanciáján rutin ellenőrzésre megjelent, egyébként egészséges gyermekek, illetve csecsemők alkották.

A GSH és GSSG együttes koncentrációját glutathionreduktáz és NADPH jelenlétében ciklikus enzimreakcióval mértük a dithio-bisnitro-benzoesav (DTNB) 412 nm-en történő színváltozása alapján spektrofotometriás eljárással, Tietze szerint (37). Az enzim jelenléte a módszer specifikusságát, ciklikus jellege pedig a megfelelő érzékenységet biztosította. A GSSG értékét a GSH N-etil-maleimiddel (NEM) történt alkilálása után külön határoztuk meg Akerboom és Sies szerint (1). A NEM eltávolítása Sephadex G–15 (Pharmacia) gélfiltrálással történt, Güntherberg és Rapaport módszerével (14). A GSH stabilitását Beutler eredeti eljárása (6) szerint mértük, a teljes vért 5 mg/ml acetilfenilhidrazin (AFH) és glukóz jelenlétében 37 °C mellett 1 óráig inkubáltuk. A hemoglobin oxidációs állapotának meghatározását Szebeni és mtsai eljárása (35) szerint, az előzetesen lefagyasztott hemolizátumok fényabszorpció spektrumának 560, 600, 630 és 700 nm-en történő leolvasása alapján végeztük el, az AFH-nal történő inkubálás előtt és után. A szelén (Se) meghatározása mosott vvt-hemolizátumból Lalonde és mtsai (22) módszere szerint történt. A minták Se-tartalmát roncsolás után 2,3 diamino-naphtalen (DAN, Sigma) kezeléssel piazoselenol komplex-szé alakítottuk, a fluoreszcenciát 360 nm gerjesztő és 520 nm emissziós hullámhossz alkalmazásával Hitachi gyártmányú spektrofluoriméteren mértük. Mind a GSH, GSSG, mind a Se-koncentrációt a vörösvértest hemoglobin-tartalmára átszámítva adtuk meg.

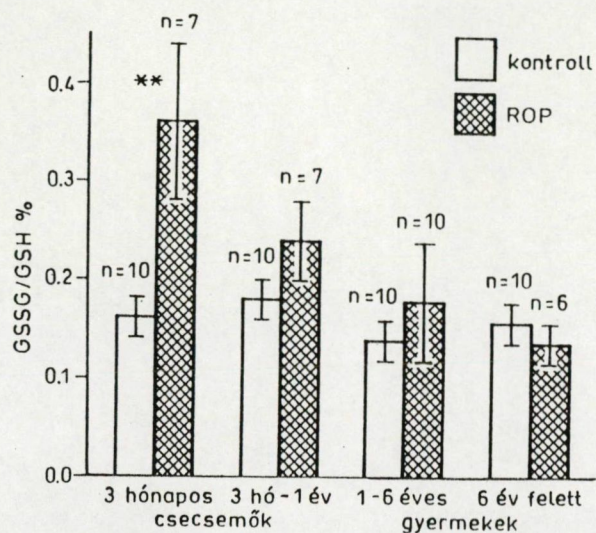
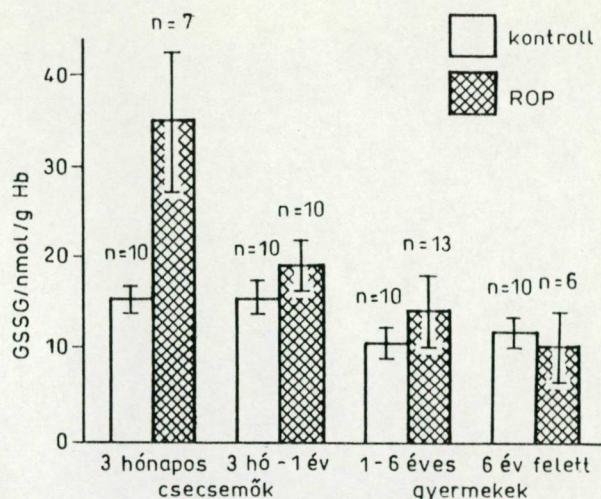
A statisztikai számítások Student-féle kétmintás 't' próbával történtek.

Eredmények

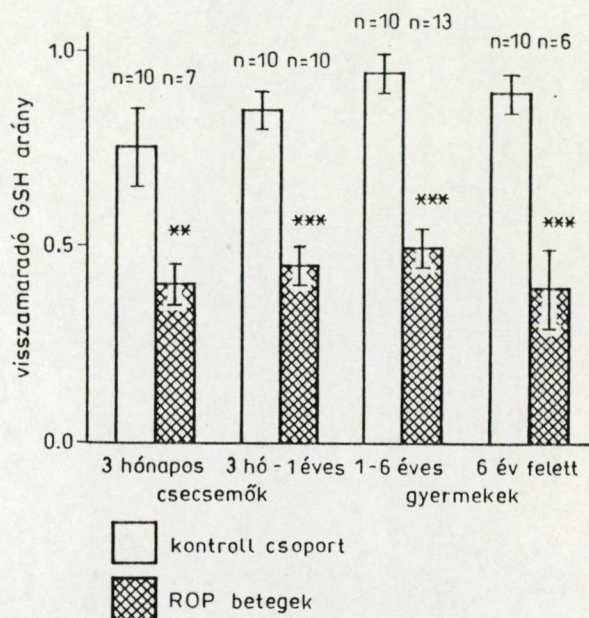
A 2. ábrán a GSH- és a GSSG-koncentrációkat, a 3. ábrán a glutathion redox arányt (GSSG/GSH) ábrázoltuk korcsoportonként. Míg a GSH-koncentrációkban a kontrollhoz képest a ROP-os betegekben jelentős eltérést nem láttunk, a GSSG-koncentráció, valamint a redoxarány a 3 hónapos korcsoportban kifejezetten emelkedett volt, nem-



2. ábra: Redukált (GSH) és oxidált koncentrációk különböző korcsoportú ROP-os betegeken a kontroll csoportokhoz viszonyítva ($\bar{x} \pm S. E.$). Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$



3. ábra: A glutathion redox arány különböző korcsoportú ROP-os betegeken kontroll csoportokhoz viszonyítva ($\bar{x} \pm S. E.$). Statisztikai szignifikancia: ** $p < 0,01$



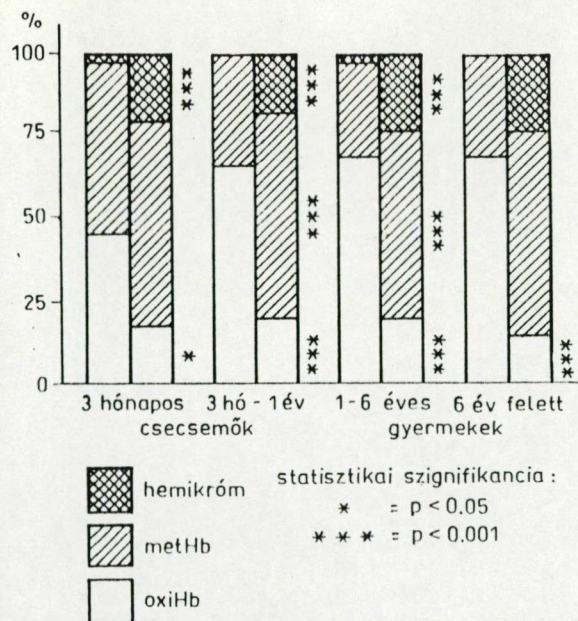
4. ábra: *In vitro* oxidatív stressz (acetilfenilhidrazin, 37 °C, 1 óra) hatása a GSH stabilitásra korcsopontonként ($\bar{x} \pm S. E.$). Statisztikai szignifikancia: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

csak a saját kontrollcsoporthoz, hanem a többi ROP-os csoporthoz képest is, mely egy folyamatban levő oxidatív stresszre utal.

A következő lépésben *in vitro* oxidatív stresszt hoztunk létre AFH jelenlétében történő inkubálással, melynek a GSH-stabilitásra gyakorolt hatását a 4. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a visszamaradó GSH aránya minden ROP-os korcsoportban jelentősen csökkent volt, mely e betegek fokozott érzékenységre, antioxidáns kapacitásuk csökkent voltára utal. A hemoglobin oxidációs állapotában, melyet az oxihemoglobin, methemoglobin és hemikróm százalékos arányával jellemeztünk, alaphelyzetben, — azaz az *in vitro* AFH-os terhelés előtt, a kontrollhoz képest egyik csoportban sem volt lényeges eltérés, ezért nem ábrázoltuk. Az *in vitro* létrehozott oxidatív stressz után azonban az 5. ábrán látható módon minden korcsoportban az

oxihemoglobin százalékos arányának csökkenésével ellentétesen megnő a hemoglobin oxidációs termékek (methemoglobin, hemikróm) aránya.

Az oxidatív stressz iránti fokozott érzékenység hátterében egyik tényezőként a glutathion peroxidase enzim (GSH-Px) csökkent működése tételezhető fel, mely enzim Se-dependens. A 6. ábrán ábrázoltuk korcsopontonként a vörösvértest Se átlagértékeit. Látható, hogy a Se vérszintje mind a négy betegcsoportban csökkent a kontrollhoz képest, legkifejezettebben a 3 hónapos és az 1–6 éves korúakban. A másik két csoportban ez az összefüggés csak tendenciaként érvényesül, nem éri el a statisztikai szignifikancia szintjét.



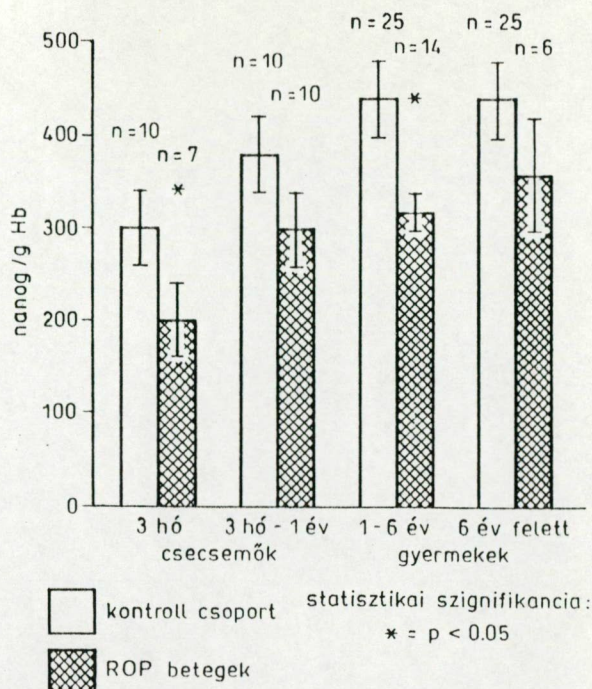
5. ábra: A hemoglobin oxidációs származékok aránya *in vitro* acetilfenilhidrazin kezelés után

Megbeszélés

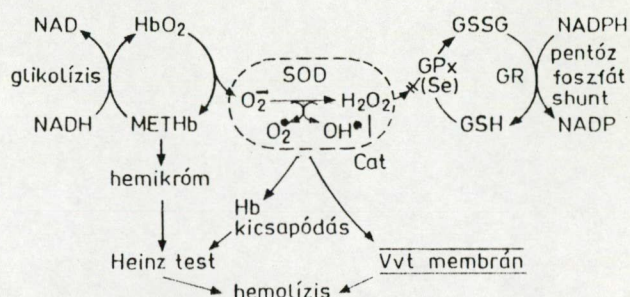
A vörösvérsejt (vvt) membránjának felépítése a retina és az agy sejtmembránjaihoz hasonló. Igen hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavakból épül fel, melyek lipidperoxidációra hajlamosak (5, 8, 9). Antioxidáns védőrendszereik is hasonlóságot mutatnak: a GSH—Px, a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a katalase (Cat) mind a retinában, mind a vvt-ben megtalálhatók (17–19, 24). Ezért látszott célszerűnek az oxidatív stressz iránti fokozott érzékenységet, illetve a betegségre való hajlamot jelző biokémiai paraméterek vvt-n történő vizsgálata. A 7. ábrán a vvt-ben fiziológiás körülmények között is állandóan termelődő aktív oxigéngyökök hatástalanításának legfontosabb biokémiai mechanizmusát mutatjuk be. A vvt legjelentősebb redox rendszere, a glutathion redox rendszer igen érzékeny, változásai az *in vivo* végbemenő oxidatív folyamatokat tükrözik. A GSSG koncentrációja és a glutathion redox arány, a GSSG/GSH moláris aránya a pillanatnyi oxidációs állapotra utal, így érzékeny indikátora elsősorban az akut oxidatív stressznek (25, 26).

Jelen munkánkban csak a 3 hónapos kiscsecsemők esetén észleltünk jelentős GSSG és redoxarány-emelkedést, mely az életkor előrehaladtával fokozatosan csökken, azaz a rendszer kompenzálttá válik. Tehát az akut oxidatív stressz csak az első három élethónapban mutatható ki a vvt glutathion redox rendszerén. Nagyobb csecsemő- és gyermekbetegek esetén a glutathion redox rendszer alapállapotban már kompenzált állapotú, sem az akut (GSSG-emelkedés), sem a krónikus oxidatív stressz jeleit (GSH-emelkedés) nem mutatja.

Az oxidatív stressz kísérletes körülmények között *in vitro* AFH-inkubálással imitálható (6). A vvt antioxidáns védekezőképessége annál labilisabb, minél jobban csökken az AFH-os inkubálás után visszamaradó GSH mennyisége.



6. ábra: Szelen koncentrációk teljes vérben ($\bar{x} \pm S. E.$).
 Statistikai szignifikancia: * $p < 0,05$



7. ábra: Aktív oxigéngyökök termelődése és hatástalanítása a vörösvérsejtben. A glutathion redox rendszer és a hemoglobin oxidációs állapotának összefüggése

A vvt-t erő oxidatív stressz során ugyanis a GSH egy része közvetlenül GSSG-vé oxidálódik, és a GSH—Px enzim is csak GSH jelenlétében képes antioxidáns hatását kifejteni. Így a GSH koncentrációjának kritikus szint alá csökkenése a membrán destrukciójához és a hemoglobin molekula károsodásához vezet (7. ábra). Úgy gondoljuk, hogy a ROP prevencióra Lakatos és mtsai (21) által alkalmazott D-penicillamin antioxidáns hatásának egyik lényeges komponense a vegyület ismert GSH-szint növelő hatása.

Az AFH-os inkubálás után visszamaradó GSH-mennyiség csökkenése minden ROP-os betegcsoportban jelentős, statisztikailag is erősen szignifikáns volt, tehát terhelésre a már kompenzált alapállapotú csecsemő- és gyermekbetegeken is kimutatható a fokozott érzékenység, mely az antioxidáns kapacitás későbbi életkorban is fennmaradó, provokációval kiváltható defektusos voltára utal. Ugyanezt mutatja a hemoglobin oxidációs termékek, a methemoglobin és hemikróm százalékos arányának jelentős emelkedése az AFH-terhelés után.

A Se-tartalmú GSH-Px enzim a SOD- és a Cat-enzimekkel együtt a sejt első védelmi vonalát képezi (7. ábra). A SOD a szuperoxid gyököt H_2O_2 -dá alakítja, s míg a Cat csak a H_2O_2 -vel képes reakcióba lépni, a GSH-Px-nak a fentiekén kívül még zsírsav-hidroperoxidok is szubsztrátjai, így védőhatása bizonyítottan effektívebb, mint a SOD-é vagy a Cat-é (29). A GSH-Px minden mólyi mennyisége 4 g Se-ot tartalmaz selenocystein formában. Állatkísérletben a vér Se-érték és a GSH-Px igen szoros korrelációját írták le, mely alapján a vér Se-értékből indirekt módon a GSH-Px aktivitásra lehet következtetni (30). Az irodalomban bizonyítást nyert az is, hogy alacsony Se-szint mellett a GSH-Px enzimaktivitási értékek nem informatívak, mert az enzimfehérje Se hiányában nem épül fel, tehát csak a teljesvér- vagy vvt Se-tartalom közvetlen mérése alkalmas az enzim működésének megítélésére (36). A vvt Se-szint jobban tükrözi a hosszabb ideig fennálló Se-hiányt, mint a szérumérték (mely a változásokra gyorsan reagál) (39), ezért választottuk és mértük ezt a biokémiai paramétert saját ROP-os betegeinknél. Eredményeink szerint a Se-szint minden ROP-os betegcsoportban alacsonyabb volt a korcsoportonkénti kontrollhoz képest. Mivel azonban egészséges kontrolljaink esetén is a vvt Se-szintje az azonos módszerrel mért amerikai és nyugat-európai populációs érték alsó határán van, lehetségesnek tartjuk, hogy a csökkent Se-bevitel, — mint a latens antioxidáns hiány oka — Magyarországon a ROP kialakulását elősegítő tényező lehet. Egészséges emberek csökkent Se-ellátottságát hazánkban nemrégiben közölték más szerzők, más módszerrel mért adataik alapján (34). Az anyai Se-hiányállapot alapját képezheti a koraszülött csökkent retinalis GSH-Px aktivitásának. Az enzim már 160 g feletti magzatok retina-sejtjeiben kimutatható, és antioxidáns aktivitása szinte az egyedüli védelem a 28. gesztációs hét előtt. Két munkacsoport egymástól függetlenül bizonyította ugyanis, hogy a 28. gesztációs hét előtt adott E-vitamin transzport fehérje hiányában nem tudja antioxidáns védő hatását kifejteni a fejlődő retinaerek prekursor-sejtjeire (spindle cells) (16, 18, 20, 24). Így éppen a legéretlenebb koraszülöttekben van a Se-ellátottságnak a legnagyobb jelentősége. Az E-vitamin védő hatása tehát gesztációs kortól függő, csak a 28. gesztációs hét után, a transzport fehérje jelenlétében képes védelmet biztosítani. A fentiek alapján felvetettük az irodalomban az anyának szülés előtt adandó antioxidáns kottét (E-vitamin + szelén) lehetőségét a ROP-prevencióra, figyelembe véve, hogy az E-vitaminra nézve 4 : 1-es, a szelénre nézve 3 : 2-es placentaris barrier áll fent (17, 20).

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy különböző klinikai stádiumú, bizonyítottan ROP-os, 3 hónaposnál idősebb csecsemő- és gyermekbetegek glutathion redox rendszere az életkor előrehaladtával fokozatosan kompenzálttá válik. A kompenzáltság mértéke a ROP szemészeti súlyosságától független, az életkorral viszont szoros összefüggést mutat. *In vitro* létrehozott oxidatív stressz hatására azonban ezen betegeknél is kimutatható volt a fokozott érzékenység, melyet a GSH-stabilitás csökkenése és a hemoglobin oxidációs termékek megjelenése jelzett. Az oxidatív stresszre megnyilvánuló fokozott érzékenység

hátterében a GSH-Px enzim csökkent aktivitását tételeztük fel, melyet alátámasztott a minden ROP-os betegcsoportban alacsonyabbnak mért Se-érték. A 3 hónapos ROP-os betegeink esetén kimutatható volt azonban — a ROP súlyosságától, szemészeti statusától függetlenül — egy, a szervezetet ért, akut oxidatív stresszhatás, amely a vvt-membrán fokozott érzékenységevel, a még nem megfelelő, éretlen vagy csökkent antioxidáns védekezőrendszerrel hozható összefüggésbe. Az e betegcsoportban kapott eredményeink alátámasztják azt a modern teóriát, miszerint a ROP az egyik szervi manifestációja lenne annak a komplex betegségnek, melyet a respiratoricus distress szindrómával, a bronchopulmonalis displasiával, a necrotizáló enterocolitissal és a ductus arteriosus Botalli persistenssel együtt az „újszülöttek oxigéngyök betegsége”-ként említi az irodalom (31, 33). Eddigi eredményeink alapján a továbbiakban a ROP szempontjából veszélyeztetett 3 hónap alatti korosztály prospektív, párhuzamos szemészeti és biokémiai vizsgálatát tervezzük, 4—6 hetes életkortól, az első ROP-szűréstől kiindulva, figyelembe véve a lehetséges preventív antioxidánsok, elsősorban az E-vitamin, és az egyéb okból kapott gyógyszereknek (pl. a vaskészletnek) a ROP kialakulására gyakorolt hatását. Az eddigi retrospektív, illetve a tervezett prospektív vizsgálatok jelentőségét, a téma aktualitását az mutatja, hogy a Lancet két, egymást követő évben (1991-ben, majd 1992-ben) az alábbiak szerint hívta fel a figyelmet a ROP-pal kapcsolatos legsürgősebb teendőkre (11, 12).

1. Nemzetközi epidemiológiai felmérést kell végezni az elfogadott klasszifikáció szerint, csak így lehet a nagyon alacsony súlyú koraszülöttek körében a ROP előfordulási gyakoriságát és a következmények súlyosságát összehasonlítani.

2. Folytatni kell a kutatást a ROP etiológiai faktorainak megismerésére, mert a túlzott oxigénkezelés az első epidemiában szerepet játszott, de az újabb ROP-esetekben kisebb jelentőségű.

3. Az E-vitamin profilaxis hatásának objektív lemérése, a cryoterápia hatásának elemzése még a jövő feladata.

4. A megelőzés szemléletének nemcsak a neonatológiában, hanem a szülész-nőgyógyászati gyakorlatban, sőt a közegészségügyi feladatokban, a populáció egészségi állapotának javításában meg kell nyilvánulni. Csak a koraszülések megelőzésével, a nagyon alacsony születési súly elkerülésével várható, hogy a modern, fejlett egészségügyi kultúrájú országokban a gyermekkori vakság kialakulásában egyik vezető szerepet játszó betegséget, a retinopathia praematurumot megelőzzük.

IRODALOM: 1. Akerboom, Th. P. M., Sies, H.: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, 1981, 77, 373. — 2. Bard, H. és misai: Retrolental fibroplasia and exchange transfusions. *Pediatr. Res.*, 1975, 9, 362. — 3. Becker, H., Lieser, K., Heller, K.: Einfluss und Zusammenhang verschiedener Risikofaktoren bei der Entstehung der Retinopathia praematurum. *Klin. Mbl. Augenheilk.*, 1990, 196, 456. — 4. Ben-Sira, I., Nissenkorn, I., Kremer, I.: Retinopathy of prematurity. *Surv. Ophthalmol.*, 1988, 33, 1. — 5. Berman, E. R.: Does vitamin E have a protective role in the retina as an antioxidant and free radical scavenger? In: Ben Ezra, D., Ryan, S., Glaser, B.: Ocular circu-

lation and neovascularization. Dordrecht, the Netherlands: Nijhoff, 1987, 163. old. — 6. Beutler, E.: The glutathione instability of drug-sensitive red cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 1957, 49, 84. — 7. Bossi, E. és mtsai: Retinopathy of prematurity: a risk factor analysis with univariate and multivariate statistics. *Helv. Paediatr. Acta*, 1984, 33, 307. — 8. Carlson, S. E. és mtsai: Effect of fish oil supplementation on the n-3 fatty acid content of red blood cell membranes in preterm infant. *Pediatr. Res.*, 1987, 21, 507. — 9. Crowley, J., Wags, P., Jones, P. W.: Human fetal RBS and plasma lipids. *J. Clin. Invest.*, 1965, 44, 989. — 10. Czappán, P., Véli, M.: A retrolentalis fibroplasia 20 év koraszülött betegein. *Orv. Hetil.*, 1984, 125, 2659. — 11. Editorial: Retinopathy of prematurity. *Lancet*, 1991, 337, 83. — 12. Editorial: Oxygen restriction and retinopathy of prematurity. *Lancet*, 1992, 339, 961. — 13. Gunn, T. R. és mtsai: Risk factors in retrolental fibroplasia. *Pediatrics*, 1980, 65, 1096. — 14. Güntherberg, H., Rappaport, S.: Eine Methode zur Bestimmung des oxydierten Glutathions. *Acta biol. med. germ.*, 1968, 20, 559. — 15. Hervei, S. és mtsai: A retrolentalis fibroplasia és az E-vitamin. *Orvosképzés*, 1984, 59, 435. — 16. Jonhson, L. és mtsai: Effect of sustained pharmacologic vitamin E levels on incidence and severity of retinopathy of prematurity: A controlled clinical trial. *J. Pediatr.*, 1989, 114, 827. — 17. Hittner, H. M., Kretzer, F. L.: Efficacy of vitamin E in retinopathy of prematurity. In: *Retinopathy of Prematurity, Current Concepts and Controversies*, Eds.: Mc. Pherson, A. R., Hittner, H. M., Kretzer, F. L., Decker Inc., Toronto, 1986. 89. old. — 18. Hittner, H. M., Kretzer, F. L., Lane, H. W.: Selenium dependent glutathione peroxidase in preterm human retinas. *Fed. Proc.*, 1987, 46, 566. — 19. Kretzer, F. L., Hittner, H. M.: Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development. *Arch. Dis. Childh.*, 1988, 63, 1151. — 20. Kretzer, F. L. és mtsai: Vitamin E protects against retinopathy of prematurity through action on spindle cells. *Nature*, 1984, 309, 793. — 21. Lakatos, L. és mtsai: A koraszülöttek retinopathiájának megelőzése D-penicillammal. *Orv. Hetil.*, 1985, 126, 1391. — 22. Lalonde, L. és mtsai: Fluorimetry of selenium in serum or urine. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 172. — 23. Lucey, J. L., Dagman, R.: A re-examination of the role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Pediatrics*, 1984, 73, 82. — 24. Naash, M. I., Nielsen, J. C., Anderson, R. E.: Regional distribution of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase in adult and premature human reti-

nas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1988, 29, 149. — 25. Németh, I., Boda, D.: Oxidized and reduced glutathione levels in blood samples from premature infants with RDS and critically ill children. In: *Oxygen Free Radicals and Tissue Injury*. Eds: Matkovich, B., Boda, D. and Kalász, H. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988. 269. old. — 26. Németh, I., Boda, D.: The ratio of oxidized/reduced glutathione as an index of oxidative stress in various experimental models of shock syndrome. *Biomed. Biochim. Acta*, 1989, 48, S 53. — 27. Országos Szemészeti Intézet 14. sz. módszertani levele: Retrolentalis fibroplasia. Budapest, 1984. — 28. Prendiville, A., Schulenburg, W. E.: Clinical factors associated with retinopathy of prematurity. *Arch. Dis. Child.*, 1988, 63, 522. — 29. Rea, H. M.: Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase activities of New Zealand residents and visitors to New Zealand. *Br. J. Nutr.*, 1979, 42, 201. — 30. Rotruck, J. T.: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973, 179, 588. — 31. Saugstad, O. D.: Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr. Scand.*, 1990, 79, 881. — 32. Shohat, M. és mtsai: Retinopathy of prematurity: incidence and risk factors. *Pediatrics*, 1983, 72, 159. — 33. Sullivan, J. L.: Iron, Plasma Antioxidants, and the 'Oxygen Radical Disease of Prematurity'. *Amer. J. Dis. Child.*, 1988, 142, 1341. — 34. Szabó G., Bálint Sz., Nyeste E.: Egészséges emberek hiányos nyomelem-ellátottsága a szérum és plazma multicemex analízise alapján. *Orvosi Hetil.*, 1991, 132, 395. — 35. Szebeni, J., Winterbourn, C. C.: Oxidative interactions between hemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem. J.*, 1984, 220, 685. — 36. Takahashi, K. és mtsai: Glutathione peroxidase protein. Absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. *J. Clin. Invest.*, 1986, 77, 1402. — 37. Tietze, F.: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 1969, 27, 502. — 38. Valentine, P. H. és mtsai: Increased survival of low birth weight infants: impact on the incidence of retinopathy of prematurity. *Pediatrics*, 1989, 84, 442. — 39. Zhu, L.: The antioxidative ability of erythrocyte of children with different selenium status. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 1986, 59, (Suppl. VII) 331.

(Papp Andrea dr., Szeged, Pf.: 407, 6701)

Kórházak és egyéb egészségügyi intézmények
felíratrendszerait
változtatható lehetőségekkel
különböző színekben
engedménnyel

plastform[®]

BETŰ- ÉS FORMATERVEZÉSI KFT.

1064 Budapest VI., Izabella u. 80.
Telefon: (36-1) 131-5347, 131-2114
Fax: (36-1) 131-5347

RITKA KÍNÁLAT:

ami az egészségügyi alapellátáshoz nélkülözhetetlen,
gyógyászati segédeszközök, orvosi műszerek széles választéka
a Gyógyászati Segédeszközök Gyára mintauzleteiben

1137 Budapest, Pozsonyi út 20. Tel.: 129-5442
9700 Szombathely, Szelestey u. 8-10. Tel.: 06 / 94 / 14-081
6701 Szeged, Zászló u. 4/a-4/b. Tel.: 06 / 62 / 312-569
4026 Debrecen, Mester u. 7. Tel.: 06 / 52 / 12-449

V.

Az antioxidáns védekezőképesség prospektív, biokémiai vizsgálata retinopathia praematurorumban

Papp Andrea dr., Németh Ilona dr.¹, Pelle Zsuzsanna dr. és Tekulics Péter dr.²

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szeged, Szemészeti Klinika (igazgató: Kolozsvári Lajos dr.),
Gyermekeklinika (igazgató: Pintér Sándor dr.)¹
Gyermekekórház (igazgató: Tekulics Péter dr.)²

A szerzők 60, retinopathia irányában első szűrővizsgálaton, 6 hetes életkorban megjelent, 2000 g alatti születési súlyú (átlag $\pm$ S. D.) (1529 ± 302 g), a perinatalis időszakban oxigénkezelt koraszülöttnél párhuzamos szemészeti és biokémiai vizsgálatokat végeztek. Az akut oxidatív stressz mind a 60 oxigénkezelt koraszülöttnél vörösvértest glutathion redoxrendszerén kimutatható volt szemészeti statusuktól függetlenül. Kontroll csoportként a perinatalis időszakban oxigénkezelésben nem részesült újszülöttek (1720 ± 305 g súlyú; $n = 20$) szolgáltak. Az antioxidáns védőrendszer két másik biokémiai paraméterében különbség mutatkozott a retinopathia jelenléte, súlyossága szerint. A szabad szulfhidril csoportok plazmakoncentrációja, valamint a teljes vér szelénszintje szignifikánsan alacsonyabb az első vizsgálat során retinopathiás koraszülöttekben ($n = 5$), mint a nem retinopathiás ($n = 27$), ill. a retina éretlenségi jeleit mutató ($n = 28$) betegcsoportokban. Az anyai vérminták eredményei koraszülöttjeik szemészeti statusa szerint csoportosítva ugyanezt az összefüggést mutatták. A retinopathia kifejlődésének megelőzése céljából E-vitamin-kezelésben részesült 12 koraszülött, akikben első vizsgálatnál a retina éretlenségi jeleit észlelték. Fél év után nemcsak szemészeti statusuk javult, hanem a biokémiai adatok is antioxidáns védőrendszereik fiziológiás állapotát tükrözték. Az anyák és koraszülöttek szabad szulfhidril- és szelénszintjeinek szoros összefüggése felhívja a figyelmet a terhesség alatti helyes táplálkozás fontosságára. A szerzők szerint a koraszülés szempontjából veszélyeztetett anyáknak (magasabb életkor, alultápláltság, dohányzás, toxemia) a szülés előtt szelént és E-vitamint tartalmazó ún. antioxidáns koktéllal adásával a retinopathia praematurorumos esetek száma csökkenthető lenne.

Kulcsszavak: retinopathia praematurorum, glutathion redoxrendszer, szabad szulfhidril, szelén, E-vitamin

A prospective, biochemical study on the antioxidant defense capacity of premature infants suffering from retinopathy. The study was carried out on 60 oxygen-treated premature infants weighed less than 2000 g (1529 ± 302 g, $\bar{x} \pm$ S. D.) and on their mothers. Both the Retinopathy of Prematurity screening and the biochemical tests were started at the age of 6 weeks. According to our results, the signs of an acute oxidative stress could be seen in all 60 oxygen-treated premature infants' erythrocyte's glutathione redox system, independently of the presence of the retinopathy compared to premature infants ($n = 20$) with the same gestational age but without oxygen therapy (1720 ± 305 g, $\bar{x} \pm$ S. D.). The concentrations of free sulfhydryl groups in the plasma, and the blood selenium levels were significantly lower in the premature infants suffering from moderate retinopathy ($n = 5$) than in the other oxygen-treated premature infants without retinopathy ($n = 27$) and with "any retinopathy" ($n = 28$) patient groups. The same tendency was seen in the mothers. Vitamin E treatment of "any retinopathy" infants seemed to have a positive effect against the development of Retinopathy of Prematurity. The close correlation found between the antioxidant capacity of the mothers and babies suggest that the supplementation of feeding with sulfur-containing amino acids (methionin, cystein) during pregnancy would improve the antioxidant capacity of premature infants. An antioxidant cocktail (selenium+vitamin E) given to the high-risk mothers (advanced age, smoking, pregnancy-induced hypertension) before delivery as suggested in literature might be useful in prevention of Retinopathy of Prematurity.

Key words: retinopathy of prematurity, glutathione redox system, free sulfhydryl groups, selenium, vitamin E

A koraszülöttek retinopathiája (továbbiakban ROP) – régebbi nevén fibroplasia retrolentalis – multifaktoriális betegség, amely a legérettebb és legbetegebb koraszülötteket veszélyezteti.

A betegség lényege, hogy a koraszülött éretlen, nem teljesen érezett retináját oxidációs károsodás éri, amelynek következtében érújdonképződés, súlyos esetben hegesedés, ideghártyaleválás alakul ki, s ez vaksághoz vezethet. Témaválasztásunk aktualitását az adja, hogy napjainkban a ROP-os esetek száma – főleg a fejlett egészségügyi kultúrájú országokban – ismét emelkedő tendenciát mutat. Ennek egyik valószínű

Rövidítések: ROP = retinopathia praematurorum; GSH = redukált glutathion; GSSG = oxidált glutathion; GSP-Px = glutathion peroxidáz enzim; -SH = szabad szulfhidril, Se = szelén

oka, hogy a korszerű terhesgondozás következtében egyre több olyan éretlen, alacsony születési súlyú magzatot sikerül megtartani, akiket korábban elvetéltek. A Perinatalis Intenzív Terápiás Centrumok működése nyomán pedig nagymértékben megjavultak ezen éretlen, alacsony születési súlyú koraszülöttek túlélési esélyei (5, 9, 11, 12, 17, 24, 26, 30, 41, 46). Így ez az ún. második ROP epidémia egy jóval éretlenebb populációt érint. Ezen újabb esetek kialakulásában tehát nem az elhúzóódó, korlátozás nélküli oxigénkezelés (I. első ROP epidémia) a fő momentum. Így a betegség a továbbiakban már nem tekinthető iatrogén eredetűnek, mely az ok kiküszöbölésével eliminálható lenne (26).

Számos irodalmi adat utal arra is, hogy a ROP kialakulásában igen nagy biológiai különbségek vannak. Sem a koraszülött éretlensége (születési súly, gesztációs kor), sem az oxigénkezelés módja (burás, ill. inkubátortérben történő oxigénkezelés), illetve időtartama, sem az eddig leírt mintegy 40 hajlamosító tényező (acidosis, apnoe, respiratoricus distressz-szindróma, sepsis, shock, hypoxia, hyperoxia, hypercapnia, felnőttvér-transzfúziók, a vasháztartás változása, korai vaskezelés, fénykezelés stb.) figyelembevételével sem jósolható meg a ROP létrejötte, illetve súlyossági foka (4, 11, 12, 15, 30, 31, 36). Ezért egyéni különbség tételezhető fel az oxigénigények iránti érzékenységekben, amelyben öröklött enzimgyengeség, vitaminhiány (E, A, C) és/vagy nyomelemhiány (szelén, cink) egyaránt szerepet játszhatnak. Újabb az is felvetődött, hogy a ROP genetikai betegség lenne, melynek kialakulása már az intrauterin életben megkezdődik (13).

Megfigyelték azt is, hogy a ROP kialakulásában földrajzi különbségek is vannak. Az adott terület környezeti tényezői, a levegő szennyezettsége, a talaj nyomelemtartalma, az anyai táplálkozás, vitamin- és nyomelem-ellátottság a koraszülött antioxidáns védekezőképességét nagymértékben befolyásolja (10, 33, 34, 37).

Előzetes vizsgálatainkban az antioxidáns védekezőképesség csökkent kapacitása *in vitro* oxidatív stresszre a ROP utókövetkezményei miatt rendszeres szemészeti gondozásban részesülő betegeinken: különböző életkorú gyermekek, csecsemők esetén is kimutatható volt az azonos korú kontroll betegek értékeihez képest. Az akut oxidatív stresszhatás jelenlétét a vörösvérsejt glutathion redox-rendszerén azonban csak a legfiatalabb korcsoportban, a három hónap alattiakban lehetett bizonyítani (31, 32). Ezen munkánk során célunk e ROP szempontjából veszélyeztetett korcsoport prospektív, párhuzamos szemészeti és biokémiai vizsgálata volt. Arra kerestünk választ, hogy az élet első 6 hetében a koraszülöttek antioxidáns védekezésében fontos paraméterek: az aminosav- és fehérjeellátottságot tükröző szabad szulfhidril plazmakoncentrációja, valamint az egyik legfontosabb antioxidáns hatású nyomelem, a szelén vérszintje hiányállapotot jeleznek-e, illetve mennyiben tükrözik az anyai szervezet hasonló viszonyait.

Beteganyag és vizsgálati módszerek

A Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Szemészeti Klinikáján első ROP szűrően 6 hetes életkorban ($6,2 \pm 1,2$ hét, $\bar{x} \pm S. D.$) megjelent 60, ROP szempontjából veszélyeztetett, azaz 2000 g alatti születési súlyú, a perinatalis időszakban 24 órát

meghaladó időtartalomban 60% feletti oxigénkezelésben részesült koraszülöttektől előzetes szülői beleegyezés után 1,5 ml-nyi EDTA-val alvadásgátlólt vért vettünk. Negyvennégy esetben az édesanyaktól is megtörtént a vérvétel. Vizsgálatainkat előzetes protokoll alapján végeztük, amelyet a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Tudományetikai Bizottsága jóvá hagyott.

Betegeink gesztációs kora, születési súlya és ROP súlyossági fok szerinti megoszlása az 1. táblázatban látható. A betegek átlagos születési súlya: 1529 ± 302 g (a szélső értékek: 980–1840 g), gesztációs kora: $32,8 \pm 3,1$ hét ($\bar{x} \pm S. D.$), 26–35. hét szélső értékek. Kontroll csoportként 20 gesztációs kor és születési súly szerint hasonló, de oxigénkezelésben nem részesült újszülött szolgált. Születési súly: 1720 ± 305 g, gesztációs koruk: $36,2 \pm 3,1$ hét ($\bar{x} \pm S. D.$). A kontroll csoportban ROP nem fordult elő.

Betegeinket szemészeti statusuk alapján 3 csoportba soroltuk (1. táblázat):

1. táblázat: Előzetesen oxigénkezelt koraszülöttek jellemzői ($n = 60$; $\bar{x} \pm S. D.$)

	Betegszám	Gesztációs kor (hét)	Születési súly (g)
ROP kizárható	27	$33,7 \pm 2,5$	1707 ± 306
ROP gyanújelek	28	$32,3 \pm 3,2$	1418 ± 273
ROP I–III.	5	$28,9 \pm 3,0^*$	$1310 \pm 330^*$

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

1. A ROP már az első vizsgálattal kizárható. Szemészeti tünetmentesek.

Jellemzők: – a pupillák jól tágíthatóak,

– a töröközegek tiszták

– a szemfenék az életkornak megfelelő: jó színű papilla, normális érelszállítás, a retina periferiáján az ereződés már kialakult.

2. A ROP-ot az első vizsgálattal nem tudtuk kizárni. Szemészeti tünetek: éretlenségi jelek.

Jellemzők: – a töröközegek még borúsak, tunica vasculosa

lentis és üvegtesti borúság állhat fenn,

– a szemfenéken: még halvány papilla és a retina periferiája szintén halvány, még kevésbé érzett.

3. Már az első vizsgálatkor észlelhető a ROP.

Klinikai súlyosság: ROP-I., ROP-II., ill. ROP-III.

Szemészeti tünetek:

– a pupillák nehezen vagy egyáltalán nem tágíthatóak,

– a töröközegek borúsak,

– a szemfenéken: halvány, néha ún. elhúzott („dragged”) papilla, a vénák igen teltek, kanyargósak, ill. ún. atypikus érelszállítások észlelhetők, a retina periferiája halvány, szürkésfehér, még érmentes, a vascularisált és avascularis retinális határan demarkációs vonal, illetve a súlyosabb esetben sánc jön létre.

A táblázat adataiból az is kiténik, hogy a ROP-os csoport gesztációs kora és születési súlya a másik két csoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt. Ezek önmagukban is ROP-ra hajlamosító tényezők.

Szemészeti szempontból a retina éretlenségi jeleit mutató, még nem ROP-os 12 beteg esetén prevenció céljából E-vitamin-kezelést kezdtünk. A Kőbányai Gyógyszerárugár által forgalmazott „Vitamin E” olajos injekcióból (30 mg/ml) naponta 0,5 ml-t adtunk szájon át. Havonkénti, esetenként hetenkénti szemészeti ellenőrzés és rendszeres E-vitamin vérszintmérés mellett fél éves korban megismételtük a biokémiai vizsgálatokat.

A GSH és GSSG együttes koncentrációját glutathion redukáz és NADPH jelenlétében ciklikus enzimreakcióval mértük a ditio-bisnitro-benzoesav (DTNB) 412 nm-en történő színváltozása alapján spektrofotometriás eljárással, Tietze szerint (45). Az enzim jelenléte a módszer specifikusságát, ciklikus jellege pedig a megfelelő érzékenységet biztosította. A GSSG értékét a GSH N-etil-maleimiddel (NEM) történt alkálalása után külön határoztuk meg Akerboom és Sies szerint (2). A

NEM eltávolítása Sephadex G-15 (Pharmacia) gélfiltrálással történt, Güntherberg és Rapaport módszerével (16).

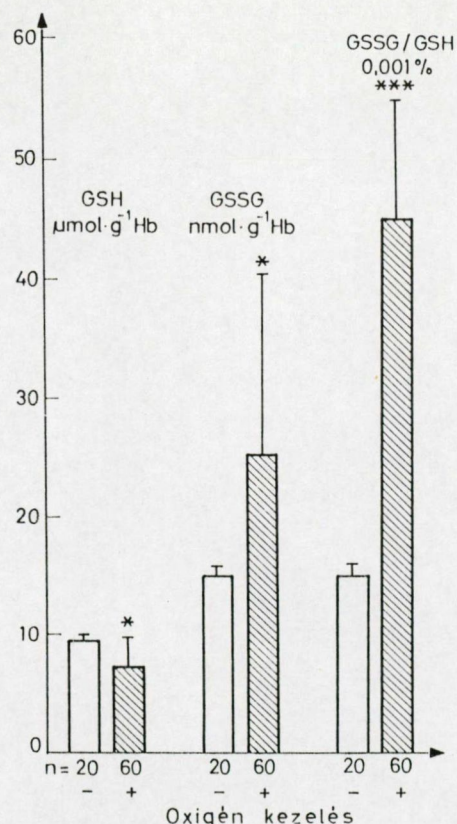
A plazma szabad szulhidril koncentrációját spektrofotometriás eljárással, Ellmann-reagens 412 nm-en bekövetkező színváltozása alapján Koster és mtsai eljárásával (21) mértük.

A szelén (Se) meghatározása mosott vörösvérsejt hemolizátumból Lalonde és mtsai (25) módszere szerint történt. A minták Se-tartalmát roncsolás után 2,3 diamino-naftalen (DAN, SIGMA) kezeléssel piazo-selenol komplexszé alakítottuk, a fluoreszcenciát 360 nm gerjesztő és 520 nm emissziós hullámhossz alkalmazásával Hitachi gyártmányú spektrofotométeren mértük. Mind a GSH-, GSSG-, mind a Se-koncentrációt a vörösvértest hemoglobintartalmára átszámítva adtuk meg.

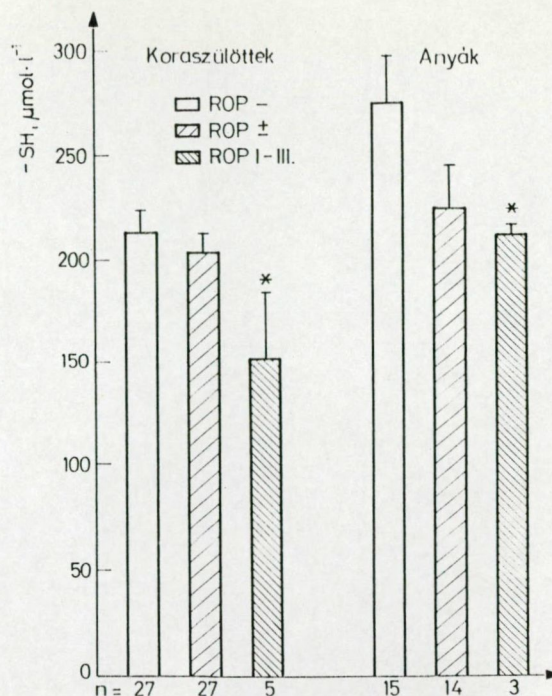
Az eredmények értékelésében az átlag±standard deviációval jellemzett mintákból a statisztikai szignifikancia számítását kétmintás Student 't' próbával, illetve a szórások különböző értékei esetén Welch-próbával végeztük.

Eredmények

Az 1. ábrán a 60, ROP szempontjából veszélyeztetett beteg redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutathion koncentrációit, valamint az akut oxidatív stressz legérzékenyebb indikátorát, az ún. redox arányt (GSSG/GSH) ábrázoltuk kontroll koraszülöttek értékeihez viszonyítva. Látható, hogy a GSH kismértékű csökkenése mellett a GSSG emelkedett, arányuk pedig kifejezetten emelkedett, akut oxidatív stresszre utalva (28, 29).



1. ábra: A redukált (GSH) és oxidált glutathion (GSSG) koncentrációk és arányuk oxigénkezelte koraszülöttekben a kontroll csoporthoz viszonyítva ($\bar{x} \pm \text{S. D.}$)
Statisztikai szignifikancia: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ vs oxigénkezelés nélkül



2. ábra: A plazma szabad szulhidril koncentrációk koraszülöttekben és anyákban ($\bar{x} \pm \text{S. D.}$)
Betegcsoportok: ROP- = ROP kizárható; ROP± = első vizsgálattal ROP nem zárható ki; ROP+ = ROP I-III.
Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$ vs ROP-

A továbbiakban betegeink biokémiai adatait a ROP jelenléte szempontjából létrehozott csoportokra bontva elemeztük. A 2. ábrán a plazma aminosav- és fehérje-el látottságát legjobban tükröző szabad szulhidril (-SH) csoportok számát ábrázoltuk mind a koraszülöttek, mind az anyák esetén. Látható, hogy a szabad -SH csoportok száma a biztosan nem ROP-os (ROP-) és az éretlenségi jeleket mutató (ROP±) csoportokban gyakorlatilag azonos mind az újszülöttek, mind az anyák esetén. A ROP-os (ROP+) betegek -SH csoport értékei azonban az előzőkhöz képest alacsonyabbak. Ugyanezt a tendenciát mutatják az anyák értékei is.

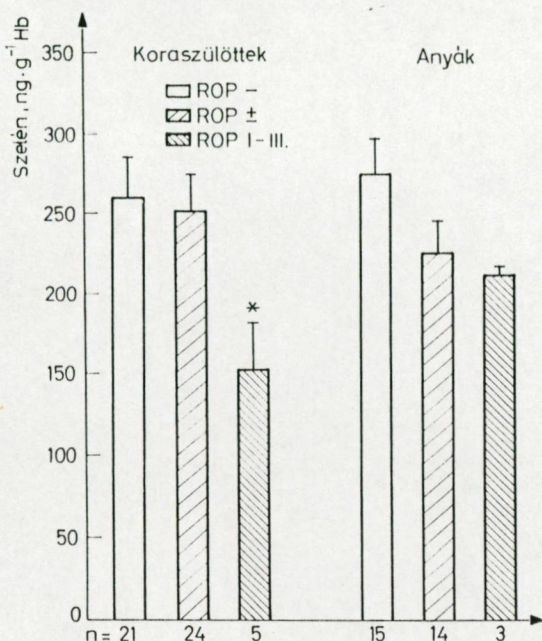
A 3. ábra a teljes vér szelénszinteket mutatja. Míg a nem ROP-os és a retina éretlenségi jeleit mutató csoportban a szelénértékek nagyjából megegyezők, addig a ROP-os betegek szelénszintjei kifejezetten csökkentek. Ugyanezt a tendenciát mutatják az anyák esetén mért értékek is.

A retina éretlenségi jeleit mutató betegeken E-vitamin-kezelés után mind az -SH csoportok száma, mind a szelénium koncentrációja emelkedett (4. ábra).

Megbeszélés

A ma elfogadott szabad oxigéngyök teória szerint ROP akkor jön létre, ha a perinatalis időszakban képződött szabad oxigéngyökök mennyisége túllépi az éretlen szervezet antioxidáns védekezőképességét (5, 8, 15, 24, 26,

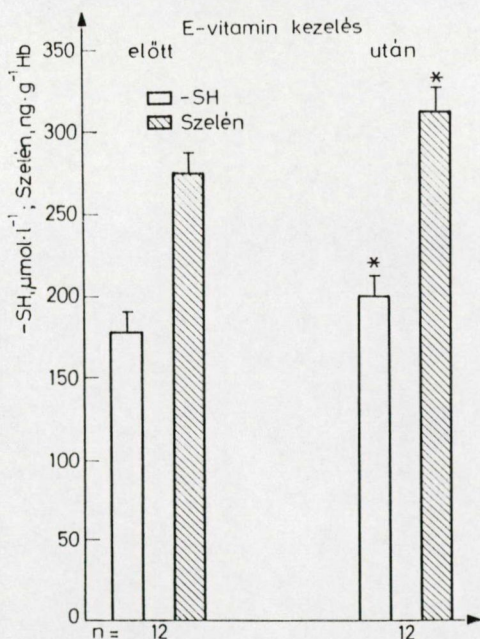
31–34, 42). A szervezetben élettani körülmények között is állandóan keletkeznek szabad oxigéngyökök, de oxidatív behatásra, mint a perinatológiában alkalmazott oxigénkezelés, fénykezelés, felnőttvér-transzfúziók, korai vaskezelés, számuk jelentősen megnő (3, 13, 14, 33, 39, 42).



3. ábra: A teljes vér szelénkoncentrációk koraszülöttekben és anyákban ($\bar{x} \pm S. D.$)

Betegcsoportok: ROP-: ROP kizárható; ROP ±: első vizsgálattal ROP nem zárható ki; ROP+: ROP I–III.

Statisztikai szignifikancia: * = $p < 0,05$ vs ROP-



4. ábra: A plazma szabad szulfhidril- és a teljes vér szelénkoncentrációk változása a retina éretlenségi jeleit mutató betegek E-vitamin-kezelése során ($\bar{x} \pm S. D.$)

Statisztikai szignifikancia: * = $p < 0,05$ vs E-vitamin-kezelés előtt

Az oxidatív károsodástól a vörösvértest (vvt) és a plazma antioxidáns rendszerei védik a szervezetet. Közülük a legfontosabb a vörösvérsejt glutathion redox rendszere, amely igen érzékeny. Változásai az *in vivo* végbenő oxidatív folyamatokat tükrözik. Az összetevők moláris aránya, az ún. redoxarány: GSSG/GSH, az akut oxidatív stressz legérzékenyebb *in vivo* indikátora (28, 29). Oxidatív behatásra a redukált glutathion (GSH) oxidált glutathionná (GSSG-vé) alakult a szeléndependens glutathion-peroxidáz (GSH-Px) enzim segítségével. Ez a magyarázata annak, hogy a szelénszintek méréséből indirekt módon a GSH-Px enzim működésére tudunk következtetni (31–33, 37, 38, 44, 47).

A GSH-Px enzim az intrauterin életben igen korán kimutatható, a 160 g feletti fejlődő magzatok retinájában már megjelenik, működéséhez azonban szelénre van szükség (19, 27). Az általunk tapasztalt anyai szelénhiány alapot teremthet a koraszülött csökkenő retinalis GSH-Px aktivitásához. Ez azért is fontos, mert bizonyított, hogy a 28. gesztációs hét előtt adott E-vitamin transzportfehérje hiányában nem tudja kifejteni védő hatását a fejlődő retinalis erek prekursor sejtjeire („spindle cells”) (19, 20, 22, 23, 27, 31). Így éppen a legérzékenyebb koraszülöttekben lehet jelentősége a szelénellátottságnak, hiszen a 28. gesztációs hét előtt az antioxidáns védelem egyetlen lehetősége a transzportfehérjét nem igénylő, vízdoldékony szelén. Vizsgálatainkban a szelénszintet a ROP-os koraszülöttek esetén az anyai értékkel párhuzamosan igen alacsonynak találtuk.

Hazai szerzők korábban beszámoltak az egészséges magyar populáció csökkent szelénellátottságáról (8, 43). Az irodalomból ismert az is, hogy a szelénre nézve 3:2-es placenáris barrier áll fenn. A fentiek alapján felvetődik, hogy Magyarországon a csökkent szelénbevitel vagy a környezetszennyezés miatti csökkent szelénfelszívódás – mint a latens antioxidáns-hiány egyik oka – a ROP kialakulását elősegítő tényező lehet. Így véleményünk szerint az irodalomban felvetett, ROP prevenció céljából szülés előtt a veszélyeztetett anyáknak adandó „antioxidáns koktél” (Se+E-vitamin) klinikai kipróbálása hazánkban is hasznos lenne (18, 23).

A szervezet antioxidáns védelmi rendszerei aktivitását a glutathion redox-rendszer mellett a vérplazma szabad szulfhidril (-SH) koncentrációjával jellemezhetjük. Az -SH csoportok legfőképp kéntartalmú aminosavakból, pl. methioninból, cysteinéből stb. adódnak. Vizsgálatainkban mind a ROP-os betegek, mind az anyák esetén a szabad szulfhidrilcsoportok számát igen alacsonynak találtuk. E tény kiemeli az anyai táplálkozás, főleg a megfelelő fehérjeellátottság alapvető fontosságát az újszülött antioxidáns védekezőképességének javításában.

A veszélyeztetett koraszülöttek ROP prevenció céljából történő E-vitamin-kezelésének eredményességéről ellentmondó irodalmi adatok vannak (17, 18, 20, 23, 35). Ennek oka, hogy a kezdeti időszakban az E-vitamint nagy dózisban, intravénásan adták, ezáltal hirtelen alakult ki a magas, 5 mg/dl feletti vérszint. Ekkor jöttek létre az ismert súlyos, toxikus mellékhatások, mint a sepsis, nekrotizáló enterocolitis, agyvérzés és retinális vérzések (20, 35). Hittner és munkatársai állatkísérletekből levont következtetései alapján a retinális E-vitamin-felvétel szempontjából a per os adagolás az optimális, melynek lényege, hogy lassan, fokozatosan kell a kívánt vérszintet elérni (18). E vérszint az American Academy of Pediatrics 1992-ben kiadott javaslata szerint: 0,5–2 mg/dl. Állásfoglalásuk szerint az E-vitamin az első életnaptól addig adandó, amíg az erek elérik a temporális retinafélét az ora serrata retinát (1).

Korábban megjelent közleményünkben már beszámoltunk arról, hogy az E-vitamin plazmakoncentrációja a ROP szempontjából veszélyeztetett koraszülöttekben a

fiziológias tartomány alsó határát nem érte el, és tükröz-
te az anyai szervezet – szintén csökkent – értékeit (34).
Felvetettük azt is, hogy az anyák terhesség alatti E-vita-
min kezelésével nemcsak az E-vitamin-szintet, hanem az
ismert szinergizmus alapján az újszülöttek szelénszintjét
is emelni lehetne (34). Természetesen ehhez a vérszintek
egyidejű mérése szükséges. Az E-vitamin szelénigényl
csökkentő hatása az irodalomból ismert, ez a magyaráza-
ta annak, hogy csupán az E-vitamin-terápia hatására is
emelkedett a teljesvér-szelénszint, és ezzel párhuzamo-
san javult a szemészeti status (38).

Az előzetesen oxigénkezelt, ROP szempontjából veszé-
lyeztetett koraszülöttek prospektív vizsgálata ismét felhívja
a figyelmet a prevenció fontosságára. A Lancet két, egymást
követő évben szerkesztőségi közleményekben hangsúlyoz-
ta, hogy a ROP megelőzés feladatai a neonatológiától a
szülészeti-nőgyógyászat irányába tolódtak el (11, 12).
Napjainkban azonban már népegészségügyi problémákkal
is felvet, miszerint csak a teljes magyar populáció egészségi
állapotának, táplálkozási szokásainak, fehérje-, vitamin- és
nyomelem-ellátottságának javításától várható, hogy a
gyermekkori vakság egyik fő okát, a retinopathia prae-
maturorumot is megelőzzük.

IRODALOM: 1. American Academy of Pediatrics Committee on
Nutrition. Pediatrics in Review, 1993, 14, 128–132. – 2.
Akerboom, T. P. M., Sies, H.: Assay of glutathione, glutathione
disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological sam-
ples. Methods Enzymol., 1981, 77, 373–383. – 3. Bard H., Cornet,
A., Orquin, J. és mtsai: Retrolentalis fibroplasia and exchange
transfusions. Pediatr. Res., 1975, 9, 362–366. – 4. Becker, H.,
Lieser, K., Heller, K.: Einfluss und Zusammenhang verschiede-
ner Risikofaktoren bei der Entstehung der Retinopathia prae-
maturorum. Klin. Mbl. Augenheilk., 1990, 196, 456–460. – 5.
Ben-Sira, I., Nissenkorn, I., Kremer, I.: Retinopathy of prematu-
rity. Surv. Ophthalmol., 1988, 33, 1–6. – 6. Berman, E. R.: Does
vitamin E have a protective role in the retina as an anti-oxidant
and free radical scavenger? In: Ben Ezra, D., Ryan, S., Glaser, B.:
Ocular circulation and neovascularization. Dordrecht, the
Netherlands: Nijhoff, 1987, 163–168. old. – 7. Biglan, A., Brown,
D., Reynolds, J. és mtsai: Risk factors associated with retrolental
fibroplasia. Ophthalmology, 1984, 91, 1504–1508. – 8. Bogy G.
Fehér J., Alfthan G. és mtsai: Egészséges emberek szelénstatusa-
nak komplex vizsgálata. Orv. Hetil., 1993, 47, 2585–2588. – 9.
Czappán P., Véli M.: A retrolentalis fibroplasia 20 év koraszülött
betegcso. Orv. Hetil., 1984, 125, 2659–2663. – 10. Darlow, B.:
Incidence of retinopathy of prematurity in New Zealand. Arch.
Dis. Child., 1988, 63, 1083–1086. – 11. Editorial: Retinopathy of
prematurity. Lancet, 1991, 337, 83–84. – 12. Editorial: Oxygen
restriction and retinopathy of prematurity. Lancet, 1992, 339,
961–963. – 13. Flynn, J. T.: The premature retina: A model for the
in vivo study of molecular genetics. Eye, 1992, 6, 161–164. – 14.
Glass, P., Avery, G. B., Subramanian, K. S.: Effect of bright light in
the hospital nursery on the incidence of retinopathy of prema-
turity. N. Engl. J. Med., 1985, 313, 401–406. – 15. Gunn, T. R.: Risk
factors in retrolental fibroplasia. Pediatrics, 1980, 65,
1096–1100. – 16. Güntherberg, H., Rapaport, S.: Eine Methode
zur Bestimmung des oxydierten Glutathions. Acta biol. med.
germ., 1968, 20, 559–565. – 17. Hervei S., Bors Zs., Ugrai M. és mtsai:
A retrolentalis fibroplasia megelőzése vízdoldékony E-vita-
minnal. Orv. Hetil., 1983, 123, 811–812. – 18. Hittner, H. M.,
Kretzer, F. L.: Efficacy of vitamin E in retinopathy of prematu-
rity. In: Retinopathy of Prematurity, Current Concepts and
Controversies, Eds.: McPherson, A. R., Hittner, H. M., Kretzer, F.
L.: Decker Inc., Toronto, 1986, 89–94. old. – 19. Hittner, H. M.,
Kretzer, F. L., Lane, H. W.: Selenium dependent glutathione per-
oxidase in preterm human retinas. Fed. Proc., 1987, 46, 566–568.
– 20. Johnson, L., Quinn, G. E., Abbasis, S. és mtsai: Effect of sus-
tained pharmacologic vitamin E levels on incidence and severity
of retinopathy of prematurity: A controlled clinical trial. J.
Pediatr., 1989, 114, 827–838. – 21. Koster, J. F., Biemond, P.,

Swaak, A. J. G.: Intracellular and extracellular sulphhydryl levels
in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis., 1986, 45, 44–46. – 22.
Kretzer, F. L., Hittner, H. M.: Retinopathy of prematurity: clinical
implications of retinal development. Arch. Dis. Childhood,
1988, 63, 1151–1156. – 23. Kretzer, F. L., Metha, R. S., Johnson, A.
T. és mtsai: Vitamin E protects against retinopathy of prematu-
rity through action on spindle cells. Nature, 1984, 309, 793–795.
– 24. Lakatos L., Hatvani L., Oroszlán Gy. és mtsai: A koraszülöt-
tek retinopathiájának megelőzése D-penicillamminal. Orv.
Hetil., 1985, 126, 1391–1396. – 25. Lalonde K.: Fluorimetry of se-
lenium in serum or urine. Clin. Chem., 1982, 28, 172–176. – 26.
Lucey, J. L., Dagman, R.: A re-examination of role of oxygen in
retrolental fibroplasia. Pediatrics, 1984, 73, 82–86. – 27. Naash,
M. I., Nielsen, J. C., Anderson, R. E.: Regional distribution of glu-
tathione peroxidase and glutathione-S-transferase in adult and
premature human retinas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1988,
29, 149–152. – 28. Németh, L., Boda, D.: Blood glutathione redox
ratio as a parameter of oxidative stress in premature infants
with IRDS: Free Rad. Biol. Med., 1994, 16, 347–352. – 29.
Németh, L., Boda, D.: The ratio of oxidized/reduced glutathione
as an index of oxidative stress in various experimental models
as shock syndrome. Biomed. Biochim. Acta, 1989, 48, S 53–57. –
30. Országos Szemészeti Intézet 14. sz. módszertani levele:
Retrolentalis fibroplasia. Budapest, 1984. – 31. Papp A., Németh
L., Pelle Zs.: Az antioxidáns védekezőképesség retrospektív,
biokémiai vizsgálata retinopathia praematurorumban. Orv.
Hetil., 1993, 134, 1021–1024. – 32. Papp, A., Németh, L., Pelle, Zs.:
A retrospective ophthalmological and biochemical study on
the antioxidant defense capacity of patients suffering from
retinopathy of prematurity. In: Mózsik, Gy., Emerit, I., Fehér, J.
és mtsai (eds): Oxygen Free Radicals and Scavengers in the
Natural Sciences. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993, 199–206.
old. – 33. Papp, A., Németh, L., Pelle, Zs. és mtsai: A oneyear oph-
thalmological and biochemical follow-up study on prematures
with high risk of retinopathy. In: Mózsik, Gy., Emerit, I., Fehér, J.
és mtsai (Eds): Oxygen Free Radicals and Scavengers in the
Natural Sciences. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993, 199–202.
old. – 34. Papp A., Németh L., Pelle Zs. és mtsai: A koraszülött és
anyai antioxidáns vitaminszintek és a vasraktárak állapota
retinopathia praematurorumban. Szemészet, 1995, 132, 51–54. –
35. Phelps, D. L., Rosenbaum, A. L., Isenberg, S.: Efficacy and
safety of tocopherol for preventing retinopathy of prematurity.
A randomized controlled, double masked trial. Pediatrics, 1987,
79, 489–496. – 36. Prendiville, A., Schulenburg, W. E.: Clinical
factors associated with retinopathy of prematurity. Arch. Dis.
Child., 1988, 63, 522–528. – 37. Rea, H. M.: Relation between eryth-
rocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase
activities of New Zealand residents and visitors to New
Zealand. Br. J. Nutr., 1979, 42, 201–204. – 38. Rotruck, J. T.:
Selenium: biochemical role as a component of glutathione per-
oxidase. Science, 1973, 179, 588–591. – 39. Saugstad, O. D.:
Oxygen toxicity in the neonatal period. Acta Paediatr. Scand.,
1990, 79, 881–883. – 40. Schaffer, D., Palmer, E., Plotsky, D. és mtsai:
Prognostic factors in the natural course of retinopathy of
prematurity. Ophthalmology, 1993, 100, 230–235. – 41. Shohat,
M., Reisner, S. K., Krikler, R. és mtsai: Retinopathy of prematu-
rity: incidence and risk factors. Pediatrics, 1983, 72, 159–163. – 42.
Sullivan, J. L.: Iron, Plasma Antioxidants, and the "Oxygen
Radical Disease of Prematurity". Amer. J. Dis. Child., 1988, 142,
1341–1344. – 43. Szabó G., Bálint Sz., Nyeste E.: Egészséges em-
berek hiányos nyomelem ellátottsága a szérum és plazma multi-
elemek analízise alapján. Orvosi Hetil., 1991, 132, 395–398. – 44.
Takahashi, K., Newburger, P. E., Cohen, H. J.: Glutathione peroxi-
dase protein. Absence in selenium deficiency states and correla-
tion with enzymatic activity. J. Clin. Invest., 1986, 77, 1402–1408. –
45. Tietze, E.: Enzymic method for quantitative determination of
nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application
to mammalian blood and other tissues. Anal. Biochem., 1969, 27,
502–522. – 46. Valentine, P. H., Jackson, J. C., Kalina, R. E. és mtsai:
Increased survival of low birth weight infants: impact on the inci-
dence of retinopathy of prematurity. Pediatrics, 1989, 84, 442–445.
– 47. Zhu, L., Piao, J., Cheng és mtsai: The antioxidative ability of
erythrocyte of children with different selenium status. Acta.
Pharmacol. Toxicol., 1986, 59, Suppl. VII. 331–335.

(Papp Andrea dr., Szeged, Pf. 407. 6701)

VI.

A Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem.
Szemészeti Klinika (igazgató: Kolozsvári Lajos egyetemi
tanár). Gyermekklinika (igazgató: Pintér Sándor)*,
Gyermekkórház (igazgató: Tekulics Péter)** közleménye

A koraszülött és anyai antioxidáns vitaminszintek és a vasraktárak állapota retinopathia praematurorumban

Papp Andrea, Németh Ilona*, Pelle Zsuzsanna,
Tekulics P. **

A retinopathia praematurorum (ROP) kialakulását elősegítő tényezők vizsgálata a számos, eddig leírt rizikófaktor ismerete ellenére továbbra is időszerű. Az adott földrajzi terület környezeti tényezői, az anya táplálkozása, vitamin- és nyomelem-ellátottsága a koraszülött antioxidáns védekező-képességét nagymértékben befolyásolja. Munkánkban arra kerestünk választ, hogy az élet első 6 hetében az előzetesen oxigénkezelt, alacsony születési súlyú koraszülöttek – ROP kialakulása szempontjából fontos – biokémiai paraméterei mennyiben tükrözik az anyai szervezet hasonló viszonyait. Vizsgálataink szerint a vasraktárak állapotát tükröző ferritin koncentrációk ROP-os koraszülöttekben lényegesen magasabbak, mint az anyai értékek. Az antioxidáns vitaminok (A, E) szintje azonban szinte minden esetben az anyákban magasabb, placentán való átjutásuk a gesztációs kortól függ. Eredményeink arra utalnak: 1. Az első 6 életheten inkább a vastülterhelés jelenthet problémát a ROP kialakulása szempontjából. 2. Az anya fehérje-, vitamin- és nyomelem-ellátottságának javításával a koraszülött antioxidáns védekezőképessége fokozható. 3. A mért E-vitamin-szintek alapján az éretlen, beteg koraszülöttek ROP prevenció céljából E-vitamin-kezelést igényelnek.

Kulcsszavak: antioxidáns védekezés, aktív oxigéngyökök, retinopathia praematurorum, E-, A-vitamin, ferritin

The plasma concentration of antioxidant vitamins and the iron-pool in mothers and their preterm infants suffering from retinopathy of prematurity

Even though there is a long list of well-known factors leading to Retinopathy of Prematurity (ROP) the analysis of the possible and individual risk factors is still important. The different environmental factors of a certain geographical area as well as the mothers' eating habits, vitamin and trace element intake during pregnancy can influence the antioxidant defense capacity of the preterm baby. In this study we tried to find a correlation between the previously oxygen-treated, premature babies' biochemical parameters and those of their mothers during the first 6 weeks of the baby's life. According to our results the ferritin concentration which is an indicator the body's iron pool was much higher in our ROP patients than in their mothers. The plasma concentrations of the antioxidant vitamins (A, E), however, were always higher in the mothers, as their transport rate through the placenta depends on the gestational age. Our conclusions are: 1. During the first 6 weeks

of life iron overload might be one of the main factors leading to ROP. 2. The administration of protein, antioxidant vitamins and trace elements to the high risk mother could improve the antioxidant capacity of their babies. 3. The very low vitamin E levels measured in premature suggest that vitamin E administration could be very useful in the prevention of ROP.

Keywords: antioxidant capacity, free oxygen radicals, Retinopathy of Prematurity, Vitamin A, E, ferritin

A retinopathia praematurorum – továbbiakban ROP – multifaktoriális etiológiájú betegség, amely a legéretlenebb és legbetegebb koraszülötteket érinti leginkább [16, 28]. A perinatalis ellátás javulásával egyre több igen kis súlyú újszülött marad életben, aminek következtében a ROP gyakorisága ismét emelkedik [7, 8, 16]. Számos irodalmi adat utal azonban arra, hogy a ROP előfordulásában igen nagy biológiai különbségek vannak. Sem a koraszülött éretlensége (születési súly, gesztációs kor), sem az oxigénkezelés módja és időtartama, sem pedig az eddig leírt, mintegy 40 hajlamosító tényező (acidosis, apnoe, idiopathiás respiratorikus distress syndrome, sepsis, shock, hypoxia, hyperoxia, felnőttvér-transzfúziók, korai vaskezelés, fénykezelés stb.) figyelembevételével sem jósolható meg a ROP létrejötte, illetve súlyossági foka [2, 7, 8, 11, 16, 25, 28]. Ezért egyéni különbség tételezhető fel az oxigéngyökök iránti érzékenységben, melyben öröklött enzimgyengeség, vitaminhiány (E, A, C) és/vagy nyomelemhiány (szelén, cink) egyaránt szerepet játszhatnak [15, 21, 22, 23].

Megfigyelték azt is, hogy a ROP kialakulásában földrajzi különbségek is vannak [6, 26]. Az adott földrajzi terület környezeti tényezői, a levegő szennyezettsége, a talaj nyomelemtartalma, az anyai táplálkozás, vitamin- és nyomelem-ellátottság, az anyai dohányzás a koraszülött antioxidáns védekezőképességét nagymértékben befolyásolják.

Az antioxidáns védekezőképesség csökkent voltát különböző életkorú ROP-os betegeink esetén, retrospektív vizsgálattal [21, 22], majd a ROP szempontjából veszélyeztetett koraszülöttek prospektív vizsgálatával [23] korábban már bizonyítottuk. Beszámoltunk arról is, hogy az aminosav- és fehérje-ellátottságot tükröző szabad szulfhidril csoportok száma ROP esetén mind az anyákban, mind a gyermekekben csökkent volt [23]. Hasonló tendenciát mutatott az egyik legfontosabb antioxidáns hatású nyomelem, a szelén vérszintje is [23].

Jelen munkánk során arra kerestünk választ, hogy az élet első 6 hetében az előzetesen oxigénkezelt, alacsony születési súlyú koraszülöttek ROP kialakulása szempontjából fontos további paraméterei: az antioxidáns vitaminok (E, A) plazmaszintje, és a vasraktárak állapotát legjobban jellemző ferritin koncentrációk hiányállapotot jeleznek-e, illetve mennyiben tükrözik az anyai szervezet hasonló viszonyait.

Beteganyag és vizsgálati módszerek

A Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem Szemészeti Klinikáján első ROP szűrésen 6 hetes életkorban megjelent 60, ROP szempontjából veszélyeztetett (2000 gramm alatti születési súlyú, a perinatalis időszakban oxigénkezelt) koraszülöttről és 44 esetben az édesanyáktól – a gyermek szemészeti vizsgálata után – 1,5 ml-nyi EDTA-val alvadásgátlólt vért vettünk, amelyhez minden esetben szülői beleegyezést kértünk. A vizsgálatokat előzetes protokoll alapján végeztük. Ezt az egyetem Tudomány-etikai Bizottsága jóváhagyta.

Betegeink átlagos gesztációs kora: $32,8 \pm 3,1$; születési súlya 1529 ± 302 g ($\bar{X} \pm S.D.$) volt. Betegeinket szemészeti statusuk alapján 3 csoportba soroltuk (1. táblázat): 1. A ROP már az első vizsgálattal kizárható volt ($n=27$). 2. A ROP-ot az első vizsgálattal nem tudtuk kizárni, mert éretlenségi jeleket: borús üvegtestet, halvány perifériát láttunk ($n=28$). 3. Már az első vizsgálatkor észlelhető volt a ROP I.-II., ill. ROP II.-III. ($n=5$). Az 1. táblázat adatai mutatják, hogy a ROP-os betegek gesztációs kora és születési súlya lényegesen alacsonyabb a másik két betegcsoport értékeinél.

1. táblázat

Előzetesen oxigénkezelt, 6 hetes koraszülöttek jellemző paraméterei

	Betegszám	Gesztációs kor (hét)	Születési súly (g)
		$\bar{X} \pm S.D.$	
ROP kizárható	27	$33,7 \pm 2,5$	1707 ± 306
ROP nem kizárt	28	$32,3 \pm 3,2$	1418 ± 273
ROP I.-III.	5	$28,9 \pm 3,0^{**}$	$1310 \pm 330^{*}$
Összesen	60	$32,8 \pm 3,1$	1529 ± 302

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

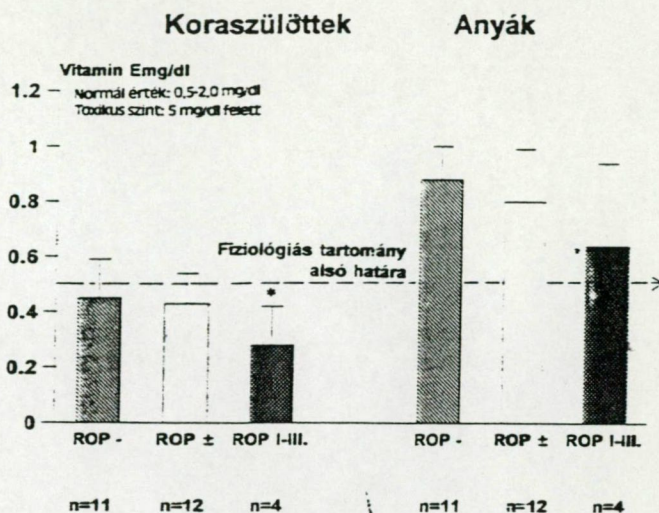
A plazma E- és A-vitamin koncentrációját magasnyomású folyadékkromatográfiás eljárással $100 \mu\text{l}$ plazmából határoztuk meg Catignani szerint [12]. A plazma ferritin szintek mérésére radioimmunassay eljárást alkalmaztunk $50 \mu\text{l}$ plazmamintából az Országos Izotóp Intézet által forgalmazott kiték formájában.

Etikai szempont alapján korlátoztuk a koraszülöttektől levett vérmintákat, így mikromódszereink alkalmazása ellenére sem tudtunk minden betegtől minden mérést elvégezni. Ezért jeleztük az ábrákon a mérések számát.

Az eredmények értékelésében az átlag, standard deviáció, standard error paraméterekkel jellemzett mintákból a statisztikai szignifikanciát a Student-féle kétmintás „t” próbával végeztük.

Eredmények

Az 1. ábrán az E-vitamin plazmakoncentrációkat, a 2. ábrán az A-vitamin plazmakoncentrációkat ábrázoltuk mind a koraszülöttek, mind az anyák esetén a ROP jelenléte szempontjából létrehozott csoportokra lebontva. Az ábrákon a normál értékek megadása mellett szaggatott vonallal jeleztük a fiziológiás vérszinttartomány alsó határát. Látható, hogy az E-vitamin plazmaszintje mind a koraszülöttek, mind az anyák esetén azonos tendenciájú, párhuzamos változást mutatott. A ROP-os koraszülöttekben (3. csoport) kifejezett E-vitamin-hiány állt fent, de már az anyai értékek is a normális alsó határán voltak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a nem ROP-os betegcsoportok átlagértékei is a fiziológiás tartomány alsó határa alatt voltak, a koraszülött populáció E-vitamin hiányállapotát jelezve.



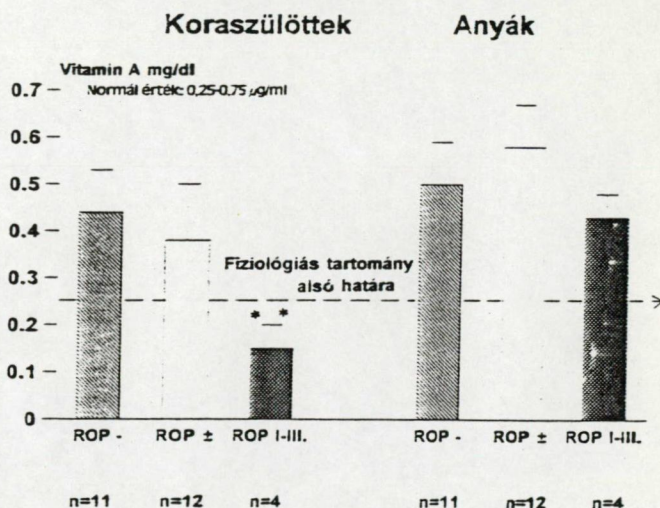
1. ábra. Az E-vitamin plazmakoncentrációja koraszülöttekben és anyákban

($\bar{X} \pm S.E.$) n: betegek száma;

Betegcsoportok: ROP -: ROP kizárható;

ROP ±: első vizsgálattal ROP nem zárható ki;
ROP I.-III.

Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$



2. ábra. Az A-vitamin plazmakoncentrációja koraszülöttekben és anyákban

($\bar{X} \pm S.E.$) n: betegek száma;

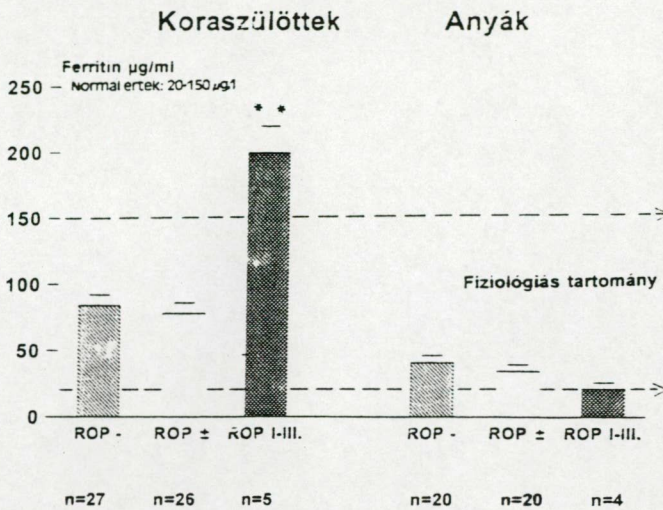
Betegcsoportok: ROP -: ROP kizárható;

ROP ±: első vizsgálattal ROP nem zárható ki;
ROP I.-III.

Statisztikai szignifikancia: ** $p < 0,01$

A 2. ábrán ábrázolt A-vitamin-szintek az E-vitaminhoz hasonlóan a koraszülöttek és az anyák esetén minden csoportban párhuzamos tendenciájú változást mutattak, és csak a ROP-os betegekben volt észlelhető kifejezett A-vitamin-hiány. A ROP-os betegekhez tartozó anyai szintek és a nem ROP-os betegcsoportok értékei a fiziológiás tartományba estek.

A 3. ábrán a vasraktárak állapotát legjobban tükröző ferritin koncentrációkat ábrázoltuk mind a koraszülöttek, mind az anyák esetén a ROP jelenléte szempontjából létrehozott csoportok



3. ábra. A vasraktárakat jellemző ferritin plazmakoncentrációja koraszülöttekben és anyákban

($\bar{X} \pm S.E.$) n: betegek száma;

Betegcsoportok: ROP -: ROP kizárható;

ROP ± : első vizsgálattal ROP nem zárható ki;
ROP I-III.

Statistikai szignifikancia: * * p < 0.01

szerint. Látható, hogy itt ellentétes irányú összefüggés állt fent a koraszülöttek és az anyák értékei között. Már a nem ROP-os koraszülötteknél is megfigyelhető a ferritin-értékek anyainál magasabb volta, azonban a ROP-os csoportban kifejezett vastülterhelés állt fent az anyai vashiány ellenére.

Megbeszélés

A szabad oxigéngyök teória szerint ROP akkor jön létre, ha a perinatalis időszakban képződött szabad oxigéngyökök mennyisége túllépi az éretlen szervezet antioxidáns védekezőképességét. Az antioxidáns védelemben az E- és A-vitamin („lánctörő antioxidánsok”) rendkívül fontos szerepet töltenek be, mivel a membránok lipidjeinek oxidációval szembeni védelmét szolgálják. A retina tartalmazza az emberi szervezet leghosszabb szénláncú telítetlen zsírsavait, melyek lipid peroxidációra fokozottan érzékenyek. A vas mint valenciáját könnyen változtató fémion a biológiai oxidációk legfontosabb elősegítője. A vas elleni antioxidáns védelem a retina fokozott érzékenysége következtében a koraszülöttek retinopathiája kialakulása szempontjából alapvetően fontos. Ennek egyik eleme az antioxidáns vitaminok jelenléte, a fontosabb az ún. preventív antioxidáns transzport- és szorosan kötő-fehérjék (transzferrin és coeruloplazmin) szintje.

Vizsgálataink szerint az E-vitamin plazmakoncentrációja szinte az összes koraszülöttnél a fiziológias tartomány alsó határa alatt marad, és alacsonyabb szinten tükrözi az anyai szervezet értékeit. Eredményeink megfelelnek az irodalmi adatoknak, amelyek szerint a placentáris barrier E-vitamin tekintetében 4:1 [15, 18]. De eredményeink arra is utalnak, hogy az anyák terhesség alatti E-vitamin kezelésével az újszülöttek E-vitamin szintjét is emelni lehetne. Magyarországon ez azért is kiemelten fontos, mert az E-vitaminnal szinergista módon egyúthatható szelén koncentrációk előzetes méréseink szerint mind az anyákban, mind a koraszülöttekben igen alacsonyak [23]. Pedig éppen a legéretlenebb koraszülöttekben van a szelén ellátottságnak a legnagyobb jelentősége. Bizonyították, hogy a 28. gesztációs hét előtt adott E-vitamin transzport fehérje hiányában nem tudja antioxidáns védőhatását

kifejteni a fejlődő retinaerek prekursor (spindle) sejtjeire [15, 19], ezért az antioxidáns védelem egyedüli lehetősége a 28. gesztációs hét előtt a transzportfehérjét nem igénylő, vízdékonny szelén. A szelén szupplementáció jelenlegi egyetlen lehetősége éretlen koraszülöttekben a Prematil-tápszer, amely szelént is tartalmaz.

A veszélyeztetett koraszülöttek ROP prevenció céljából történő E-vitamin kezelésének eredményességéről ellentmondó irodalmi adatok vannak [13, 14, 17, 19, 24]. Ennek oka, hogy vénás adagolás, vagy hirtelen nagy dózisú E-vitamin-kezelés toxikus mellékhatásokat váltott ki (sepsis, necrotizáló enterocolitis, agyvérzés, retinalis vérzések). Vérszintmérési adatok toxikus vérszint (> 5 mg/dl) jelenlétét mutatták ilyen esetekben [17, 24]. A II. táblázat az eddigi kezelések tapasztalatai alapján megfelelőnek tartott, és elérendő terápiás vérszintértékeket mutatja. Hittner és mtsai állatkísérletekből levont következtetései szerint a retinalis E-vitamin-felvétel szempontjából a per os adagolás az optimális [14]. Per os adva lassan, fokozatosan érhető el a kívánt vérszint, mely az American Academy of Pediatrics adatai szerint: 0,5–2 mg/dl [1].

A III. táblázat a per os adható gyógyszerkészítményeket mutatja be. Az American Academy of Pediatrics 1992-ben kiadott javaslata szerint az 1. életnaptól kell E-vitamint adni addig, amíg az erek elérik a temporalis ora serratát [1]. Az ideális,

II. táblázat

E-vitamin-kezelés	
VÉRSZINT	HATÁSA
Terápiás vérszint: 0,5-2,0 mg/dl (American Academy of Pediatrics, 1992)	orsósejtek 'gap junction' képződését akadályozza
Toxikus vérszint: 5 mg/dl	Sepsis, NEC, agyvérzés, intraretinalis vérzés
(Johnson, 1985)	

III. táblázat

E-vitamin-készítmények	
Aquasol - E (vízdékonny) cseppek Adagolás: 30 mg/die per os	Ideális készítmény jelenleg nem elérhető
Vitamin E (olajos injekció) 30 mg/ml Kőbányai Gyógyszerárugyár Adagolás: 0,5 ml naponta per os	SZOTE Gyermecklinika eddiggi kezelési sémája
Vitamin E (kapszula) 100 mg Kőbányai Gyógyszerárugyár Adagolás: 3 naponta 1 kapszula	

vízoldékony készítmény (Aquasol-E) sajnos Magyarországon még nem áll rendelkezésre, ezért a SZOTE Gyermekklinika vizsgálatai alapján az olajos injekcióból javasoljuk 0,5 ml per os adását naponta, így szintén elérhető egy alacsony, de még terápiás E-vitamin-szint.

Eredményeink szerint a koraszülöttek A-vitamin-szintje is szorosan összefügg az anyai értékekkel, de csak a ROP-os betegek esetén mérhető a fiziológiás tartomány alsó értékénél alacsonyabb plazmaszint.

Újabb az is feltételezik, hogy fény hatására a vérben lévő fényérzékenyítő hatású protoporphyrin IX vegyületből reaktív oxigéngyökök termelődnek, és ezeknek a ROP patogenezisében jelentős szerepük lenne [4, 10]. Az A-vitamin fiziológiás szerepe éppen a porphyrinek fénytől való védelme [20], a membránok alkotórészeként az aktív oxigéngyököket hatástalanítja.

A vas kóros szerepét, ill. a vas és oxigén együttes hatását a ROP kialakulásában a szabad oxigéngyök-képződés alapján Sullivan vetette fel [29]. Újszülöttkorban a vasanyagcsere alapvető változáson megy át. Átmenetileg megszűnik a csontvelőben a vörösvértestképzés, mely a fiziológiás vörösvérsejt-szételés következtében felszabaduló vasat beépítene. Az intenzív ellátást igénylő koraszülöttekben az oxigénkezelés, fénykezelés, esetleges vaspótlás, transzfúziók, cseretranszfúziók révén vasterhelés következik be. A vas-asszociált antioxidáns rendszerük, elsősorban a coeruloplazmin és transzferrin szintje alacsony, és a transzferrin kötőhelyek telítődnek. A koraszülöttek plazmájában fehérjéhez nem kötött szabad vas megjelenését írták le, és ennek a szabad vasnak a „koraszülöttek oxigén radikál betegség”-ének kialakulásában jelentőséget tulajdonítanak [9]. A Saugstad által leírt „koraszülöttek oxigénradikál betegsége” magában foglalja az idiopathiás respiratorikus distress szindrómát, a bronchopulmonalis dysplasiát, a necrotizáló enterocolitist, a ROP-ot és az intracranialis vérzést, mely egyetlen közös pathomechanizmusú alapbetegség lenne különböző szervi manifesztációval, mely akkor és ott jön létre, ahol a reaktív metabolitok képződése meghaladja az éretlen szervezet antioxidáns védekezőképességét [27].

Vizsgálatainkban a szervezet vasraktárainak jellemzésére szolgáló ferritin szintek alátámasztják az irodalmi adatokat, melyek szerint az anyai vashiány ellenére a koraszülöttekben már születéskor is magasabb ferritinszintek mérhetők, és az intenzív beavatkozások során tovább emelkedik a plazma ferritin szintje. Tekulics és mtsai koraszülöttek vaskezelése során a vörösvértest glutathion redox rendszerén mérhető oxidatív stressz jelenlétéről számolt be [30]. További vizsgálatokat tervezünk koraszülöttek antioxidáns rendszereinek változásáról az élet első heteiben.

Előzetesen oxigénkezelte, ROP szempontjából veszélyeztetett koraszülöttek antioxidáns vitaminszintjeinek elemzése ismét felhívja a figyelmet a megelőzés fontosságára. Csak a teljes populáció egészségi állapotának javításától várható, hogy a gyermekori vakság egyik fő okát, a retinopathia prematurorumot megelőzzük.

Irodalom

1. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Pediatrics in Review 14, 128 (1993).
2. Biglan A., Brown D., Reynolds J., Milley R.: Risk factors associated with retrolental fibroplasia. Ophthalmology 91, 1504 (1984).
3. Burton K. W., Joyce A., Ingold K. U.: Is vitamin E the only soluble, chainbreaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? Arch Biochem Biophys 221, 231 (1983).
4. Bynne L. A., Gottsch J. D., Sudda S. R., Panton R. W., Haller E. M. S., Gleason Ch.: An elevated hematogenous photosensitizer in the preterm neonate. Invest Ophthalmol Vis Sci 34, 2878 (1993).
5. Cutignani G. L., Bieri J. G.: Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. Clin Chem 29, 708 (1983).
6. Darlow B. A.: Incidence of retinopathy of prematurity in New Zealand. Arch Dis Child 63, 1083 (1988).
7. Editorial: Retinopathy of prematurity. Lancet 337, 83 (1991).
8. Editorial: Oxygen restriction and retinopathy of prematurity. Lancet 339, 961 (1992).
9. Evans P. J., Evans R., Kovar I. Z., Holton A. F., Halliwell B.: Bleomycin-detectable iron in the plasma of premature and full-term neonates. FEBS Letters 303, 210 (1992).
10. Glass P., Avery G. B., Subramanian K. S.: Effect of bright light in the hospital nursery on the incidence of retinopathy of prematurity. N Engl J Med 313, 104 (1985).
11. Gunn T. R.: Risk factors in retrolental fibroplasia. Pediatrics 65, 1096 (1980).
12. Handelman G. J., Druz E. A.: The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of pro-oxidant-induced damage. Adv Free Radic Biol Med 2, 1 (1986).
13. Hervei S.: A retrolentalis fibroplasia és az E-vitamin. Orvostudium 59, 435 (1984).
14. Hittner H. M., Kretzer F. L.: Efficacy of vitamin E in retinopathy of prematurity. In: McPherson A. R., Hittner H. M., Kretzer F. L.: Retinopathy of Prematurity, Current Concepts and Controversies. Toronto, pp 89 (1986).
15. Hittner H. M., Kretzer F. L., Lane H. W.: Selenium dependent glutathione peroxidase in preterm human retinas. Fed Proc 46, 566 (1987).
16. Holström G.: Retinopathy of prematurity. Br Med J 307, 694 (1993).
17. Johnson L.: Effect of sustained pharmacologic vitamin E levels on incidence and severity of retinopathy of prematurity: A controlled clinical trial. J Pediatr 114, 827 (1989).
18. Kretzer F. L., Hittner H. M.: Retinopathy of prematurity: Clinical implications of retinal development. Arch Dis Child 63, 1151 (1988).
19. Kretzer F. L.: Vitamin E protects against retinopathy of prematurity through action on spindle cells. Nature 309, 793 (1984).
20. Mashell A. N., Bjornson L.: Photoprotection in erythropoietic protoporphyria: mechanism of protection by β -carotene. J Invest Dermatol 68, 157 (1977).
21. Papp A., Németh I., Pelle Zs.: Az antioxidáns védekezőképesség retrospektív biokémiai vizsgálata retinopathia prematurorumban. Orv Hetil 134, 1021 (1993).
22. Papp A., Németh I., Pelle Zs.: A retrospective ophthalmological and biochemical study on the antioxidant defense capacity of patients suffering from retinopathy of prematurity. In: Mózsik Gy., Emerit I., Fehér J., Matkovich B., Vincze A. (Eds) Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 203 (1993).
23. Papp A., Németh I., Pelle Zs., Tekulics P.: A one-year ophthalmological and biochemical follow-up study on premature with high risk of retinopathy. In: Mózsik Gy., Emerit I., Fehér J., Matkovich B., Vincze A. (Eds) Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 199 (1993).
24. Phelps D. L., Rosenbaum A. L., Isenherg S.: Efficacy and safety of tocopherol for preventing retinopathy of prematurity. A randomized controlled double-masked trial. Pediatrics 79, 489 (1987).
25. Prendiville A., Schulenburg W. E.: Clinical factors associated with retinopathy of prematurity. Arch Dis Child 63, 522 (1988).
26. Rea H. M.: Relation between erythrocyte selenium concentrations and glutathione peroxidase activities of New Zealand residents and visitors to New Zealand. Br J Nutr 42, 201 (1979).
27. Saugstad O. D.: Oxygen toxicity in the neonatal period. Acta Paediatr Scand 79, 381 (1990).
28. Scharfer D., Palmer E., Plotzky D., Metz H., Flynn J., Tung B.: Prognostic factors in the natural course of retinopathy prematurity. Ophthalmology 100, 230 (1993).

29. *Sullivan J. L.*: Iron, plasma, antioxidants, and the 'Oxygen Radical Disease of Prematurity'. *Am J Dis Child* 142, 1341 (1988).
30. *Tekulics P., Németh I., Papp E.*: Effects of iron and vitamin E treatment on the glutathione redox ratio in oxygen treated premature infants. In: *Mózsik Gy., Emerit I., Fehér J., Matkovics B., Vincze A.*

(Eds) *Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences.* Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 189 (1993).

Cím: **Dr. Papp Andrea**
SZAOTE Szemészeti Klinika
6722 Szeged, Korányi fasor 10-12.