

*A TROMBOCITA FUNKCIÓ ÉS AZ OXIDATIV STRESSZ VIZSGÁLATA  
PERIFÉRIÁS ÉRBETEGEKEN*

*PHD TÉZISEK*

*Kürthy Mária*

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Komoly Sámuel egyetemi tanár

Program és témavezető: **Prof. Dr. Róth Erzsébet**

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

2008

## **Tartalomjegyzék:**

<b>1. Rövidítések jegyzéke:</b>	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS:</b>	<b>6</b>
<b>2. 1. A trombociták általános jellemzői</b>	<b>7</b>
2. 1. 1. <i>A trombocita (TCT) keletkezése és morfológiája</i>	9
2. 1. 2. <i>A trombocita fiziológiás működése</i>	11
2. 1. 3. <i>A trombocita működése patológiás körülmények között:</i>	15
<b>2. 2. Az iszkémia reperfüziós károsodások biológiája</b>	<b>16</b>
2. 2. 1. <i>Mitokondriális légzési lánc és mikroszómák</i>	19
2. 2. 2. <i>A nitrogén-monoxid és szuperoxid egyensúly</i>	19
2. 2. 3. <i>A xantin-oxidáz rendszer</i>	20
2. 2. 4. <i>Egyéb szuperoxid források:</i>	20
<b>3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA:</b>	<b>22</b>
<b>4. A TROMBOCITA FUNKCIÓ ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ MONITOROZÁSA ALSÓVÉG TAGI REVASZKULARIZÁCIÓS MŰTÉTEK SORÁN</b>	<b>23</b>
<b>4. 1. Beteganyag és vizsgáló módszerek</b>	<b>23</b>
4. 1. 1. <i>A vizsgálatokba bevont betegek</i>	23
4. 1. 2. <i>Mintavételi protokoll</i>	25
4. 1. 3. <i>A trombocita funkció vizsgálata PRP-ben</i>	25
4. 1. 4. <i>Trombocita funkció vizsgálata teljes vérben:</i>	26
4. 1. 5. <i>Prooxidánsok vizsgálata:</i>	26
4. 1. 6. <i>Antioxidánsok vizsgálata</i>	28
4. 1. 7. <i>Statisztika</i>	30
<b>4. 2. Eredmények:</b>	<b>31</b>
4. 2. 1. <i>Vörösvérsejtszám, hematokrit és hemoglobin értékek</i>	31
4. 2. 2. <i>Trombocita aggregáció változása</i>	33
4. 2. .4. <i>Prooxidánsok</i>	38
4. 2. 5. <i>Antioxidánsok változása:</i>	42
<b>4. 3. Eredmények összefoglalása és következtetések</b>	<b>45</b>

<b>5. A TROMBOCITA FUNKCIÓ ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ MONITOROZÁSA DIABÉTESZES PERIFÉRIÁS ÉRBETEGEKEN</b>	<b>51</b>
<b>5. 1. Bevezetés</b>	<b>51</b>
5. 1. 1. <i>Az inzulinrezisztencia kialakulásának elméleti háttere</i>	53
5. 1. 2. <i>A T2DM kialakulása és következményei, az inzulin rezisztencia és az oxidatív stressz kapcsolata</i>	55
5. 1. 3. <i>A trombocita funkció változása az inzulin rezisztencia kialakulását követően</i>	57
<b>5. 2. Anyagok és módszerek:</b>	<b>58</b>
5. 2. 1. <i>Betegek</i>	58
5. 2. 2. <i>A trombocita aggregáció vizsgálata</i>	59
5. 2. 3. <i>Prooxidánsok vizsgálata:</i>	60
5. 2. 4. <i>Antioxidánsok vizsgálata:</i>	60
5. 2. 5. <i>INR érték és fibrinogén koncentráció</i>	61
5. 2. 6. <i>Statisztika:</i>	61
<b>5. 3. A perifériás diabéteszes érbetegek vizsgálatának eredményei</b>	<b>62</b>
5. 3. 1. <i>A trombocita aggregáció vizsgálatok eredménye izolált trombocitákon</i>	63
5. 3. 2. <i>Trombocita aggregáció vizsgálatok teljes vérben</i>	64
5. 3. 3. <i>Prooxidánsok vizsgálatának eredményei</i>	67
5. 3. 4. <i>Antioxidánsok vizsgálatának eredményei</i>	68
<b>5. 4. Eredmények összefoglalása és következtetések</b>	<b>71</b>
<b>6. ÚJ EREDMÉNYEK:</b>	<b>75</b>
<b>7. FELHASZNÁLT IRODALOM:</b>	<b>77</b>
<b>8. A TÉMÁVAL KAPCSOLATOS SAJÁT PUBLIKÁCIÓK</b>	<b>88</b>
<b>8. 1. Közlemények:</b>	<b>88</b>
<b>8. 2. A témával kapcsolatos absztraktok:</b>	<b>91</b>
<b>8. 3. A témához szorosan nem kapcsolódó közlemények</b>	<b>91</b>
<b>9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:</b>	<b>101</b>

## Rövidítések jegyzéke:

<b>ADP</b>	adenozin difoszfát
<b>ATP</b>	adenozin trifoszfát
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	kalcium ion
<b>CABG</b>	coronary artery bypass grafting
<b>CAT</b>	kataláz
<b>COX</b>	ciklooxygenáz
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>DTNB</b>	5,5-ditiobisz-2-nitrobenzoesav
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraecetsav
<b>GP</b>	glikoprotein
<b>GPx</b>	glutathion peroxidáz
<b>GSH</b>	redukált glutathion
<b>HDL</b>	magas denzitású lipoprotein
<b>ICAM-1</b>	intercelluláris adhéziós molekula-1
<b>IP<sub>3</sub></b>	inozitol trifoszfát
<b>IR</b>	inzulin rezisztencia
<b>LDL</b>	alacsony denzitású lipoprotein
<b>MLC</b>	myosin light chain kinase
<b>mRNS</b>	messenger RNS
<b>NO</b>	nitrogén monoxid
<b>NSAID</b>	nem szteroid gyulladásgátló gyógyszerek
<b>OCS</b>	open canalicular system
<b>P47</b>	pleckstrin
<b>PAD</b>	peripheral arterial disease
<b>PAF</b>	platelet activating factor
<b>PAI-1</b>	plazminogén aktivátor inhibitor-1

<b>PDGF</b>	platelet derived growth factor
<b>PGG<sub>2</sub></b>	prostaglandin G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	prostaglandin H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostaglandin I <sub>2</sub> ,
<b>PIP<sub>2</sub></b>	foszfatidil difoszfát
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Foszfolipáz A <sub>2</sub>
<b>TCT</b>	trombocita
<b>PMA</b>	phorbol-12-mirisztát-13-acetát
<b>PPP</b>	platelet poor plasma
<b>PRP</b>	trombocita dús plazma (platelet rich plasma)
<b>RNS</b>	reaktív nitrogén species
<b>ROS</b>	reaktív oxigén species
<b>SOD</b>	szuperoxid dizmutáz
<b>T<sub>1</sub>DM</b>	1-es típusú diabétesz mellitusz
<b>T<sub>2</sub>DM</b>	2-es típusú diabétesz mellitusz
<b>TGF</b>	transforming growth factor
<b>TIA</b>	transient ischemic attack
<b>TRIS</b>	2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol, azaz trishidroxi-metilaminometán
<b>TS</b>	tromboxán szintáz
<b>TXA<sub>2</sub></b>	tromboxán A <sub>2</sub>
<b>Xox</b>	xantin oxidáz
<b>vWF</b>	von Willebrand faktor

## 2. BEVEZETÉS:

A perifériás artériás érbetegség (peripheral arterial disease: PAD) az átlagéletkor emelkedésével az emberiség egyre nagyobb hányadát érinti. A betegség előfordulása és gyakorisága nagy eltéréseket mutat, a földrajzi, éghajlati, életmód és munka körülmények függvényében is. Az USA-ban 10 millióra tehető az alsó végtagi érbetegek száma, férfiakon gyakoribb, mint nőknél, 60 év fölött az előfordulás 10%-os. A PAD miatt végrehajtott műtétek száma az USA-ban évente 260000.

Az Edinburgh Artery Study szerint a klaudikáció intermittens kórképben szenvedő betegek 20 %-a 5 éven belül elhalálozik, 13,7%-uk kardiovaszkuláris okok miatt, ezért a „British Recommendation on Prevention of Coronary Heart Disease in Clinical Practice” ajánlása szerint a PAD betegeket úgy kell kezelni, mint azokat a betegeket, akik az első miokardiális infarktust túlélték<sup>1,2</sup>.

Magyarországon az összes halálozási ok 51%-a érbetegség eredetű, és a PAD az ötven év feletti felnőtt lakosság 20%-át érinti. Hazánkban évi 270000-es angiológiai ambuláns forgalom mellett 42 ezer az érbetegség miatt kórházban ápolott betegek száma és ebből 34000 kerülnek műtétre. Országosan évente 6-7 ezerre tehető az amputációk száma<sup>3</sup>.

A perifériás artériás obliteratív arterioszklerózisnak, a koronária szklerózisnak és a karotisrendszer obliteratív megbetegedésének alapját azonos komplex kórfolyamatok képezik. Így nem meglepő, ha a PAD-ban szenvedő betegek fokozott mértékben vannak kitéve a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris történéseknek<sup>4</sup>. Mamode N és munkatársai szerint a korai posztoperatív időszakban ez különösen így van, ők a betegek 12 %-ánál tapasztaltak miokardiális infarktust<sup>5</sup>. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy az abnormális trombocita funkció mind az ateroszklerózis progressziójában, mind az akut iszkémiás eseményekben szerepet játszhat.

A PAD sürgősségi, vagy elektív rekonstrukciós műtétei során jelentős mértékű iszkémia reperfüziós (I/R) károsodással is számolni kell. A súlyosan iszkémiás végtag keringésének helyreállítása mindmáig kockázatos, magas morbiditású és mortalitású beavatkozás, melynek csökkentéséhez a háttérben zajló patofiziológiai folyamatok megismerése, és annak

befolyásolása elengedhetetlen. Az 1991-ben Glasgow-ban 126 embolektomián átesett betegen végeztek 7 évig tartó prospektív vizsgálatokat, mely szerint a végtag megtartási ráta 88%, a 7 éves mortalitás pedig 26% volt. A mortalitás összefüggésben állt az érintett izomtömeg nagyságával és a műtét alatti iszkémia időtartamával<sup>6</sup>. A reperfüziós károsodások kivédése, és a szöveti oxidatív stressz csökkentése alapvetően fontos a teljes klinikai restitúció eléréséhez<sup>7</sup>. Nagyon nehéz monitorozni azokat a sejtszintű folyamatokat, amelyek befolyásolják a revaszkularizációs műtétek kimenetelét, vagy markerei lehetnek a várható eseményeknek<sup>8,7</sup>.

Míg a koszorúsér betegségeket, koronária intervenciós beavatkozásokat és a koszorúsér bypass műtéteket különleges figyelem és publicitás övezi, addig a perifériás érbetegségekkel kapcsolatban nagyságrenddel kevesebb adat áll rendelkezésre. A perifériás érbetegeken jelentkező I/R károsodást kísérő, trombocita (platelet: TCT) funkcióban bekövetkező változásokról, pedig alig találunk adatokat<sup>9</sup>, holott a PAD betegek kardiovaszkuláris események miatti mortalitása (miokardiális infarktus, sztrók) magasabb a korcsoport kontrollnál<sup>10</sup>.

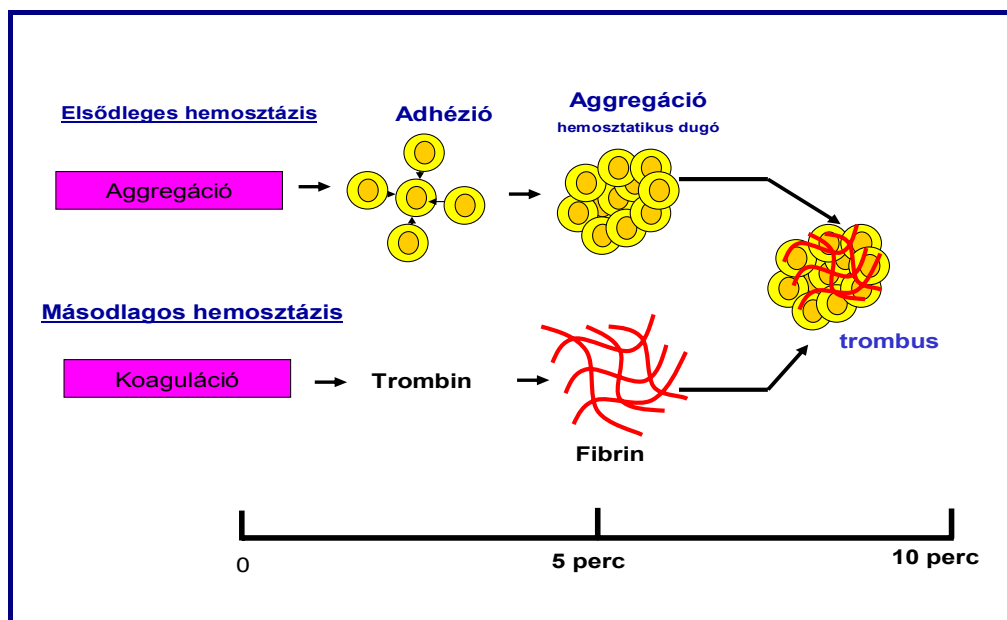
Diabétesz mellituszban szenvedő betegeknél a betegség 2 évtizedes fennállása után 12%-ban fordul elő perifériás angiopátia. A PAD előfordulása is gyakoribb, mint a nem diabéteszesek betegeken. A diabétesztől kísért perifériás artériás érbetegségek még súlyosabb következményekkel járnak, mint ahogy az metabolikusan egészséges személyeknél tapasztalható, de arra csak elvétve találtunk adatokat, hogy vannak-e különbségek az 1-es és 2-es típusú diabéteszes (T<sub>1</sub>DM, T<sub>2</sub>DM) perifériás érbetegek TCT funkciója, illetve prooxidáns/antioxidáns státusza között.

### ***2. 1. A trombociták általános jellemzői***

**A trombociták** a hemosztázis rendszer fő komponensei, legfőbb feladatuk a vérárvadásban szerepet játszó kémiai anyagok szállítása, melyek segítségével kitapadnak a sérült felszínre, létrehozzák az elsődleges hemosztatikusan rögzítést, megakadályozva ezzel a további vérvesztést és elindítják a véredény integritásának helyreállítását is. A vérlemezkék a

hemosztázis fenntartásában<sup>11</sup> játszott szerepük mellett a gyulladás és az immunválasz modulálásában<sup>12</sup>, a sebgyógyulásban<sup>13</sup>, és a szöveti regenerációban<sup>14,15</sup> is részt vesznek. Antimikrobiális proteinjeik révén baktericid hatással is rendelkeznek<sup>16</sup>, valamint fagocitózisra is képesek<sup>17</sup>, de az trombusképződéssel járó betegségek patomechanizmusában is szerepet játszanak<sup>18</sup>.

Az erek sérülésekor két dolog történik szinte azonnal: az endotélium sérülése miatt felszínre kerülő kollagén hatására a vérlemezkék kitapadnak a sérült felszínre, majd a belőlük felszabaduló vazoaktív anyagok, tromboxán A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), szerotonin (5-HT), hatására vazokonstrikció lép fel, mely a sérült terület véráramlását csökkenti. A szabaddá vált szubendotéliumhoz a vérlemezkék egy sejtrétegben kitapadnak (primer adhézió), majd aktiválódnak, granulumaik tartalmának felszabadításával a környező TCT-eket is aktiválják, megindul az aggregáció, valamint ezzel párhuzamosan a koagulációs kaszkád is működésbe lép. Az aktivált TCT-k számos koagulációs reakcióhoz biztosítják azt a katalitikus felszínt, mely a koagulációs folyamat kulcsát jelentő trombin keletkezéséhez szükséges, mely később a szolubilis fibrinogént fibrinné alakítja (1. ábra).



**1. ábra. A TCT aggregáció és a véralvadási kaszkád szerepe a trombus kialakulásában.**

Az érfal sérülése két nagy rendszer működését indítja el, szinte egy időben: a TCT-k aggregációját, valamint a véralvadási kaszkádot, melyek végül közösen hozzák létre az



alvadékat, ami fiziológiás körülmények között csökkenti, illetve megszünteti a vérzést, patológiás esetben azonban a kardiovaszkuláris betegségek két legnagyobb morbiditást és mortalitást előidéző következményének a miokardiális infarktusnak és a sztroknak a kialakulásához vezet.

### ***2. 1. 1. A trombocita (TCT) keletkezése és morfológiája***

A vérlemezkék a csontvelő megakariocitáinak citoplazmájából lefűződő, sejtmag nélküli szubcelluláris részecskék, melyek apró korongokként jutnak a keringésbe, ahol a teljes készlet 70%-a található, a maradék 30%-ot a lép raktározza. Naponta  $10^{11}$  db képződik belőlük, melyek 7-10 napig életképesek, majd a máj Kuppfer sejtjeiben, és a lépben lebomlanak<sup>19</sup>. Térfogatuk  $7 \pm 4.8$  fl, a nyugalomban levő emberi TCT mérete  $0.5 \times 3.0$   $\mu\text{m}$ . A diszkoid forma a plazmamembrán alatt található mikrotubulusokból álló orsónak köszönhető. Egészséges felnőtt ember vérének 1  $\mu\text{l}$ -ében 150-300000 db TCT van. Állandó mennyiségük szigorú kontroll alatt áll, melyet elsősorban a trombopoetin szabályoz. A keringő trombopoetin mennyisége nő, ha a trombocitaszám csökken, és ez a növekvő mennyiség stimulálja a csontvelői megakariociták keletkezését, érését és TCT produkcióját<sup>20</sup>. A megakariociták trombocita produkciója különlegesség a sejtbiológiában. Az első lépés a megakariociták dezoxiribonukleinsav (DNS) anyagának amplifikációja, ami egy extrém nagyságú poliploid sejtet eredményez, mely nagy mennyiségű TCT-specifikus anyagot kezd szintetizálni. A vérlemezkék kialakulása a megakariociták életidejének csak az utolsó 4-10 óráját veszi igénybe, mialatt a megakariocita citoplazmája feldarabolódik hosszú proplateletekre, amelyek feltöltődnek a specifikus organellum és granula tartalommal<sup>21</sup>, majd a kialakult korongok kikerülnek a keringésbe.

### ***-A trombocita felépítése:***

*A trombociták strukturálisan négy zónára oszthatók:*

a) ***Perifériás zóna:*** a külső sejtmembrán, az azt borító glikokalix, és a hozzá kapcsolódó részek alkotják. A TCT rendelkezik egy a felszínen nyíló, belső csatornarendszerrel (angol nevén: open canalicular system (OCS)). Ennek a belső hálózatnak a pórusait is ehhez a zónához sorolják. Az OCS-en keresztül a plazma anyagai bejuthatnak a TCT belsejébe és a TCT által termelt anyagok, kijuthatnak ezen a rendszeren keresztül a külső térbe. A TCT membránt burkoló glikokalix trombin, vWF, adrenalin, ADP, PAF, és még számos más receptort is tartalmaz. A TCT membrán gazdag glikoproteinekben (GP) (glükózaminoglikánok) melyek egyfelől receptorként is szolgálnak a TCT aggregációt fokozó anyagoknak, másfelől szubsztrátjai az adhéziónak (TCT kitapadás) és aggregációs reakcióknak. A glikoproteinek legtöbbje adhéziónak molekula, melyeket már, különösen a 80-as években, más sejtfeleségeken is leírtak. Közülük több nem csak a sejt felszínén, hanem az  $\alpha$ -granulumok membránjában is megtalálható. A perifériás zóna gazdag foszfolipidekben is, melyek a koaguláció fontos komponensei, mivel megfelelő felszín biztosítanak a koagulációs reakciókhoz, és iniciális szubsztrátjai az egyik legjelentősebb TCT agonista, a tromboxán  $A_2$  ( $TXA_2$ ) előállításáért felelős trombocita enzimeknek. Ezen felül a TCT membrán alkalmas a felszínről induló kémiai szignáloknak a sejt belsejébe történő eljuttatására is.

b) ***Szol-gél (strukturális) zóna*** a perifériás zóna alatt helyezkedik el, és a TCT vázát adja, maga a citoskeleton. Aktin és miozin filamentumokból alakul ki az a hálózat, mely körbefut a sejt egész felszíne alatt, és a TCT diszkoid alakját biztosítja, valamint kialakítja azt a kontraktilis rendszert, mely az aktiváció során részt vesz az TCT alakváltozásában, az állábak fejlesztésében, a belső kontrakcióban és a granulumok tartalmának felszabadításában. Ez a rendszer tartalmazza a TCT fehérjetartalmának 30-50%-át.

c) ***Organelumok zónája*** tartalmazza a granulumokat és más sejt-organelumokat, mint amilyenek a **mitokondriumok** (10-60/TCT), **lizoszómák** ( $\lambda$ -granulumoknak is nevezik, koagulációt segítő lítikus enzimeket szabadítanak fel), stb, melyek fontos szerepet játszanak

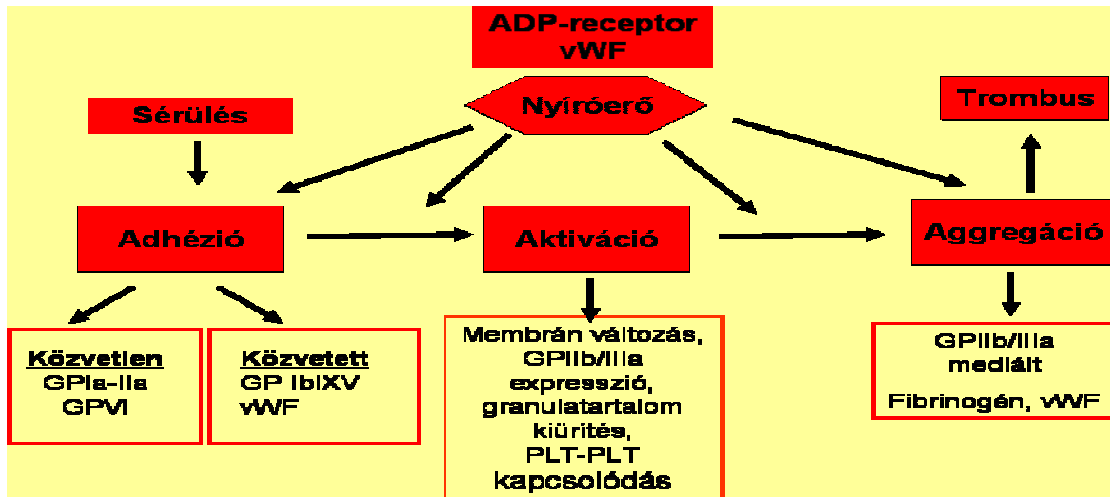
a metabolikus folyamatokban, enzimeket és a TCT funkció ellátásához szükséges anyagokat tárolnak. Az adenin nukleotidok két külön kompartmentben tárolódnak: a raktár, vagy szekréción készletek a denz granulumokban, a metabolikus készletek, pedig a citoplazmában. A **denz granulumok** (2-10 db/TCT) a nem metabolikus ADP-t és ATP-t, szerotonint és kalciumot tartalmazzák. Az  **$\alpha$ -granulumok** (méretük: 300-500 nm, mennyiségük: 20-200 db/TCT) olyan adhéziós proteinek tartalmazzák, mint a fibrinogén, fibronektin, von Willebrand faktor (**vWF**), trombospondin és vitronektin, de az endotélium sejteken kívül itt található még meg a P-selektin adhéziós transzmembrán molekula is, mely nyugalomban az  $\alpha$ -granulumok membránjában található és csak az aktiváció során transzlokálódik a plazmamembránba. Az  $\alpha$ -granulumok növekedési faktorokat (pl trombocita eredetű növekedési faktort (platelet derived growth factor (PDGF)), valamint „transforming” növekedési faktort (transforming growth factor TGF)) is tartalmazzák, de megtalálható bennük a koagulációs faktorok közül az V-ös, XI-es, IV-es faktor, a nagy molekulatömegű kininogén és a plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) is. Az  $\alpha$ -granulumok tartalmának felszabadulásához a denz granulumok  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalma szükséges.

**d) Membrán zóna:** A membráncsatornák két típusát tartalmazza. A denz tubuláris rendszer a 2-es típusú csatorna, ahol a kontrakcióhoz szükséges kalcium koncentráltan van jelen, és a prosztaglandin szintézist végző enzimrendszer is itt található. Ezek a csatornák nem érnek ki a felszínre, de helyenként összeolvadnak a már említett 1-es típusú membráncsatorna rendszerrel az OCS-el, mely a sejt fejlődése során marad vissza, amikor a TCT-kben körvonalazódnak a csatornák. Az egyszerű membrán nem vesz részt a megakariociták citoplazmájának lefűződésében, hanem ezek a membránból a citoplazmába gyűrődnek, és képezik az OCS-t.

### **2. 1. 2. A trombocita fiziológiás működése**

A TCT sejtmag nélküli testecske, nincs nukleáris, csak mitokondriális DNS-e, ugyanakkor rendelkezik a megakariocitából származó mRNS-ekkel. Durva endoplazmatikus retikuluma, poliriboszómája révén fehérjeszintézisre is képes. Nyugalomban minimális transzlációs

aktivitással rendelkezik. Bizonyos kórképekben azonban az  $\alpha$ -granulumokat és membrán glikoproteineket (GPs) is képes szintetizálni.



2. ábra. Az érsérülést követő TCT működés fázisai és a folyamatokban résztvevő fontosabb faktorok.

A TCT-k működésében három fázis különíthető el:

1. *Közvetlen és közvetett adhézió*, 2. *TCT aktiváció*, 3. *aggregáció* (2. Ábra).

Az adhézió és aktiváció egyik legfontosabb lépése a GPIIb/IIIa rejtett doménjeinek felszínre kerülése, melyek hozzáférhetővé teszik a trombocitát mindazon plazmafehérjék számára, melyek rendelkeznek az -arginin-glicin-aszparaginsav- szekvenciával (fibrinogén, fibronectin, vitronektin és a vWF) és hidakat tudnak képezni a trombociták között. A *közvetlen kölcsönhatás* a trombociták és a kollagén rostok között jön létre, úgy, hogy a TCT-k felszíni komplexeik (GP Ia-IIa és GPVI) révén közvetlenül kötődnek a kollagén rostokhoz. Ehhez az adhézióhoz járulékos faktorokra nincs szükség, létrejötte főleg alacsony véráramlási sebesség mellett jelentős, kialakulása lassú. Az ezzel párhuzamosan is meginduló *közvetett kölcsönhatás*ban egy további felszíni GP, a GP Ib/IX komplex vesz részt, amely a megakariociták és az endotelsejtek által is előállított, multimer szerkezetű óriásfehérje, a von Willebrand faktor (vWF) sejt felszíni receptora. A reakció főleg nagy áramlási sebesség mellett fontos, mivel az elsodródást kivédendő, a vWF a kollagén

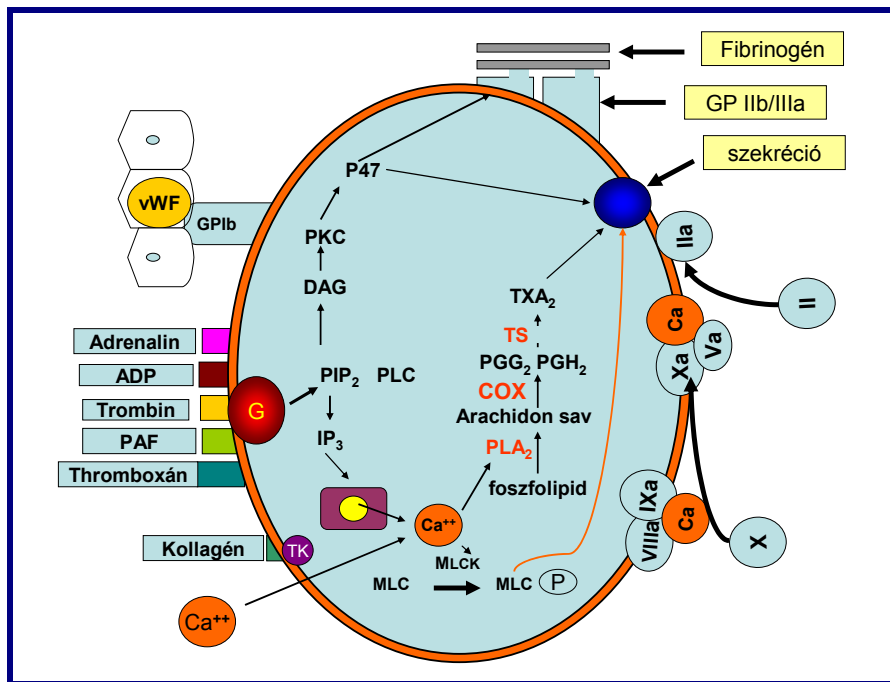
rostokkal együtt rögzíti a trombociták rétegét a sérülés helyén. Az adhéziós folyamatokat követi a *TCT aktiváció*, a granulák tartalmának exocitózisa, és szekréciója folytatódik. A trombociták egymáshoz és az érfalban levő endoteliális sejtekhez az adhéziós receptorokon keresztül, vagy integrineken keresztül kapcsolódnak, létrehozva ezzel a hemosztatikus „dugót” melynek kialakításában végül a fibrin is részt vesz. A reakció további trombocitákat vonz a sérült felszínhez. A stimulált trombocitában aktiválódó  $PIP_2$  és PLC hatására keletkező  $IP_3$  a  $Ca_2^+$ -raktárak kiürülését eredményezi, mely a TCT magas aktin és miozin koncentrációja révén kontrakciót indít el. A TCT állabakat fejleszt, és tovább erősíti a képződött trombocita rögöt. Ez a granulák tartalmának szekréciójához vezet, ilyenkor alakul át a lazán kapcsolódó TCT halom egységes „masszává”. A megváltozott TCT felületek optimális felszínt és körülményeket biztosítanak a koagulációs kaszkád egyes elemeinek, melyek a folyamatot átvezetik a másodlagos hemosztázisba.

*-Az aggregációért felelős biokémiai folyamatok:*

A trombocita aggregáció legfontosabb aktivátorai, egyebek között, az adenosin difoszfát (ADP), kollagén, trombin, 5-hidroxitriptamin (5-HT) és a tromboxán  $A_2$  ( $TXA_2$ ). Az aktivátorok többsége az aktiválódott trombocitákból származik, bár a kollagén a sérült érfal felszínén jelenik meg, míg a trombin az alvadási kaszkád terméke.

A trombocita aggregáció számos sejtfelszíni receptoron keresztül indulhat el. Az extracelluláris nukleotidok, mint az ADP, mely a denz granulumokból szabadul fel aktivációkor, a purin ( $P_2$ ) receptorokon keresztül fejti ki hatását. A TCT felszínén háromféle  $P_2$  receptor van:  $P_2X_1$ ,  $P_2Y_1$  és a  $P_2Y_{12}$ . Aktivációjuk hatására csökken az intracelluláris cAMP-tartalom, és fokozódik az aggregábilis<sup>22, 23</sup>

A TCT direkt, vagy indirekt módon képes interakcióba lépni a legkülönbözőbb membránproteinekkal, elsősorban a kollagénnel<sup>24</sup>. A trombocita és a subendoteliális kollagén kapcsolat a von Willebrand faktor (vWF) segítségével valósul meg, amely „shear-stressz” esetén megjelenik az artériák és kis arteriolák falában, és szimultán módon kötődik a kollagénnel és a TCT felszíni kötőhelyeihez (3. Ábra).



**3. ábra A trombocita-aggregációban szerepet játszó sejtszintű folyamatok összefoglalása**

**COX:** ciklooxygenáz, **TS:** tromboxán szintáz, **TXA<sub>2</sub>:** tromboxán A<sub>2</sub>, **DAG:** 1,2-diacilglicerol, **IP<sub>3</sub>:** inozitol-1,4,5-trifoszfát, **PAF:** TCT aktiváló faktor, **MLC:** „myosin light chain” kináz, **PIP<sub>2</sub>:** foszfátidilinozitol-4,5-biszfoszfát, **PLA<sub>2</sub>:** foszfolipáz A<sub>2</sub>, **P47** fehérje: Plextrin.

Az induktorok többsége Gq protein által működtetett receptorhoz kötődik, kivételt képez ez alól a kollagén, és bizonyos mértékig az ADP. A folyamat legfontosabb komponense az arachidonsav kaszkád TCT specifikus terméke, a TXA<sub>2</sub>. Emellett még foszforilálódik a vérlemezkék citoplazmájában levő P47 fehérje, ami a forbolézterek által indukált foszforiláció fő célpontja a vérlemezkékben, és más hematopoetikus sejtekben, ahol is a plazmamembránba transzlokálódva adhéziós funkció kialakításában vesz részt.

A **3. ábrán** szereplő folyamatokon felül, a trombocita működés regulációjában egy önszabályzó aggregáció gátló rendszer is működik. Ennek kulcseleme az endoteliális nitrogén monoxid szintáz, mely az endotéliumban és a trombocitában is működik. Aktivációját az intracelluláris cAMP és cGMP szint növekedése fokozza. Ezeknek a ciklikus nukleotidoknak a keletkezésére számos tényező hatással van, így például az arachidonsav lebontása során az endoteliális sejtekben képződő prosztaciklin is.

### **2. 1. 3. A trombocita működése patológiás körülmények között:**

Ismert tény, hogy a reziduális TXA<sub>2</sub> generáló kapacitás kevesebb, mint 5% is elegendő a tromboxán függő trombocita aggregáció fenntartásához<sup>25</sup>. Az is bizonyított, hogy in vitro körülmények között a gátlás alatt álló trombocita-populáció 2,5%-ának intakt trombocitára történt cseréje után teljes aggregáció érhető el<sup>26</sup>.

A tromboxán szintézis plasztikus növekedését írták le, többek között instabil anginában, ami arra utal, hogy a vérlemezkék aggregációját a spontán iszkémia is fokozza<sup>27,28</sup>.

ADP-függő aggregáció stabil anginában fokozottabb, és az akut koronária szindróma, valamint az angina velejárója az is, hogy az NO donorok aggregáció gátló hatására gátolt, vagy meg is szűnik<sup>29,30</sup>. Érelmeszesedés, koszorúsér betegség, cukorbetegség, magasvérnyomás betegség, hiperkoleszterinémia, dohányzás fokozott trombocita aggregációhoz vezet<sup>31</sup>.

Diabéteszes betegek koszorúsér betegsége extenzivebb és súlyosabb, mint ahogy az a metabolikusan egészséges pácienseknél tapasztalható. Közöttük, a kardiovaszkuláris események okozta halálozás háromszor gyakoribb<sup>32,33,34,35,36,37,38,39</sup>.

Az endotélium normális esetben kontroll alatt tartja a TCT-k reaktivitást a COX<sub>2</sub>, a PGI<sub>2</sub>, illetve a prosztanoid szintetizáló rendszer egyensúlyán keresztül. A gyulladásban levő endotélium a trombociták kitapadását segíti elő, melyhez endoteliális oldalon az intracelluláris adhézións molekula (intercellular adhesion molecule: ICAM-1), és az  $\alpha_2\beta_3$  integrin sejtfelszíni expressziója is hozzájárul. Az adhézión során az aktivált trombociták inflammatórikus és mitogén faktorok egész arzenálját juttatják mikrokörnyezetükbe, befolyásolva ezzel az endoteliális sejtek kemotaktikus, adhezív és proteolitikus sajátosságait. Patológiás esetben a TCT gyorsan reagál az endotélium sejteinek változásaira (plakk ruptúra, „fatty streak”) és a szubendoteliális rétegek expozíciójára. Így nem meglepő, ha a hiperkoleszterinémiás betegek trombocitái diszfunkcionálisak. Már a korai tanulmányok is kimutatták, hogy familiáris hiperkoleszterinémiás betegek trombocitái egy sor agonistára érzékenyebben reagálnak<sup>40</sup>. Hiperkoleszterinémiás betegek magas trombomodulin szinttel rendelkeznek (ugyanazt a jelenséget esszenciális hipertenzióban is leírták<sup>41</sup>) és más

aggregációs markereik mennyisége is több mint az egészséges kontroll egyéneké, valamint trombin képzésük is fokozott<sup>42</sup>.

A hiperkoleszterinemiás betegek megváltozott TCT-funkciójának felfedezése számos vizsgálat elindítását eredményezte, mely ahhoz a felismeréshez vezetett, hogy az LDL koleszterin prokoaguláns hatású<sup>43,44</sup>, és az oxidált LDL hatására a vérlemezkék alakváltozást szenvednek, és állabakat fejlesztenek<sup>45</sup>. Siess és munkatársai szerint az LDL oxidációja során keletkezett lizofoszfátidsav az a szekvencia, ami a változásért felelős<sup>46</sup>.

Összefoglalóan megállapítható, hogy számos betegség jár együtt TCT hiperaggregabilitással: stabil- és instabil angina pectoris, miokardiális infarktus, hipertónia, diabétesz, hiperkoleszterinémia, hiperhomociszteinémia, TIA, sztrók, perifériás érbetegségek, pitvar fibrilláció és a koszorúeret áthidaló átültetés (coronary artery bypass graft (CABG)). Az említett esetekben a trombociták számára olyan környezet alakul ki, melyben a fiziológias szabályzó mechanizmusok nem, vagy eltérően működnek. A megemelkedett  $\beta$ -thrombomodulin szint felgyorsítja a vérlemezkék „turnover”-ét, az ooxidált alacsony denzitású lipoprotein (oxLDL) fokozza az aggregabilitásukat. Az aktiválódott fehérvérsejtek fokozott ciklooxygenáz enzim (COX) aktivitása és tromboxán A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) termelése, „felülírja” a trombocitákban a nem szteroid gyulladásgátló (Non-steroidal anti-inflammatory drug: NSAID) szerekkel elért COX gátlást, hiszen ezek a sejtek, a sejtmag nélküli TCT-vel szemben, képesek a COX enzimek újbóli szintetizálására<sup>47</sup>.

A trombocita funkció tanulmányozása a vaszkulaturát érintő kórképekben, ígéretes prevenciós és terápiás eredményeket hozhat, ezért is vállalkoztunk jelen munkánkban a TCT funkció tanulmányozására.

## **2. 2. Az iszkémia reperfüziós károsodások biológiája**

Az I/R károsodás releváns probléma trombózis, embólia, miokardiális infarktus<sup>48</sup>, sztrók<sup>49</sup>, koszorúsér „bypass” műtétek<sup>50</sup>, ballon angioplasztika<sup>51</sup>, trombolízis<sup>52</sup>, alsó végtagi revaszkularizációs beavatkozás<sup>53,54,55</sup> és minden olyan eset után, amikor az érpálya egy szegmense kizáródik a keringésből (vagy sebészeti úton kizárják), majd újból megnyílik,



illetve megnyitják<sup>56,57</sup>. Az érpálya elzáródását és következményes iszkémiát okozhatja embólia (trombus, tumor, zsír, idegen test), sztenotikus arteriopátia, vagy trauma következtében kialakuló artériás trombózis, artéria spazmus, külső kompresszió, de létrejöhet anatómiai rendellenesség, vagy trauma következtében is. Az erek ellátási területén az elzáródás ideje alatt iszkémia és acidózis alakul ki, mely az érintett terület sejtjeit súlyosan károsítja, vagy elpusztítja. A megmaradt szövetek alkalmazkodnak az oxigénhiányhoz, metabolizmusukat aerobról anaerobra állítva át, de végül ez a stratégia is szövetkárosodáshoz és pusztuláshoz vezethet. Az akut és a krónikus iszkémia során a szöveti károsodás mértéke függ a hipoxia időtartamától, az érintett szövetek mennyiségétől, és a páciens szisztémás artériás nyomásától. Az elzáródott erekben a véráramlás helyreállítása mégsem veszélytelen, mivel ez elsősorban az érszakasz ellátási területén, de a szervezet egészére nézve is, térfogati, nyomási és metabolikus terhelést eredményez. A molekuláris patofiziológiás kaskád fő komponense a neutrofil aktiváció, és az ennek következtében megnövekedett szabadgyök produkció (reaktív oxigén és nitrogén species: ROS és NOS), valamint az érintett sejtekben az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint növekedése. A reperfüzió korai periódusában gyorsan emelkedik a proinflammatorikus citokinek (tumor nekrosis faktor alfa ( $TNF\alpha$ ) és interleukin-6 (IL-6) szintje<sup>58</sup>. Ezek együttesen fenyegetik a kulcsfontosságú makromolekulák (proteinek, lipidek és nukleinsavak) károsítása révén az egész szervezet integritását<sup>59</sup> (**4. ábra**). Az ún. „oxigén paradoxon”, ennek a folyamatnak egyik legfontosabb patológiás velejárája, melynek kialakításában az oxigén szabadgyökök jelentős szereppel bírnak<sup>60</sup>. A folyamat kimenetelét nagymértékben befolyásolja az antioxidáns-prooxidáns egyensúly megbomlásának mértéke (**5. ábra**).



**4. ábra: Az antioxidáns/prooxidáns egyensúly** (Róth E, Hejjet L : Oxygen free radicals in heart disease. In: Cardiac Drug Development Guide. Ed. M. K. Pugsley. Humana Press Inc. Totowa NJ. 2003: 47-66.)

A szervezet fiziológias működéséhez szükséges antioxidáns-prooxidáns egyensúly külső tényezők, különböző kórfolyamatok hatására történő megbomlása fokozott szabadgyök produkcióhoz vezet, mely a létfontosságú makromolekulák károsodása miatt az egész szervezet integritását fenyegeti<sup>61</sup>.

A keringés újraindulásával tovább fokozódó magas intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint a mitokondriumokban csökkenti az oxigén fiziológiásan domináló négyelektronos redukcióját. A normális körülmények között 2-3 %-ban jelen lévő egyelektronos redukció vízzé a többszörösére fokozódik. Így nagy mennyiségű, reakcióképes oxigén vegyület (ROS): szuperoxid gyök ( $O_2^-$ ), hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és hidroxil gyök ( $OH^\cdot$ ) keletkezik, melyek létfontosságú enzimek és receptorok működését befolyásolják, többek között a többszörösen telítetlen zsírsavak károsítása révén fokozott lipidperoxidációt indítanak el, zsírsav peroxil gyökök és lipid peroxidok képződnek. Az önfenntartó reakció eredményeként lipid-lipid, lipid-protein, protein-protein diszulfid híd keresztkötések jönnek létre, illetve protein- és zsírsavhasadás történik. A végeredmény a kompartmentalizációt biztosító membránok integritásának elvesztése, a kontraktilis apparátus károsodása, a mitokondrium membrán energiatermelésének változása és az

iontranszport működés sérülése. A károsodást fokozza a lipázok által felszabadított, de a légzési láncba bekapcsolódni nem tudó zsírsavak detergens hatása. A szövettani képet jellemzi a mitokondriális ödéma, a kromatin összezsugorodás és a glikogén granulomok depléciója.

### ***2. 2. 1. Mitokondriális légzési lánc és mikroszómák***

A mitokondrium igen sérülékeny rendszer. DNS állománya veszélyeztetettebb, mint a sejtmagé, mivel nem kapcsolódik fehérjékhez, és nem rendelkezik olyan hibajavító mechanizmusokkal sem, mint a mag DNS. A mitokondriumot érintő változások pedig nem csak az adott sejt, hanem az egész szervezet működésére kihatnak, mivel a mitokondriumok termelik a sejtfunkciók fenntartásához szükséges energiát<sup>62</sup>.

A szabadgyökök legnagyobb hányada a mitokondriális elektrontranszportláncból és mikroszómális citokrom P-450 rendszer által generálódik.

### ***2. 2. 2. A nitrogén-monoxid és szuperoxid egyensúly***

A mikrovaszkuláris apparátus endoteliális sejtjeiben megváltozik a nitrogén monoxid: szuperoxid ( $\text{NO} : \text{O}_2^-$ ) közötti egyensúly az I/R indukálta gyulladás következtében. Fiziológias körülmények között a NO képződés meghaladja a szuperoxid produkciót, és az endotélium sejtjei által termelt NO a simaizom sejtbe jutva fokozza a szolubilis guanilát cikláz aktivitását, ezáltal növeli a cGMP koncentrációt, így gátolja a simaizom kontrakciót, illetve fokozza a relaxációt<sup>63</sup>.

Az NO, részben az adhézións molekulák gátlása révén, endogén gátló faktora a leukocita aktivációnak és kemotaxisnak<sup>64</sup>. Az oxidatív burst gátlásával az NO csökkenti a ROS termelést és ezzel a trombociták aggregációját, valamint a PAF képződését az endoteliális sejtekben. Ezzel az endotélium sejt – neutrofil kapcsolat fő induktorát befolyásolja<sup>65</sup>. A szuperoxid és a nitrogén-monoxid reakciója során keletkező peroxinitrit a szövetkárosodás egyik fő mediátora. A reperfüzió során keletkező  $\text{O}_2^-$ , melyet nagy mennyiségben a NADPH oxidáz termel, az endoteliálisan képződő NO-t gyorsan semlegesíti. A csökkent endoteliális NO produkciót a megnövekedett mikrovaszkuláris permeabilitás jellemzi a posztkapilláris

venulákban. Az I/R az endotélium dependens aktív vazodilatátor tónus csökkenésével jár, amiért az NO vazodilatátor hatásának elmaradása a felelős.

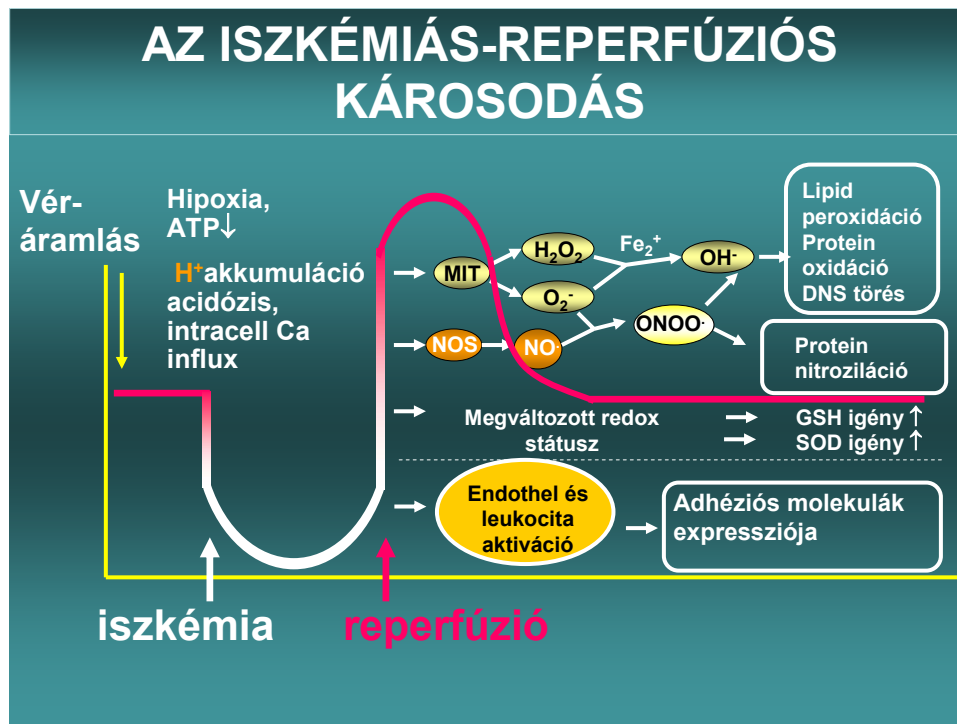
### ***2. 2. 3. A xantin-oxidáz rendszer***

A xantin-oxidáz (Xox) az endotéliumban is megtalálható enzim, jelentős szerepe van a reperfüziós károsodás és endotélium diszfunkció létrehozásában<sup>66</sup>. Valójában oxidoreduktáz enzim, mely az oxidációs folyamathoz elektron akceptorként oxigént használ<sup>67,68,69</sup>. A purin tartalmú nukleotidok (adeninozin, guaninozin) degradációjának sebesség meghatározó lépését katalizálja, úgy, hogy lebontási folyamat során keletkező hipoxantin átalakul xantinná, majd a reakció végtermékeként húgysav képződik. Az utóbbi időben még több figyelmet fordítanak a Xox működésében bekövetkező változásokra, ugyanis azt feltételezik, hogy kiemelt szerepe van az I/R-t követő távoli szervek károsodásában is, amely a magas enzimértékekkel összefüggésbe hozható<sup>70,71,72</sup>. Az utóbbi feltevést támasztja alá az is, hogy a Xox gátlásával (Allopurinol) mérsékelni lehet a távoli szervkárosodás mértékét<sup>73,74</sup>.

### ***2. 2. 4. Egyéb szuperoxid források:***

A ROS fontos forrásai még a kemoattraktánsok és citokinek által aktivált neutrofil sejtek, amelyek a nikotinamid adenin dinukleotid foszfát oxidáz (NADPH-oxidáz) tartalmuk révén a molekuláris oxigén redukcióját végzik hidrogén-peroxiddá és szuperoxiddá. A „respiratory burst”-ként ismert jelenség során az aktivált neutrofil sejtek oxigénfogyasztásuk 90%-át szuperoxid gyök képzésére fordítják<sup>75,76</sup>. A granulocita mieloperoxidáz enzime révén katalizált folyamatban hipoklórossavat generál a hidrogén-peroxid felhasználásával. A szuperoxid gyök fő károsító hatását a folyamatban keletkező hipoklórossavon (HOCl) keresztül fejt ki. A hipoklórossav erőlyes oxidáló és klorináló vegyület. Primer aminokkal gyorsan reakcióba lép, így N-klóraminok keletkeznek, amelyek a hidrogén-peroxiddal egyenértékű lipidoldékony oxidálószer. A neutrofil eredetű hidrogén-peroxid és a monoklóraminok serkentik a vérlemezke aktiváló faktor (platelet activating factor: PAF) képződését, ami fokozza a leukocita adhéziót is<sup>77</sup>. A hipoklórossav a szulfhidril csoportok

oxidációja, hem tartalmú proteinek, így citokrómok inaktivációja, aminosavak, és proteinek degradációja révén hoz létre további károsodást<sup>78</sup>.



**5. ábra: Az iszkémia/reperfúziós folyamatok összegrzése.**

MIT: mitokondrium, O<sub>2</sub><sup>-</sup> szuperoxid anion, NOS: nitrogénmonoxid szintáz, ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hidrogén peroxid, OH<sup>•</sup>: hidroxil gyök, GSH: redukált glutation, SOD: szuperoxid dizmutáz. A véráramlás megszűnése a szöveti hipoxiát, az ATP-szint csökkenését, acidózist és Ca<sup>2+</sup> kiáramlást okoz, melyek együttesen károsítják a keringésből kizárt szövetek integritását. A keringés újraindításával a megnövekedett oxigén túlkínálat reaktív oxigén intermedierek felszabadulását eredményezi, mely az antioxidáns enzimek iránti igényt megnöveli. A keringés újraindulása a keringő sejtekben és a környező szövetekben gyulladós reakciókat indítanak el, melyek későbbi eszkalációja az egész szervezetet érintheti.

### 3. A VIZSGÁLATOK CÉLJA:

Jelen dolgozat fókuszában a perifériás artériás érbetegek trombocita funkciója, valamint prooxidáns/antioxidáns státusának vizsgálata áll. Vizsgálataink első sorozatában ezt sürgősségi és elektív érműtétek perioperatív időszakában monitoroztuk, és összefüggéseket kerestünk a trombocita funkció változása, valamint a műtétet követő antioxidáns/prooxidáns státuszban bekövetkező eltérések között. Ebbe a vizsgálatba 12 sürgősségi és 10 elektív érműtetre kerülő beteget vontunk be. Az alapbetegséget mindkét csoportban számos társbetegség is kísérte (magasvérnyomásbetegség, diabétesz mellitus, dohányzás okozta tüdőkárosodás). Ezért külön vizsgálatban tanulmányoztuk olyan perifériás artériás érbetegek trombocita funkcióját és antioxidáns prooxidáns státusát (összesen 46 beteg), akiknek egyestípusú (T<sub>1</sub>DM) (24 beteg), illetve kettestípusú diabétesz mellitusz (T<sub>2</sub>DM) (22 beteg) is társult a PAD mellé.

I. Vizsgálataink *első sorozatában* a következőkre kerestünk választ:

- 1., A több órája fennálló, az alsó végtagot érintő iszkémia miatt sürgősségi (**Akut**) revaszkularizációs verőér műtétre, illetve előre tervezett rekanalizációs műtétre kerülő betegek (**Elektív**) trombocita funkciója és antioxidáns/prooxidáns státusza különbözik-e egymástól?
- 2., Ha igen, hogyan érinti, és milyen mértékben befolyásolja azt az iszkémia ideje?  
A műtét után mikor, és milyen mértékben áll helyre a fiziológiás trombocita funkció a két különböző betegcsoportban?
- 3., A trombocita funkció rendeződése együttjár-e az oxidatív stressz megszűnésével?

II.. Vizsgálataink *második sorozatában* célul tűztük ki, hogy

- 1., megvizsgáljuk a trombocita funkció és az antioxidáns/prooxidáns státusz változását, és ezek esetleges egymásra hatását 1-es és 2-es típusú, diabéteszben szenvedő perifériás artériás érbetegeken.

2., hogy választ kapjunk arra, vajon a hosszú ideje fennálló T<sub>1</sub>DM és T<sub>2</sub>DM esetén van-e a diabétesz típusától függő különbség a trombocita funkcióban és az antioxidáns/prooxidáns státuszban perifériás artériás érbetegségeken.

#### 4. A TROMBOCITA FUNKCIÓ ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ MONITOROZÁSA ALSÓVÉG TAGI REVASZKULARIZÁCIÓS MŰTÉTEK SORÁN

##### 4. 1. Beteganyag és vizsgáló módszerek

###### 4. 1. 1. A vizsgálatokba bevont betegek

A dolgozatban bemutatott vizsgálatokat a nemzetközi etikai szabályoknak megfelelően, a Magyar Egészségügyi Minisztérium 35/2005 (VIII.16) rendeletét betartva, a Pécsi Orvostudományi és Egészségtudományi Központ Regionális Kutatás-Etikai Bizottsága engedélyével (engedély száma: 2498) végeztük. A betegek a műtétet megelőzően, szóbeli és írásbeli tájékoztatást kaptak, ezt követően írásbeli beleegyezésüket adták a vizsgálathoz. Az egészséges önkéntesek, akik az Országos Vérellátó Szolgálat Pécsi Regionális Központjának véradói voltak, szintén írásban egyeztek bele a vizsgálatokba.

A vizsgálatban résztvevő betegek a Baranya Megyei Kórház Sebészeti Tanszékén kerültek műtétre, a laboratóriumi méréseket a Sebészeti Oktató és Kutató Intézetében végeztük<sup>79</sup>.

Prosperatív, randomizált, nyílt tanulmányunk első csoportjába felnőtt, kritikus végtagiszkémia miatt alsó végtagi revaszkularizációs műtétre kerülő beteget vontunk be (**Akut, n = 12; 9 férfi, 3 nő**). A betegek átlagéletkora  $58,1 \pm 7,3$  év volt. Az iszkémia oka 8 esetben tiszta embólia (egy iliaca, egy aorto- biiliacalis, hat a femoralis superficialis-profunda oszlásában lévő embolus), egy esetben infrarenalis aorta aneurizma ruptura, három másik esetben, pedig femoralis szintű akut artériás trombózis volt. A rekanalizáció embólia esetén Fogarty féle ballonkatéterrel történt<sup>80</sup>. Az aneurizma ruptura esetén endotubációt végeztek, míg az akut artériás trombózis esetében lokális trombandarterektomia, és foltplasztika volt a megoldás.

A másik betegcsoportot obliteratív artériás betegség következtében a femorális artéria szuperficiális régiójában kialakult, angiográfiai vizsgálatokkal és Doppler méréssel igazolt végtagiszkémia miatti elektív műtetre kerülő betegek alkották (**Elektív; n=10, 6 férfi és 4 nő**) átlagéletkor:  $61,2 \pm 9,72$  év). Az iszkémia ideje (az erek keringésből történő kizárása)  $42,8 \pm 16,3$  percig tartott.

Mindkét beteg-csoportban a perifériás artériás érbetegség mellett számos társbetegség is jelen volt és valamennyi beteg az aggregáció gátló gyógyszer mellett, legalább három más gyógyszert is rendszeresen szedett. A kórházban töltött idő alatt a két betegcsoport hasonló antikoaguláns és aggregáció gátló terápiában részesült. Valamennyi beteg rendszeresen szedett Aszpirint (minimum 75 mg), a beválogatás előtt. A kórházban tartózkodásuk teljes ideje alatt a betegek mindegyike kis molekulatömegű heparin kezelésben részesült. A műtéti beavatkozás alatt frakcionálatlan heparin kezelést kaptak. A **Kontroll** csoport a vizsgálatokba bevont **10 egészséges önkéntes** véradó volt. A betegek társbetegségeit az **1. Táblázatban** foglaltuk össze, míg legfontosabb gyógyszereiket a **2.Táblázatban** összegeztük.

**1. Táblázat: A vizsgálatba bevont perifériás érbetegek társbetegségei a műtét előtt:**

<b>Társbetegségek</b>	<b>Akut</b>	<b>Elektív</b>
Hipertónia	<b>6/12</b>	<b>8/10</b>
Iszkémiás szívbetegség	<b>3/12</b>	<b>4/10</b>
Diabétesz mellitusz	<b>4/12</b>	<b>5/10</b>
Iszkémiás szívbetegség	<b>3/12</b>	<b>4/10</b>
Tüdő szövödmények	<b>4/12</b>	<b>4/10</b>
Dohányzás	<b>5/12</b>	<b>4/10</b>



## 2. Táblázat: A vizsgálatba bevont perifériás érbetegek gyógyszeres kezelése:

<b>Gyógyszercsoport</b>	<b>Akut</b>	<b>Elektív</b>
Aggregáció gátló (Aszpirin protect vagy Astrix)	<b>12/12</b>	<b>10/10</b>
Antikoaguláns (perioperatív))	<b>12/12</b>	<b>10/10</b>
Antihipertenzív	<b>6/12</b>	<b>8/10</b>
Antidiabeticum	<b>4/12</b>	<b>5/10</b>
Egyéb	<b>12/12</b>	<b>10/10</b>

### ***4. 1. 2. Mintavételi protokoll***

A vizsgált paramétereket vénás vérből határoztuk meg, közvetlenül a műtét előtt, majd a műtétet követően 2 és 24 óra múlva, illetve 1 hét után. Az egészséges csoportban csak egy vérmintát vettünk. A trombocita funkcióra vonatkozó méréseket, a vérvételt követő 3 órán belül elvégeztük. A vérkép adatokat (vörösvértest, fehérvérsejt, trombocita szám, hematokrit és hemoglobin érték) Minitron (Tip Hu V 02, Gysz: RS-232) automata készülékkel határoztuk meg.

### ***4. 1. 3. A trombocita funkció vizsgálata PRP-ben***

A trombocitákat differenciál centrifugálással különítettük el, alacsony fordulatszámon (120 g). A képződött felülúszó a vérlemezkében gazdag plazma (PRP). Ezt eltávolítva (ügyelve arra, hogy kizárólag trombocitákat izoláljunk), a maradékot magas fordulatszámon tovább centrifugáltuk (1000 g). A keletkezett felülúszó a trombocita szegény plazma (PPP), mely a mérések kontrolljául szolgált.

A méréseket négycsatornás Carat TX4 aggregométerrel (Carat Diagnostic kft, Budapest), a minták folyamatos kevertetése mellett (37 °C, 1000 rpm) mellett végeztük, 450-450 µl

térfogatban, a készülék használati utasítását követve. A meghatározás alapját G. Born optikai denzitás mérésen alapuló módszere képezte<sup>81</sup>. A PRP-ben az optimális trombocita számot (200000-250000/ $\mu$ l) szükség esetén PPP hozzáadásával biztosítottuk. A PPP transzmisszióját 0%-nak, a PRP-ét 100%-nak véve adtuk meg az egyes mintákban az aggregáció mértékét, a maximális aggregáció (100%) %-ában kifejezve. Induktorként adenozin difoszfátot (ADP 5 és 10  $\mu$ M) és kollagént (2  $\mu$ g/ml) használtunk. A megadott normálérték az ADP (5 és 10  $\mu$ M) esetében 62-92%, a kollagén (2  $\mu$ g/ml) esetében 64-92%. Vizsgálatainkban az egyes induktorok által indukált maximális aggregációt és a mérés végén (8 perccel az indukció után) mért értéket vettük figyelembe.

#### **4. 1. 4. Trombocita funkció vizsgálata teljes vérben:**

Teljes vérben az Ingerman-Wojenski, és Silver által<sup>82</sup> kifejlesztett, impedancia mérésen alapuló módszerrel vizsgáltuk a trombocita aggregációt, Chrono-Log típusú lumino-aggregométerrel (Chrono-Log Corporation, USA), folyamatos kevertetés mellett (400 rpm). A mérésekhez trinátrium citráttal alvadásgátolt, fiziológias sóoldattal 1:1 arányban hígított (0.5 ml:0.5 ml) vénás vért használtunk. Az aggregációs görbe kialakulását az induktor hozzáadása után 6 percig követtük kétsatornás direktíró készülékkel, 1 cm/perc papírsebesség mellett. Az aggregáció mértékét Ohmban fejeztük ki, a készülék belső kalibrációját használva viszonyításként, melyet minden esetben 20  $\Omega$  = 40 mm-re állítottunk be. Induktorként ADP-t (5  $\mu$ M) és kollagént (2  $\mu$ g/ml) használtunk.

#### **4. 1. 5. Prooxidánsok vizsgálata:**

##### **- Szabadgyök termelés meghatározása teljes vérből**

A gyulladáshoz vezető reakciók fő szabadgyök forrásai az aktivált fehérvérsejtek, elsősorban a neutrofil granulociták. A szabadgyök termelést teljes vérben vizsgáltuk, kemiluminometriás, kinetikus módszerrel lumino aggregométer segítségével (Chrono-Log 560-VS, Chrono-Log Corp. USA). A szabadgyök képződést 0,2  $\mu$ g/ml forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) (Sigma-Aldrich kft, Budapest), indukáltuk, miután regisztráltuk a minta háttér

lumineszcenciáját. A keletkezett szabadgyököket luminol (Boehringer Mannheim GmbH, Németország; 3,33 µg/ml) hozzáadásával tettük mérhetővé, az értékeket kétsatornás direktíró (Chrono-Log, USA) segítségével rögzítettük. A kapott diagrammok alapján meghatároztuk az indukció és aktiváció között eltelt időt („lag time” (sec)), a szabadgyök termelési görbe felszálló szárának meredekségét („slope”; arbitrális egység/sec) és a gyöktermelés fehérvérsejt számra vonatkoztatott maximumát (maximális szabadgyök produkció: arbitrális egység/mm<sup>3</sup>-enkénti fehérvérsejt szám). Valamennyi paraméter a fehérvérsejtek aktiváltságának mértékét jellemzi.

#### **- Malondialdehyd (MDA) meghatározás**

A vér és a plazma MDA tartalma a lipidperoxidáció leggyakrabban mért biológiai markere, mely főként a membrán többszörösen telítetlen zsírsavainak peroxidációját jelzi. Vizsgálataink során teljes vérben és plazmában is megmértük az MDA szintet.

#### **- MDA mérés teljes vérben:**

Mintaelőkészítés: tiobarbitursav (TBA, Renal) 10%-os perklórsavban (Reanal) készített túltelített oldatát háromszoros mennyiségű 20 %-os triklórecetsavval (TCA, Carbo Erbe) elegyítettük. Az így kapott 1:3 arányú elegy 4,5 ml-éhez 0,5 ml alvadásban gátolt vért (EDTA) adtunk. A keletkezett mintát forrásban lévő vízfürdőben 20 percig főztük, majd jégben gyorsan hűtöttük és 4000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk (Universal 3RF, Hetterich Zentrifugen). A felülúszót 532 nm-en, a TBA-TCA elegy ellenében fotometráltuk (Milton Roy Spectronic 6001 spektrofotométer). A minták koncentrációját tetrametoxipropán standardoldatok mérése alapján felvett (nmol/ml) standardgörbe alapján határoztuk meg.

#### **- Plazma MDA meghatározás:**

Az EDTA-val alvadásgátolt vért 10 percig 4000 rpm-en centrifugáltuk, majd a keletkezett plazma 300 µl-ét elegyítettünk 50 µl 0,2 %-os Na-dodecil szulfáttal (SDS), 600 µl (pH 3,5) acetát pufferrel és 50 µl 200 µM-os EDTA-val, és alapos keverés után 1,5 ml 0,67%-os tiobarbitursavat (TBA) adunk hozzá. Ezután 90 °C-on 60 percig vízfürdőben tartottuk,

majd csapvízzel hűtöttük, miután 2 ml 99,5%-os butanollal elegyítettük. Vortexszel kevertettük és 10 percig 5000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót 535 nm-en fotometriásan mértük, és az MDA koncentrációsorral felvett kalibrációs egyenes alapján kiszámítottuk a koncentrációt.

*- Mieloperoxidáz meghatározása plazmában:*

Na-EDTA-val antikoagulált vért 2000 g-vel centrifugáltunk és a keletkezett plazmából 200 µl-t 1 ml munkaoldattal (0,1 M Na-citrát (pH=5,5), 10,9 ml; 0,05% Triton-X 100 5 µl; 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ml; 0,1%-dianizidine 100 µl). elegyítettünk. A keletkezett oldatot 37 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd 1 ml 35% perklórsavat adtunk hozzá. Ezután 2500-as fordulatszámra centrifugáltuk, és a felülúszót a munkaoldattal szemben 560 nm-en, Milton Roy Spectronic 6001 fotométráltuk. A plazma mieloperoxidáz szintet nM/l-ben adtuk meg.

#### **4. 1. 6. Antioxidánsok vizsgálata:**

*- Szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás mérése hemolizátumban*

A szuperoxid dizmutázok a legősibb fémtartalmú endogén antioxidáns enzimek, melyek rezet, cinket, mangánt, vasat és nikkelt tartalmazhatnak kofaktorként. Prokarióta és eukarióta szervezetekben egyaránt megtalálhatók. A SOD<sub>1</sub> (Cu-Zn SOD) az eukarióta szervezetek citoplazmájában található, míg a SOD<sub>2</sub> (Mn-SOD) a prokarióta szervezetekre jellemző, de megtalálható az eukarióta szervezetek mitokondriális mátrixában. A SOD<sub>3</sub> emberben extracelluláris, rezet és cinket használ kofaktorként, csak úgy, mint a SOD<sub>1</sub>. A SOD<sub>1</sub> dimerként fordul elő, míg a másik két forma trimer. Egyes baktériumokban (E. Coli) Fe-SOD található. Méréseinkben az intracelluláris SOD-ot (SOD<sub>1</sub>+SOD<sub>2</sub>) határoztuk meg vörösvértest hemolizátumban.

A mérés alapelve, hogy a szövetekben, vérben, plazmában található SOD enzim gátolja az adrenalin átalakulását adrenochrommá (színes, fotometrálnálható komplex). A gátlás mértékéből (optimálisan 50%-os) a benne levő enzim mennyisége kiszámítható<sup>83</sup>. Valójában

azt számítottuk ki, hogy a mintánkban levő enzim aktivitása milyen koncentrációjú standard SOD oldat aktivitásának felelt meg.

*Minta előkészítés:* Alvadásgátolt vérhez (EDTA) háromszoros mennyiségű hideg fiziológiás sóoldatot adtunk, 2000 rpm-en 3 percig centrifugáltuk. A felülúszót elöntöttük, majd a műveletet addig ismételtük, míg áttetsző felülúszót nem kaptunk. Az üledékből 10-szeres hígítást készítettünk, melynek 500µl-éhez kloroform-etanol (1:2) elegy azonos mennyiségét adtuk. A kapott mintát keverés után 15000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk (Hettich Zentrifugen Universal 3RF) 4C°-on. A felülúszót használtuk a fotometriás méréshez (Hitachi U-2001 típusú spektrofotométer). *Adrenalin standard (ASTD):* 1,6488 mg/ml 0,1N sósavban. *Reakcióelegy:* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na-EDTA; 0,05M, pH: 10,2., melyhez 100 µl-t adtunk az ASTD-ből. A minta mennyiségét úgy változtattuk, hogy lehetőleg 50%-os gátlást kapjunk. A végső térfogat mindig 3 ml volt. *Aktivitätsmérés:* Az abszorbanciát 480 nm-en 3 percig folyamatosan mértük és regisztráltuk. A kontroll görbe és a minta jelenlétében kapott görbe felszálló szárának meredeksége közötti eltérésből számítottuk ki a gátlás mértékét, az alábbi módon: (Kontroll meredekség-minta meredekség)/kontroll meredekség) x 100=A

$$1/A=B-0,010989 \text{ (konstans)} =C$$

$$0,009011/C=D$$

$$D \times \text{a hígítás mértéke} = U/\text{ml}$$

- *Redukált glutathion (GSH) meghatározás teljes vérből:*

A GSH fontos intracelluláris antioxidáns tripeptid. Ciszteinjének thiol csoportja az instabil molekulákat, mint amilyenek a szabadgyökök, egy elektront átadásával képes stabilizálni. A reakció során a glutathion maga is reaktívvá válik, de másik aktivált glutathionnal glutathion diszulfidot (GSSG) alkot, amit a glutathion reduktáz regenerál redukált glutathionná.

Méréseink során 1 ml alvadásgátolt vérhez (EDTA) 4 ml 10%-os triklór ecetsavat (TCA, Carbo Erbe) adtunk. Az elegyet 15 percig 4000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó 2 ml-éhez 4 ml 0,4 M-os (pH 8,7) Trisz-(hidroximetil)-amino-metan (TRIS, Reanal) puffert adtunk. Az így kapott elegyet 100 µl 5,5-Dithiobisz-2-nitrobenzoészav ((DTNB), 59,4 mg DTNB

(SERVA) 15 ml metanolban oldva) hozzáadása után 5 percen belül, 412 nm-en fotometráltuk, TRIS pufferrel szemben (Milton Roy Spectronic 6001). A minta GSH koncentrációját nM/ml-ben standardgörbe alapján határoztuk meg.

*- Plazma proteinek szulfhidril csoportjainak (totál-thiol csoport) meghatározása:*

Bizonyos plazmafehérjék jelentős antioxidáns kapacitással rendelkeznek. A plazma albuminja főleg thiol csoportjai révén a legjelentősebb extracelluláris antioxidáns molekula, melynek antioxidáns kapacitását számos körülmény befolyásolhatja. A plazmafehérjék antioxidáns kapacitását jellemeztük a plazma szulfhidril csoport mérésével. A mérésekhez Ellman's reagenst (99 mg 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoésav (DTNB); SERVA) használtunk. A 0,1 ml plazmát 0,8 ml TRIS pufferhez adtuk (2,3723 g EDTA 50 ml vízben oldva, melyhez 12,1 g TRIS-t adtunk, és 500 ml-re egészítettünk ki; majd 0,2M TRIS, (pH: 8,2) és 0,1 ml Ellman's reagenst adtunk hozzá. Az elegyet 412 nm-en, 0,9 ml TRIS puffer + 0,1 ml Ellman's reagenssel szemben Milton Roy Spectronic 6001 Spektrofotométerrel mértük. A koncentrációt standard-görbe alapján határozzuk meg.

#### **4. 1. 7. Statisztika**

A mérési eredményeket átlag  $\pm$  SE formában fejeztük ki. A kiindulási értékhez viszonyított eltéréseket egymintás Student-féle t-próbával számoltuk, míg a csoportok közötti különbséget kétmintás t-teszttel és ANOVA számítással határoztuk meg. A különbségeket  $p < 0.05$  értéknél tekintettük szignifikánsnak.

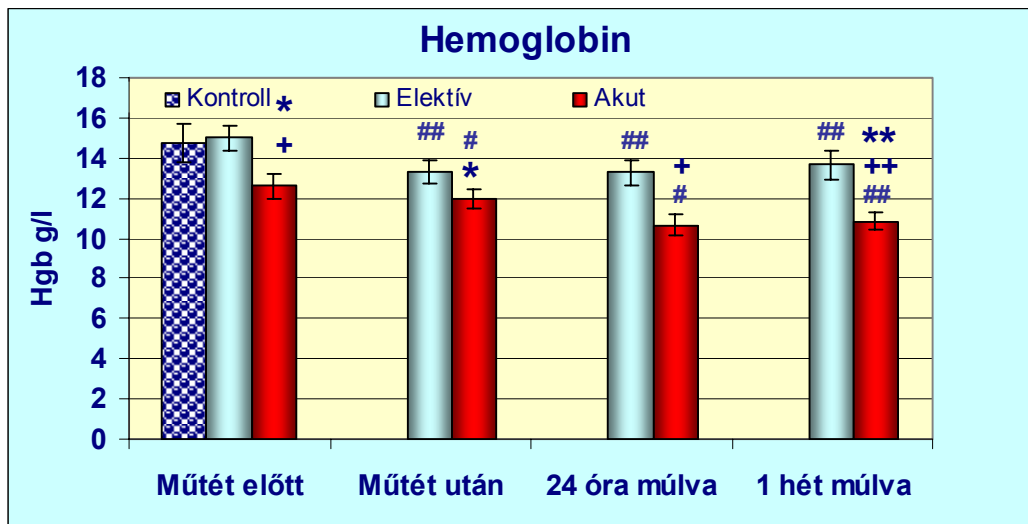
## 4. 2. Eredmények:

### 4. 2. 1. Vörösvérsejtszám, hematokrit és hemoglobin értékek

A **vörösvérsejtszám** mind az **Akut**, mind az **Elektív** betegcsoportban kis mértékű, átmeneti, statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott a műtét után ( $p < 0,05$ ), de a csoportok között nem volt szignifikáns eltérés. Az **Akut** csoportban a műtét után 1 héttel a kontrollhoz képest alacsonyabb vörösvérsejtszámot mértünk. Az **Elektív** csoportban 24 órával a műtét után is alacsonyabb értéket detektáltunk ( $p < 0,05$ ). A **hematokrit érték** csak az **Elektív** csoportban csökkent átmenetileg szignifikánsan a műtét után ( $p < 0,05$ ). A **hemoglobin** koncentráció az **Akut** csoportban már a műtét előtt alacsonyabb volt, mint az **Elektív** csoportban mért ( $p < 0,05$ ), de nem különbözött a **Kontroll** csoport értékeitől. A műtét után azonban saját kiindulási értékéhez képest is szignifikánsan csökkent ( $p < 0,05$ ) az értéke. A műtét után 1 héttel még mindig szignifikánsan alacsonyabb volt a szintje, mint a kontroll, illetve elektív csoportban mért ( $p < 0,01$ ). Az **Elektív** csoportban a műtét előtti érték megegyezett a kontroll csoportban mérttel. A műtét után szignifikáns csökkenést mutatott. Még 24 óra múlva is alacsonyabb volt értéke, mint a kiindulási érték, de egy héttel a műtét után már nem különbözött sem a kontroll csoport értékeitől, sem a műtét előtt mért értéktől (**6. Ábra**).

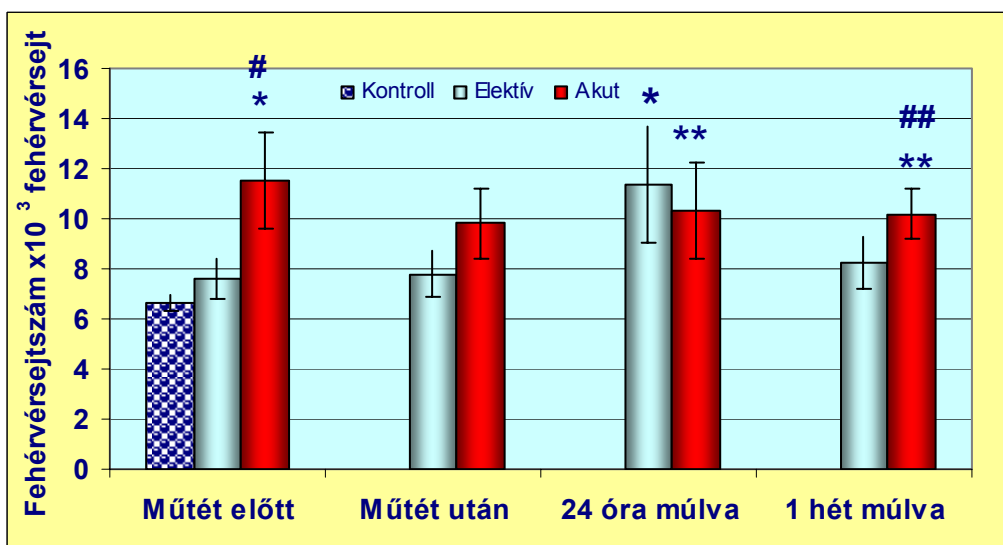
A fehérvérsejtszám az **Akut** csoportban már a műtét előtt kórosan emelkedett volt, a műtét után átmenetileg csökkent ugyan, ám mindvégig a kóros tartomány közelében maradt.

Az **Elektív** csoportban csak a műtét után 24 órával emelkedett meg átmenetileg a fehérvérsejtszám. (**7. ábra**).



6. ábra A hemoglobin koncentráció változása vörösvértest hemolizátumban:

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  vs. kontroll, # =  $p < 0,05$  vs. műtét előtt, ## =  $p < 0,01$  vs. műtét előtt, + =  $p < 0,05$  vs. elektív, ++ =  $p < 0,01$  vs. elektív



7. ábra: A fehérvérsejtszám változásai \* =  $p < 0,05$  vs. kontroll, \*\* =  $p < 0,01$  vs. kontroll; # =  $p < 0,05$  vs. elektív, ## =  $p < 0,01$  vs. elektív.



#### **4. 2. 2. Trombocita aggregáció változása**

##### **- Aggregáció mérés vérlemezkes plazmában:**

Az izolált trombocitákon végzett aggregáció mérések lehetővé teszik, hogy a vér többi sejtjes elemének hatásától függetlenül vizsgáljuk a trombocita funkciót, és ellenőrizzük az aggregációgátló terápia hatékonyságát. A kollagént és az ADP-t, mint induktort azért választottuk, mivel e kettőt alkalmazzák, a két eltérő támadáspontú, leggyakrabban használt aggregáció gátló vegyületcsoport, a COX-gátlók (kollagén) és az ADP receptor antagonisták (ADP) hatékonyságának ellenőrzésére, ugyanakkor két különböző, trombocita aggregációt indukáló jelátviteli út állapotáról is képet kaphatunk.

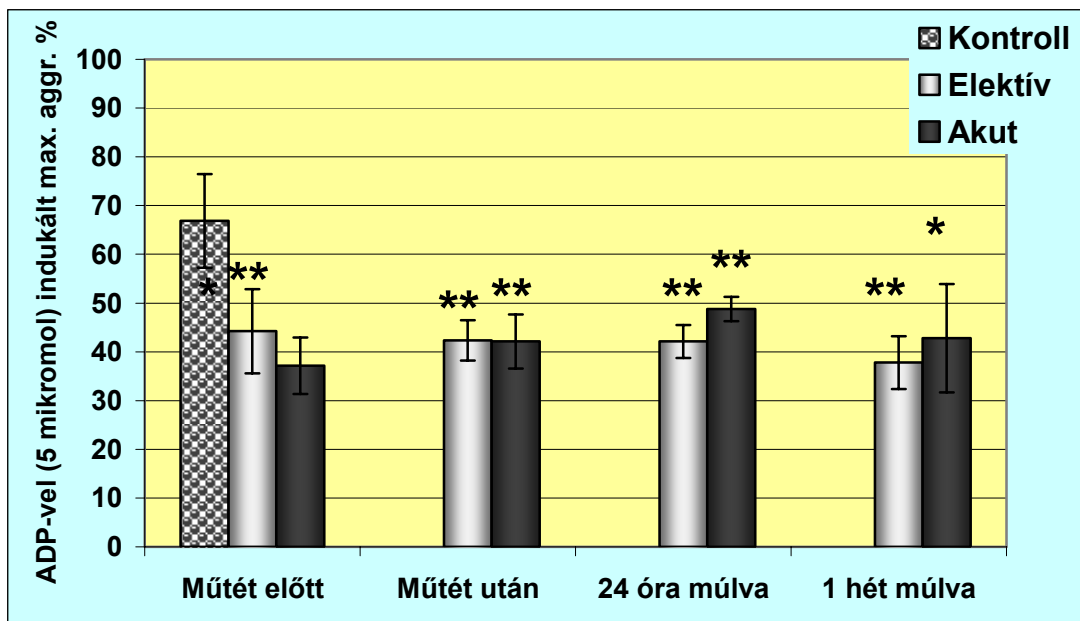
##### **- Az ADP-vel indukált aggregáció PRP-n**

A **Kontroll** csoportban az ADP-vel indukált aggregáció mértéke a normál értéknek megfelelő volt (61-91%).

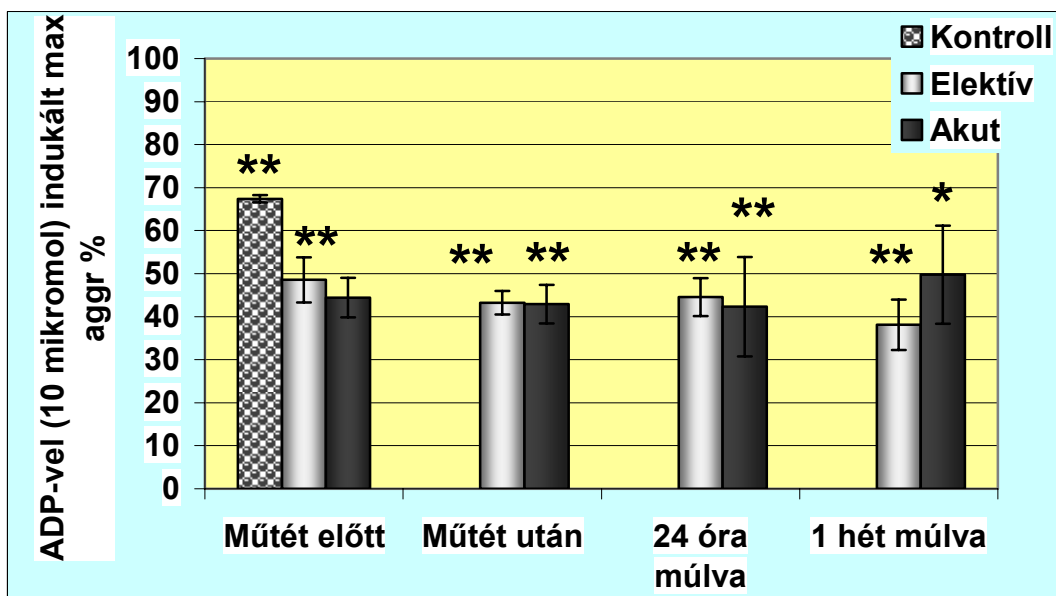
A betegcsoportok maximális aggregációja a vizsgált időpontokban nem különbözött egymástól, de mindkét esetben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a **Kontroll** vérmintákban mért, és nem érte el a normál érték alsó határát. Azt eredmények alapján az aggregációgátló terápia a trombociták szintjén hatékonyak bizonyult (8. és 9. Ábra).

##### **- Kollagénnel (2 µg/ml) indukált aggregáció PRP-n**

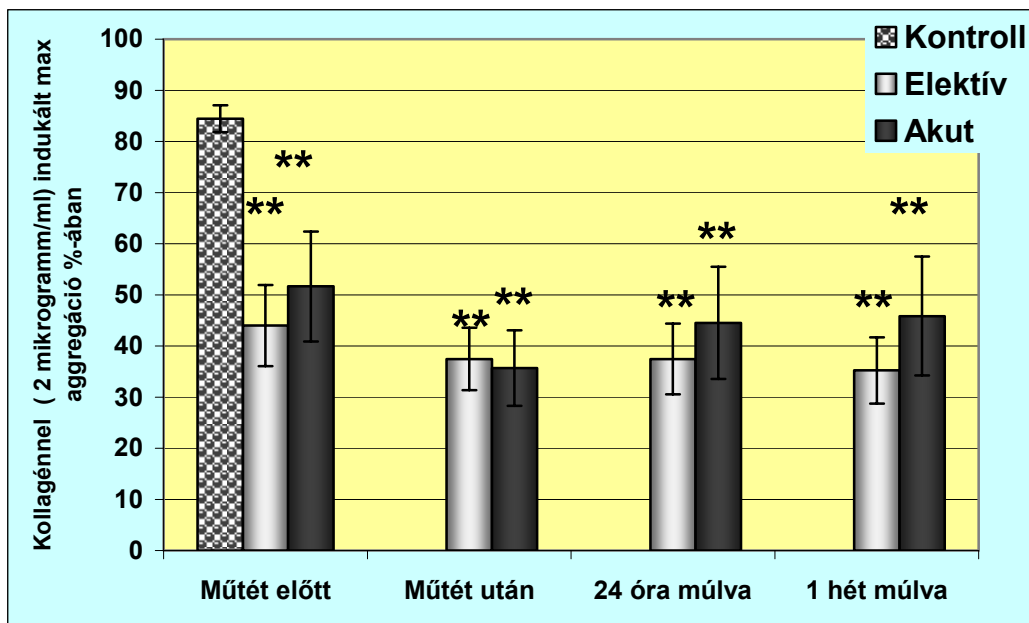
Egészséges önkéntesek kollagénnel indukált aggregációja a normálértéknek megfelelő (64-92%) volt. A perifériás érbetegek értékei minden vizsgált időpontban ennél szignifikánsan alacsonyabbak voltak. A műtét után mindkét betegcsoportban átmeneti, nem szignifikáns csökkenést észleltünk a kiindulási értékhez képest. Az aggregáció gátló terápia az izolált thrombocyták szintjén mindkét csoportban hatékonyak, és megfelelőnek bizonyult (10. Ábra).



8. ábra. Az 5  $\mu$ M ADP-vel indukált aggregáció maximuma izolált PRP-n  
 \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  vs. Kontroll



9. ábra. A 10  $\mu$ M ADP-vel indukált aggregáció maximuma izolált PRP-n,  
 \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  vs. Kontroll



10. ábra A kollagénnel (2 µg/ml) indukált aggregáció maximuma izolált PRP-n. \*\* = p<0,01 vs. egészséges kontroll

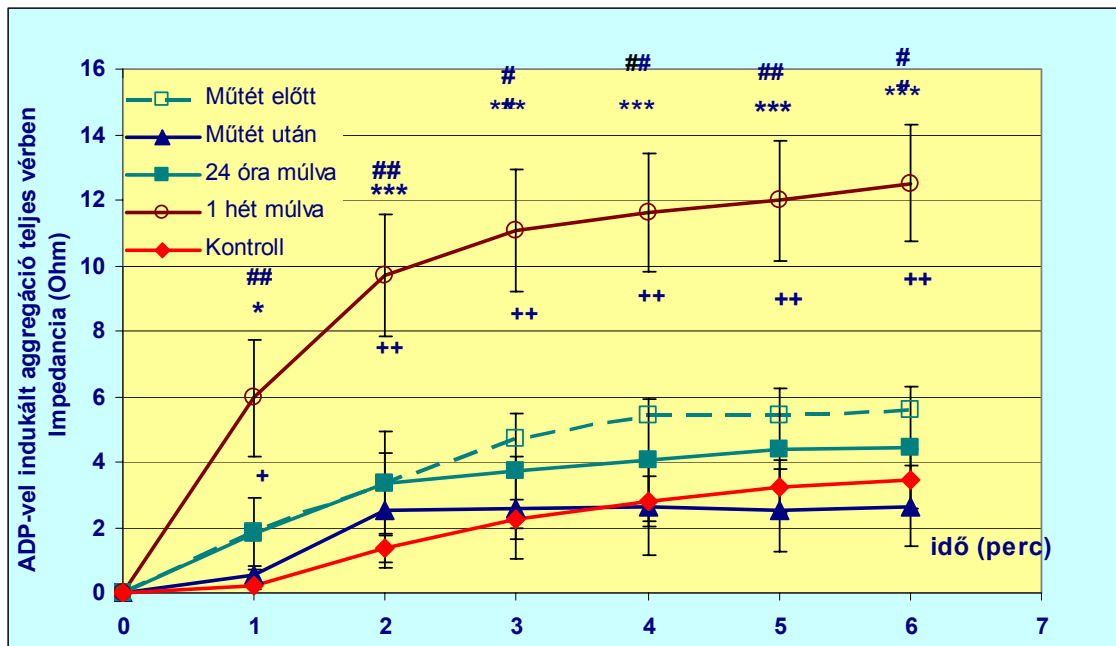
#### - Aggregáció mérés teljes vérben

##### ADP-vel indukált aggregáció:

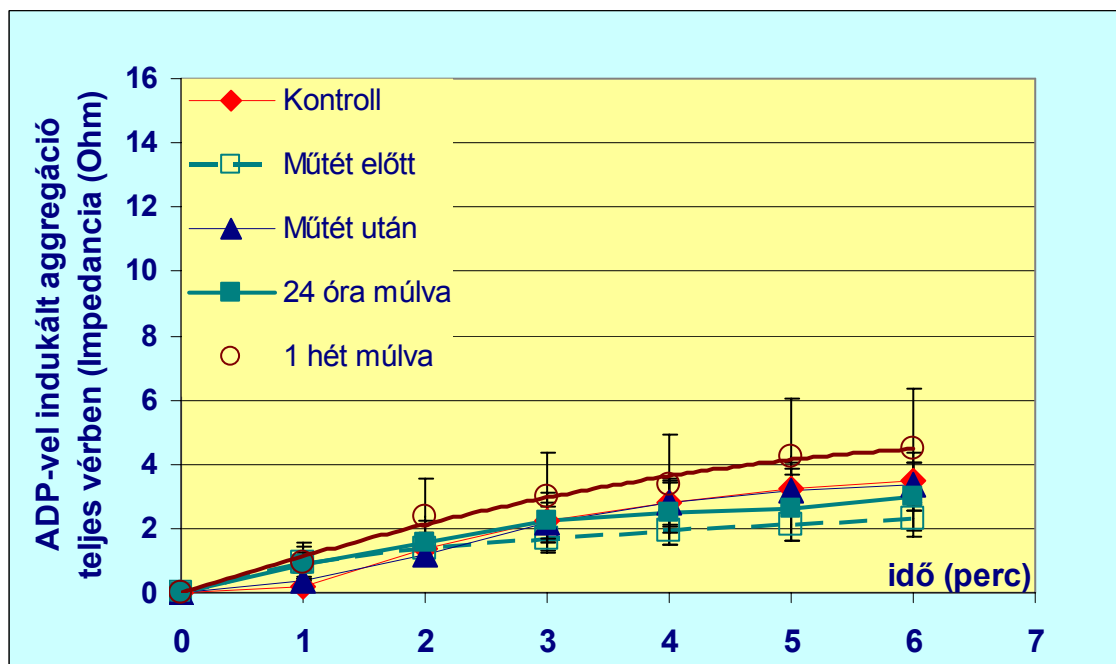
Az izolált trombocitákon a **Kontroll** csoport és a betegcsoportok között mért szignifikáns különbség teljes vérben már egyáltalán nem volt kimutatható. Az **Akut** csoportban a műtét előtt, a műtét után közvetlenül, és 24 óra múlva tapasztaltunk némi ingadozást az aggregáció mértékében, de a **Kontroll** csoporthoz képest a különbség már nem volt szignifikáns. Egy héttel a műtét után azonban szignifikáns, nagy mértékű aggregáció fokozódást mértünk, az összes korábban mért értékhez képest.

A **Kontroll** csoportban az induktor hozzáadása és az aggregáció megindulása között egy perc telt el, míg az **Akut csoportban** a műtét előtt és a műtét után az induktor hozzáadása után szinte azonnal megindult az aggregáció. Ugyan ezt tapasztaltuk a műtét után egy héttel is, ekkor azonban a görbe meredeksége is jelentősen nőtt (**11a Ábra**).

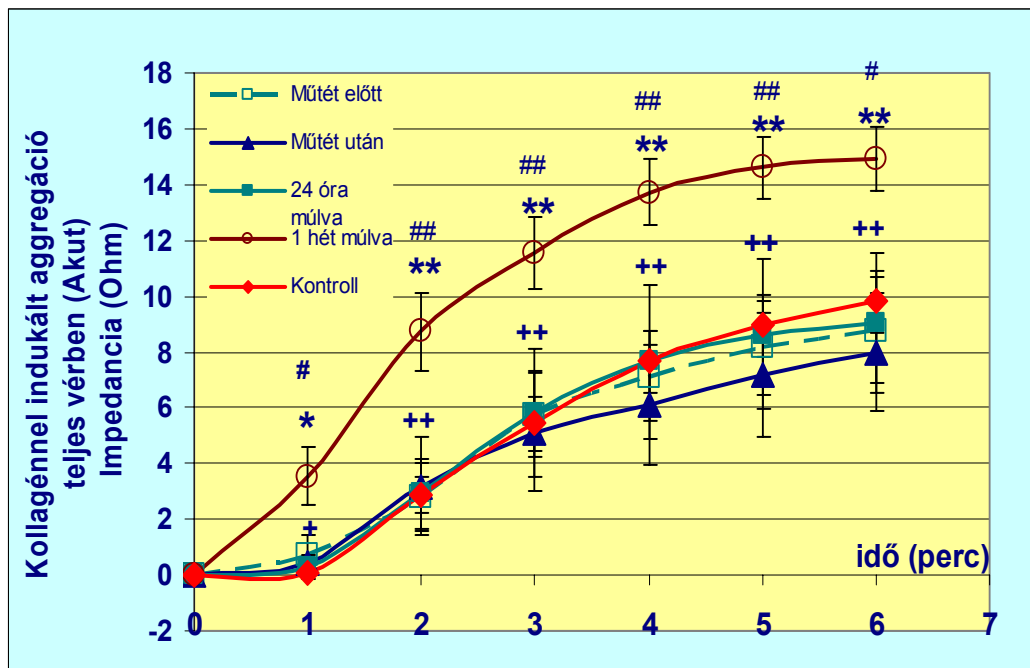
Az **Elektív** csoportban csak kismértékű, statisztikailag nem szignifikáns aggregáció fokozódás volt mérhető 1 héttel a műtét után (**11b Ábra**).



**11a. ábra. Akut csoport: ADP-vel (5  $\mu$ M)-vel indukált aggregáció teljes vérben**  
 \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $0.01$  vs. Kontroll \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll, # # =  $p < 0,01$ , # =  $p < 0,05$  vs. Műtét előtt; + =  $p < 0.05$ , ++ =  $p < 0.01$  vs. Elektív (11b Ábra).

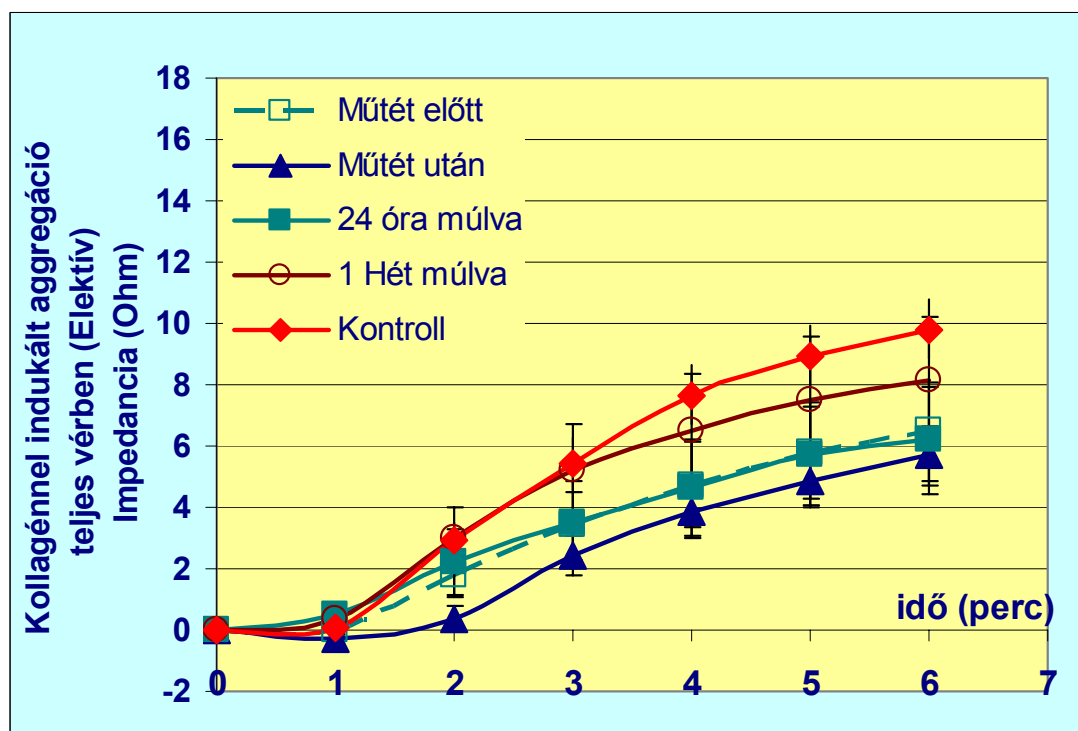


**11.b.ábra. Elektív csoport: ADP-vel (5  $\mu$ M) indukált aggregáció teljes vérben**



12a. ábra. Akut csoport: kollagénnel (2 µg/ml) indukált aggregáció teljes vérben.

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $0,01$  vs. Kontroll \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll, ## =  $p < 0,01$ , # =  $p < 0,05$ , vs. Műtét előtt; + =  $p < 0,05$ , ++ =  $p < 0,01$  vs Elektív.



12b. ábra. Kollagénnel (2 µg/ml) indukált aggregáció teljes vérben. Elektív csoport

A kollagénnel (2 µg/ml) indukált aggregáció az **Akut** csoportban a műtét után kismértékű csökkenést mutatott a műtét előtt mért értékhez képest. A műtét után egy héttel azonban, az ADP-vel indukált aggregációhoz hasonlóan, az **Akut** csoport betegeinél jelentős, és statisztikailag szignifikáns aggregáció fokozódást tapasztaltunk a csoporton belül valamennyi korábban mért értékéhez képest. A kollagénnel indukált aggregáció mértéke minden vizsgált időpontban szignifikánsan magasabb volt, mint a **Kontroll** és **Elektív** csoportokban mért érték (12a Ábra).

Az **Elektív** csoportban nem észleltünk hasonló változást. (12. b Ábra).

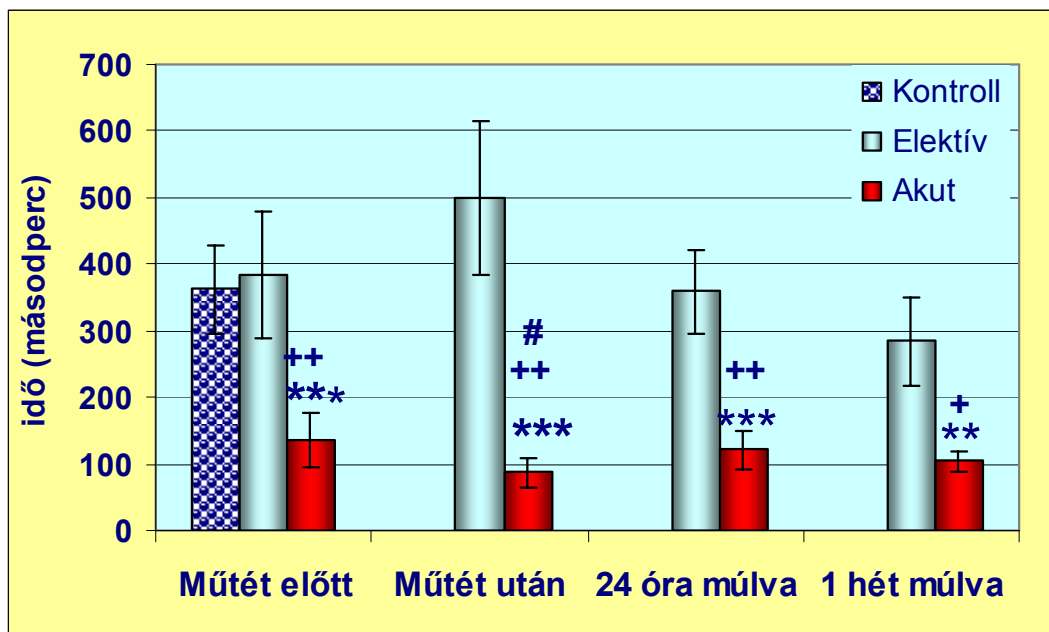
#### **4. 2. 4. Prooxidánsok:**

##### *- PMA-val indukált szabadgyök produkció*

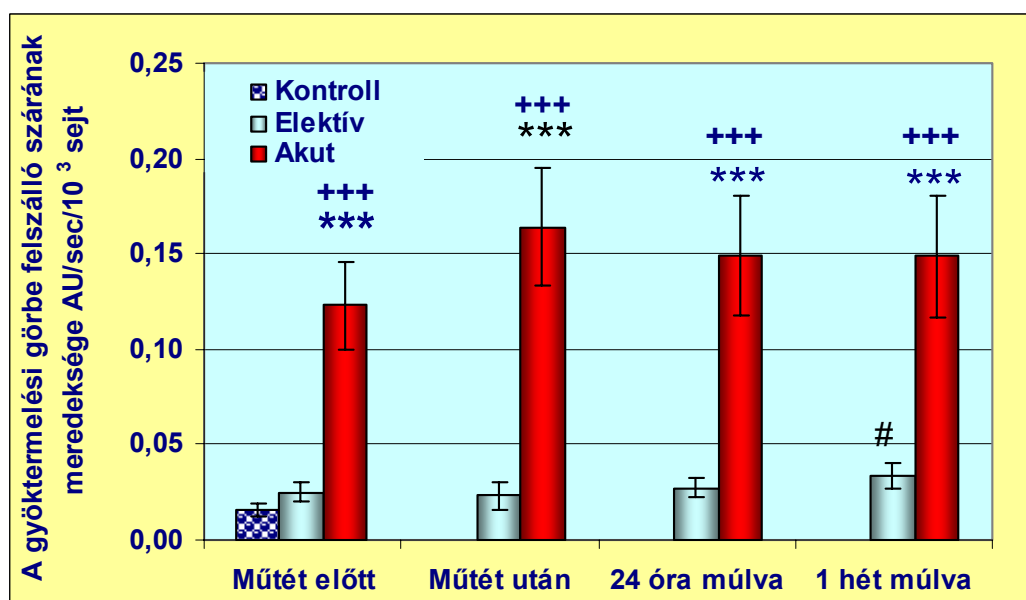
A szabadgyök produkció tekintetében jelentős különbséget tapasztaltunk a két betegcsoport között. A hosszan fennálló iszkémia hatására az **Akut** csoportban már a műtét előtt szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a gyöktermelést jellemző valamennyi általunk vizsgált paraméterben. A posztoperatív időszakban, pedig még ehhez a magas értékhez képest is fokozódott a keringő sejtek egységnyi fehérvérsejtszámra korrigált szabadgyök termelése (13, 14, 15 ábra). Ugyanakkor ebben a csoportban a fehérvérsejtszám is magasabb volt a normálértéknél és szignifikánsan különbözött a **Kontroll** csoport értékeitől is (7. ábra).

Az **Elektív** csoportban a kontroll csoporthoz képest, a fehérvérsejtszámban, és a PMA-val indukált szabadgyök produkciót jellemző paraméterekben statisztikailag szignifikáns különbséget csak egy héttel a műtét után tapasztaltunk. A "lag time" minden időpontban csaknem megegyezett a **Kontroll** csoportban mérttel. A gyöktermelési görbe felszálló szárának meredeksége, és a gyöktermelés maximum értéke azonban, a kontroll csoportban mértnél szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ).

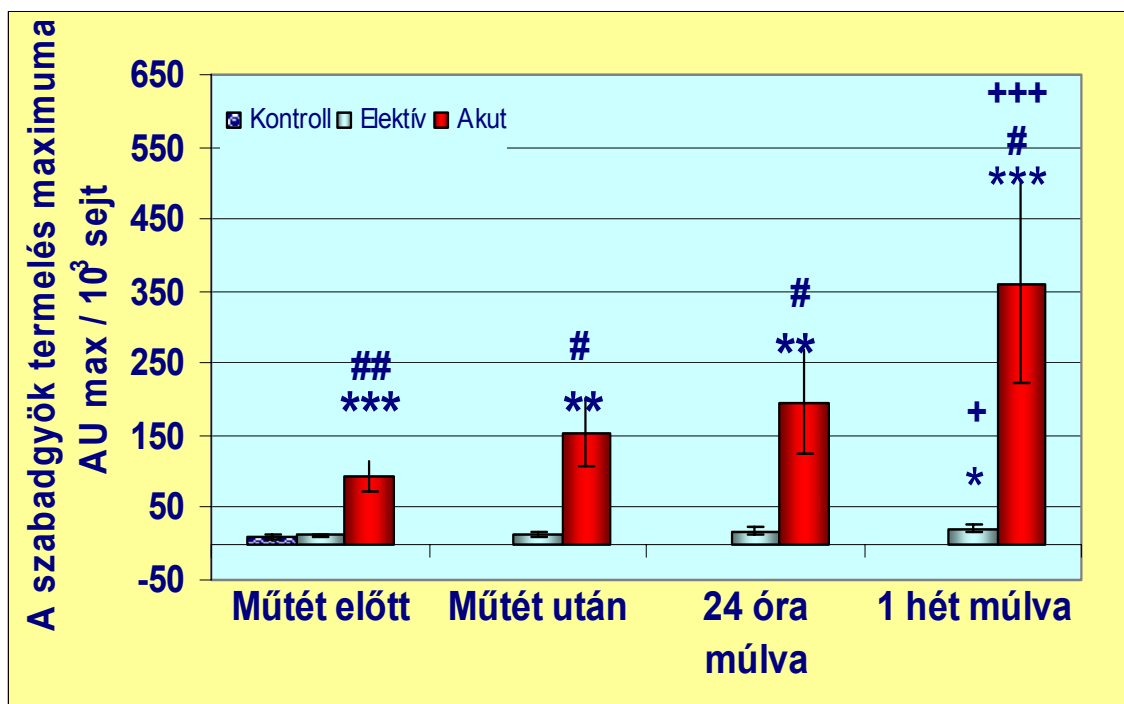
Az **Akut** betegcsoportban az **Elektív**hez képest sokkal aktívabb, az indukáló impulzusra érzékenyebb és számban is több fehérvérsejt jelenlétével kell számolni. (13, 14, 15. 7. Ábra).



13. ábra. A gyöktermelés indukálásától annak megindulásáig eltelt idő („Lag time”) \* = $p < 0,05$ , \*\*= $0,01$  vs. \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll, # =  $p < 0,05$ , ## =  $p < 0,01$  vs. Műtét előtt; + =  $p < 0,05$ , ++ =  $p < 0,01$  vs Elektív.



14. ábra. A gyöktermelési görbe felszálló szárának meredeksége („slope”) \* =  $p < 0,05$  vs. kontroll; \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll. + =  $p < 0,05$  vs. elektív, ++ =  $p < 0,01$  vs elektív, # <  $0,05$  vs műtét előtt.



**15. ábra. A fehérvérsejtszámra korrigált szabadgyök termelés maximuma**

\* =  $p < 0,05$  vs. kontroll; \*\* =  $p < 0,01$  vs. kontroll, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs. kontroll, # =  $p < 0,05$  vs. műtét előtt, + =  $p < 0,05$  vs. elektív, ++ =  $p < 0,01$  vs. elektív.

#### **- Hemolizátum és plazma MDA koncentráció vizsgálatok eredményei:**

A többszörösen telítetlen zsírsavak oxigén szabadgyökök által okozott peroxidációja során keletkező egyik végtermék, a malondialdehid, mellyel a lipid peroxidáció mértékét jellemeztük.

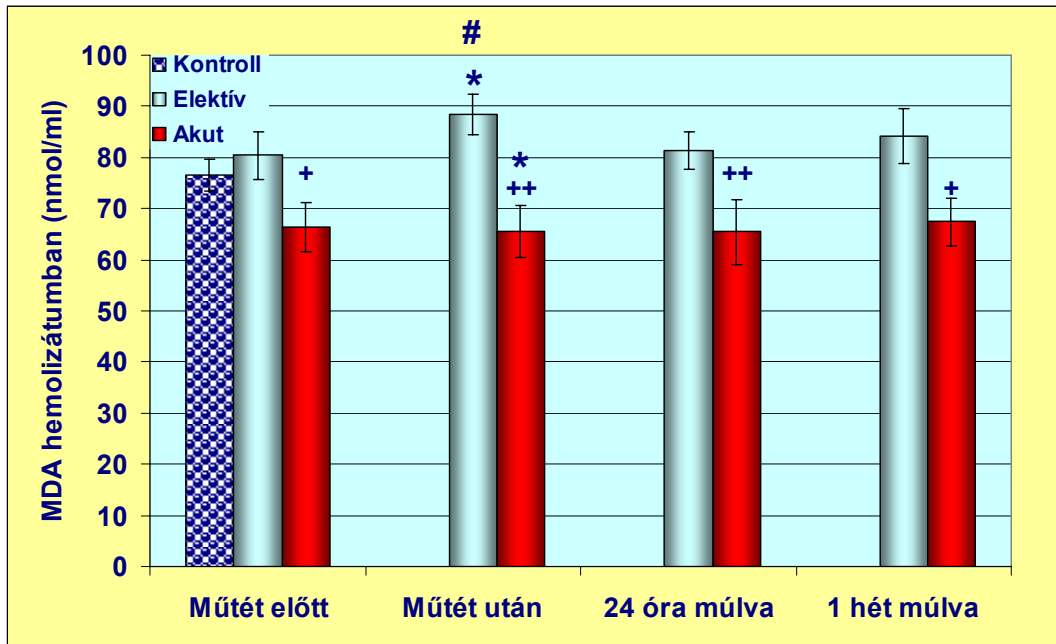
Hemolizátumban csak az **Elektív** csoportban találtunk szignifikáns emelkedést a műtét után ( $p < 0,05$ ). Az **Akut** csoportban nem történt változás a hemolizátum MDA szintjében.

Ebben a csoportban az MDA szint már a műtét előtt alacsonyabb volt, mint az **Elektív** csoportban mért, és **Kontroll** csoportban mérttől nem különbözött. A műtét alatt végig ezen az alacsony szinten maradt (16a. Ábra).

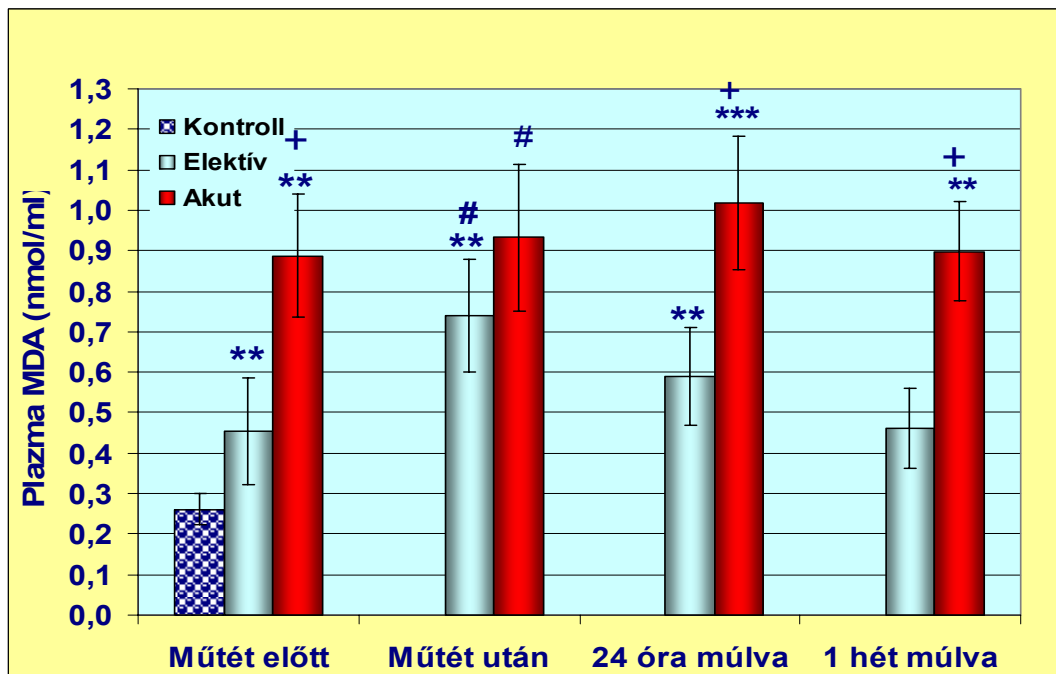
Vizsgálatunkban a plazma MDA szintje változott szignifikánsan (16b. Ábra).

A **plazma MDA** az **Akut** csoportban mindkét csoportnál magasabb volt ( $p < 0,05$ ). Az **Elektív** csoportban is szignifikánsan meghaladta a **Kontroll** értéket, és a műtét után is szignifikáns fokozódást mutatott, mely egy héten belül rendeződött (16a., 16b. Ábra).





16a Ábra MDA szint a vörösvértest hemolizátumban\* =  $p < 0,05$  vs. kontroll; \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll, # =  $p < 0,05$  vs műtét előtt, + =  $p < 0,05$  vs. elektív.



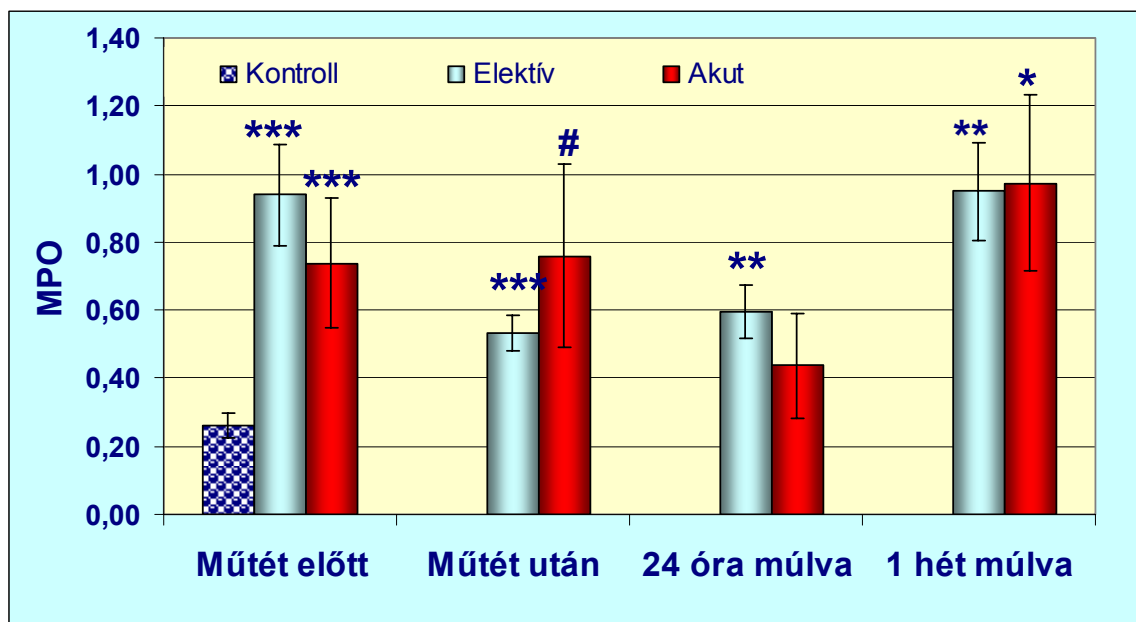
16b. ábra. A plazma MDA szintje \* =  $p < 0,05$  vs. kontroll; \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll, \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll, + =  $p < 0,05$  vs. elektív, # =  $p < 0,05$  vs műtét előtt.

### - Mieloperoxidáz szint:

A mieloperoxidáz szintet rutin vizsgálatokban nem szokásos meghatározni, de egy 2003-as tanulmány szerint a mellkasi fájdalomra panaszkodó betegeknél a miokardiális infarktus jó prediktora a megemelkedett szint<sup>84</sup>. Egy újabban megjelent tanulmány szerint a magas MPO szint jobb prediktora perifériás artériás érbetegekben a fokozott kardiovaszkuláris veszélyeztetettségnek, mint a C-reaktív protein<sup>85</sup>.

A jelen vizsgálatban is, mindkét beteg-csoportban szignifikánsan magasabb volt az MPO szint, mint a **Kontroll** csoportban. Az iszkémia és a korai reperfüzió alatt kismértékű csökkenést tapasztaltunk, mely csak az **Elektív** csoportban volt szignifikáns ( $p < 0,01$ ).

A műtét után egy héttel mindkét csoportban visszaállt a műtét előtt mért szintre (**17. Ábra**).



**17. ábra. Mieloperoxidáz szint.** \* =  $p < 0,05$  vs. kontroll; \*\* =  $p < 0,01$  vs. kontroll  
\*\*\* =  $p < 0,001$  vs. Kontroll; # =  $p < 0,05$  vs. műtét előtt

### 4. 2. 5. Antioxidánsok változása:

#### - Superoxid dizmutáz aktivitás:

A betegcsoportokban a SOD aktivitás már a műtét előtt szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a **Kontroll** csoportban. Az **Akut** csoportban pedig még az **Elektív** csoportban mértnél is szignifikánsan alacsonyabb értékeket detektáltunk ( $p < 0,05$ ), melyek 24 órával

a műtét után tovább csökkentek ( $p < 0,05$  vs. műtét előtt, és  $p < 0,001$  vs. **Kontroll**) (18.

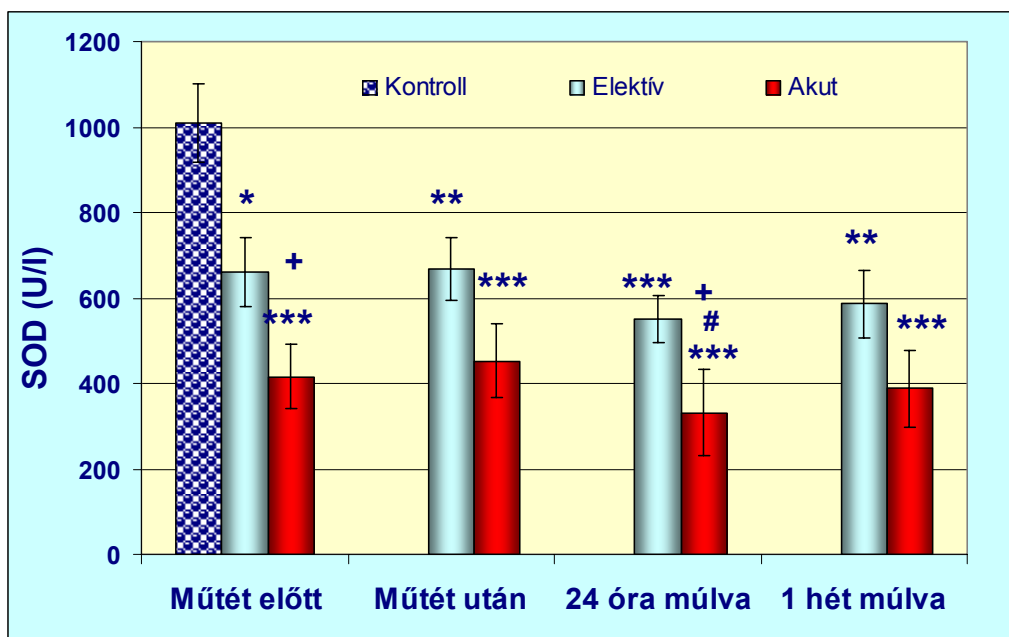
Ábra)

- *A redukált glutathion mennyisége*

A GSH műtét előtti értékében a három csoport között nem volt különbség. A műtét után mindkét betegcsoportban átmeneti csökkenést tapasztaltunk. Egy héttel a műtét után azonban visszaállt a műtét előtti érték (19. ábra).

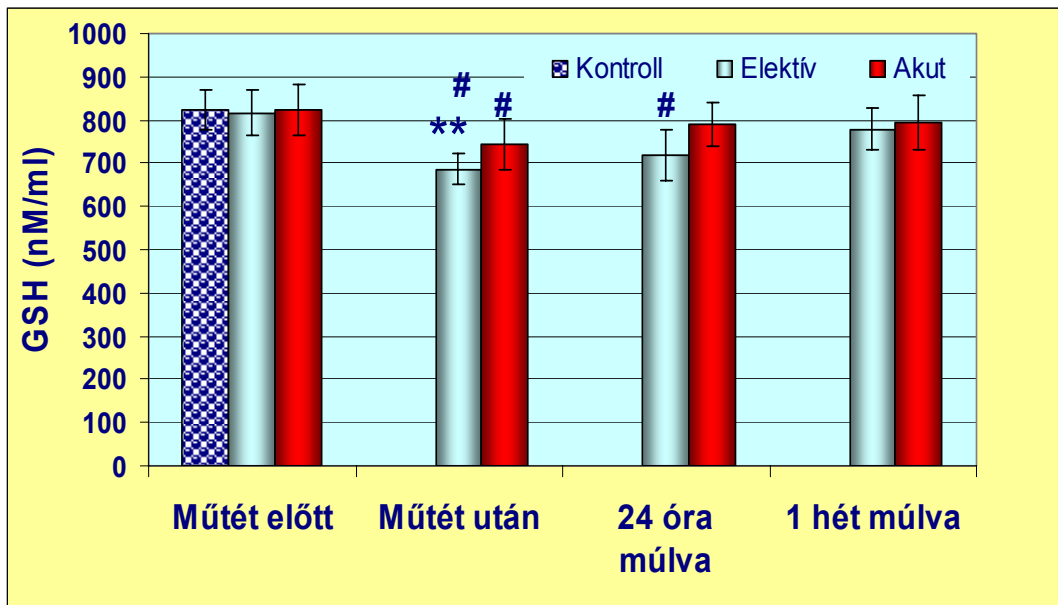
- *A vérplazma szulfhidril (-SH) csoportjainak koncentrációja*

A plazma totál -SH koncentrációja közvetlenül a műtét után, átmenetileg mindkét betegcsoportban szignifikánsan csökkentek (20. ábra).

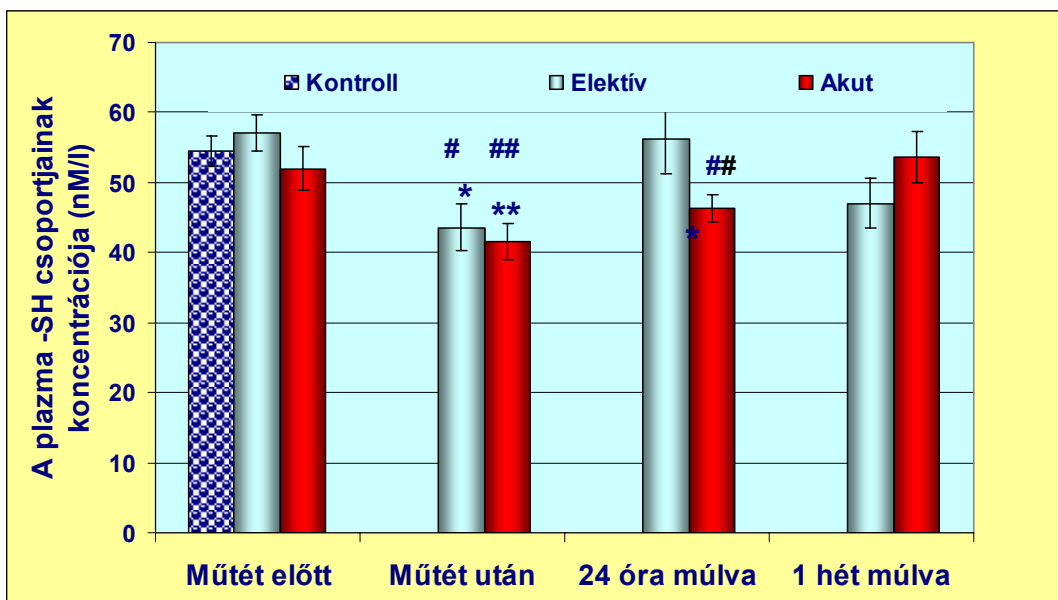


**18. ábra. A szuperoxid dizmutáz aktivitás változása**

\* =  $p < 0,05$  vs. kontroll; \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll; \*\*\* =  $p < 0,001$  vs kontroll;  
+ =  $p < 0,05$  vs. elektív, # =  $p < 0,05$  vs műtét előtt.



19. ábra. A redukált glutathion (GSH) mennyisége \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll, # =  $p < 0,05$  vs műtét előtt.



20. ábra. A plazma szulfhidril-csoportjainak koncentrációja. \* =  $p < 0,05$  vs kontroll, \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll, # =  $p < 0,05$  vs műtét előtt, ## =  $p < 0,01$  vs műtét előtt.

### **4. 3. Eredmények összefoglalása és következtetések:**

A korábban iszkémiás szervek, és szövetek vérellátásának helyreállítása komplikációk egész sorát indítja el, melyek alapvetően két kategóriába sorolhatók: az egyik a regionális válasz, mely a volt iszkémiás szöveteket érinti, a másik viszont az egész szervezetet, mivel az iszkémiától távoli szervek, és szövetek károsodását okozza, többszervi elégtelenséget eredményezhet, és halálos kimenetelű lehet<sup>86</sup>.

Annak ellenére, hogy az iszkémia-reperfúziós károsodás jelenségét csaknem ötven éve leírták, nincs pontos ismeretünk arról, hogy miként mediálódik, illetve hogyan lehet megelőzni, vagy kezelni. Egyetértés van azonban abban a tekintetben, hogy a vázizom I/R sérülése direkt módon korrelál az iszkémia időtartamával és súlyosságával<sup>87</sup>.

Vizsgálataink középpontjában a revaszkularizációs perifériás érműtétek által előidézett I/R károsodás állt. Az aggregábilis monitorozására, ADP-t és a kollagént használtunk induktorként. Az ADP kulcsszerepet játszik a hemosztázisban, mivel a TCT aktiváció során maga is felszabadul a TCT denz granulumaiból. In vitro potenciózza számos más aggregáló ágens, többek között a trombin hatását is, mellyel stimulálja és stabilizálja a trombin által indukált trombuszt. A kollagén a sérült endotélium révén kerül a felszínre, megjelenése azonnal közvetlenül, (GPIIbIIIa-n keresztül) és közvetett (vW-faktoron keresztül) módon is kiváltja a TCT aktivációját, valamint elősegíti annak a sérült endotéliumhoz történő kitapadását. Vizsgálataink újak tekinthetők abban a tekintetben, hogy trombocitadús plazmában és teljes vérben párhuzamosan monitoroztuk a TCT funkciót, a teljes hospitalizációs fázis alatt.

Esetünkben lényeges különbséget tapasztaltunk a kétféle módon monitorozott aggregábilis között. Vizsgálataink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy izolált trombocitákon az aggregáció gátló szerek hatékonyságát specifikusan a TCT-re vonatkozóan tudjuk tesztelni, teljes vérben pedig, a vér más sejtjes elemeinek és a környezet (a vérplazma elemei, enzimek, antioxidáns és prooxidáns plazmaproteineknek) trombocita funkcióra gyakorolt moduláló hatását vizsgálhatjuk.

Vizsgálataink alapján jól látható, hogy az alkalmazott aggregáció gátló terápia kuratív hatása a trombociták szintjén mindkét betegcsoportban érvényesült (8., 9., 10. ábra), de teljes vérben ez a gátló hatás már nem volt kimutatható (11a és b, 12 b. ábra). Az így végzett vizsgálatok világossá tették számunkra, hogy az **Akut** csoport esetében a teljes vérben mért trombocita aggregáció fokozódást elsősorban nem az aggregáció gátló terápia elégtelen volta okozta, hiszen ugyanabból a mintából származott a PRP, mint amiben az aggregációt teljes vérben mértük. A két preparátum között az a lényeges különbség, hogy az egyikben az összes sejtes véralkotó, míg a másikban csak a trombocita volt jelen. Eredményeinkben az volt a meglepő, hogy amíg a PRP-ben mért értékek megfelelő aggregáció gátlást mutattak mindkét betegcsoportban, addig az **Akut** csoportba tartozó betegek teljes vérében mind az ADP-vel mind a kollagénnel indukált aggregációban szignifikáns és nagymértékű aggregáció fokozódást tapasztaltunk egy héttel a műtét után.

A jelenség hátterében, az antioxidáns prooxidáns egyensúly zavara állhat, hiszen a teljes artériás elzáródást követő hosszú iszkémia, majd a rákövetkező reperfúzió a fennálló krónikus betegséggel együtt hatalmas stresszt jelent nem csak az érintett végtag, hanem az egész szervezet számára. A fehérvérsejtszám az **Akut** csoportban minden vizsgált időpontban a kóros érték határán (10000 sejt/ $\mu$ l) volt, de az **Elektív** csoportban is mértünk magas értékeket, pl a műtét után 24 órával (7. Ábra). Az **Akut** csoportban, a teljes vérben mért szabadgyök produkció valamennyi mért és számított paramétere azt mutatta, hogy már a műtét előtti mintában, a PMA hozzáadást követően a **Kontroll** csoportban mérthez képest jelentősen fokozódott a válaszkészség. A reakcióidő szignifikáns csökkenése, a gyöktermelési görbe felszálló szárának fokozott meredeksége, a fehérvérsejtek oxidatív ágensek iránti érzékenysége mind a szabadgyök produkció fokozódását jelezte (13. 14. 15. Ábra).

Ezt a jelenséget, sokkal kisebb mértékben az **Elektív** csoportban is tapasztaltuk, a maximális szabadgyök produkció tekintetében (15. ábra). Feltételezzük, hogy az általunk mért PMA-val indukált PKC-függő szabadgyök produkció orozslánrészét a fehérvérsejtek NADPH oxidáz

enzime termeli. A vérlemezkék is képesek szuperoxid produkcióra<sup>88</sup>, de ez a fehérvérsejtek szabadgyök termeléséhez képest elhanyagolható.

A fokozott szabadgyök produkció azonban nem egyedül felelős az antioxidáns prooxidáns egyensúly megbomlásáért. Fontos szerep tulajdonítható a SOD enzim aktivitásában bekövetkező jelentős csökkenésnek, mindkét betegcsoportban, már a műtét előtt is. Az **Akut** csoport értékei szignifikánsan alacsonyabbak voltak, nem csak a **Kontroll**, hanem az **Elektív** csoportban mérthez képest is, a műtét hatására, pedig ez az alacsony érték még tovább csökkent (24 órás adat, 18. ábra). A SOD-szint kismértékű csökkenését az **Elektív** csoportban is megfigyelhettük 24 órával a műtét után, de ez a kiindulási értékhez képest nem, csak a kontroll csoport értékeihez képest volt szignifikáns.

Vizsgálataink alapján valószínűnek látszik, hogy a SOD deficienciencia szerepet játszik a szabadgyök produkció jelentős fokozódásában, és az **Akut** csoportban a műtét után egy héttel tapasztalható fokozott aggregábilításban. Fontos itt megemlíteni azt a legújabb megfigyelést, hogy a magyar lakosság diabéteszes populációja körében a kataláz enzim olyan mutációját mutatták ki, amely az enzim elégtelen működését okozza<sup>89</sup>. A kataláz deficiencia ritka, örökletes, autoszómális, recesszív rendellenesség, mely elsősorban a magyar, svájci és japán eredetű lakosság körében gyakori<sup>90</sup>. Elképzelhető, hogy a perifériás érbetegségek rizikótényezői között idővel a SOD enzim mutációját találják meg. Pipinos és munkatársai például perifériás artériás érbetegek gastrocnemius izmában irták le a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabb SOD aktivitást<sup>91</sup>.

A prooxidáns környezet hatásaként aktiválódott lipid peroxidáció mértékét általában a keletkezett MDA mennyiségével jellemezzük. Esetünkben ez a marker vörösvértest hemolizátumban és szérumban eltérően viselkedett (16a és 16b. Ábra). Hemolizátumban az **Akut** csoport vörösvérsejtjeinek MDA szintje nem különbözött a **Kontrolltól**, és minden vizsgált időpontban szignifikánsan alacsonyabb volt, az **Elektív** csoportban mért értéknél. A plazmában mért érték viszont szignifikánsan magasabb volt az **Akut** csoportban, mint a **Kontroll** és **Elektív** csoportban. Ennek az ellentmondásnak a feloldására próbáltunk összefüggést keresni más, vörösvértestekkel kapcsolatos egyéb paraméterek változásaival. A

vörösvérsejtszámban nem találtunk szignifikáns különbséget a három csoport között, és a hemoglobin koncentráció is csak a műtét után 24 órával mutatott kismértékű, bár szignifikáns csökkenést az **Akut** csoportban.

A jelenség hátterében a vörösvértest membrán foszfolipid/koleszterin arányának megváltozását, valószínűsítjük.

Irodalmi adat, hogy a hosszan fennálló ateroszklerózis hatására a lipid membránok struktúrája átépül, kevesebb többszörösen telítetlen zsírsavat tartalmaz, és rigidebbé válik<sup>92,93</sup>. Így feltevésünk szerint a MDA, mint a többszörösen telítetlen zsírsavak peroxidációjának nyomjelzője, ezekben az esetekben „ál negatív” eredményt ad, mivel a membránban már nincs olyan mennyiségű többszörösen telítetlen zsírsav, melynek a peroxidációja kimutatható lenne.

A plazma MDA szintje mindkét betegcsoportban magasabb volt, mint a **Kontroll** csoportban. Míg a műtét után az **Elektív** csoportban csak átmeneti emelkedést tapasztaltunk, addig az **Akut** csoportban még egy hét múlva sem rendeződik a plazma MDA szintje. A plazmában mért fokozott lipid peroxidáció szintén fontos komponens lehetett a teljes vérben mért kórosan magas aggregációban.

Az antioxidáns védelem két fontos komponense, az intracelluláris GSH és a plazmában levő szulfhidril csoportok összessége, különösen az albumin –SH-csoportjai. Műtét előtti szintjük nem különbözött a három csoportban. A műtéti beavatkozás azonban átmeneti, kismértékű, ám szignifikáns csökkenést okozott mindkét paraméter esetében (19.és 20. Ábra). Irodalmi adatok igazolják, hogy az inhalációs narkotikumok fokozzák az oxidatív stresszt<sup>94</sup>, és bizonyos helyiérzéstelenítő szerek metabolizmusuk során befolyásolhatják a GSH szintet. A sebészi trauma maga is csökkenti a GSH-szintet humán vázizomban<sup>95</sup>

Az állatkísérletek és humán vizsgálatok szerint az érsebészeti beavatkozások I/R károsodást, a keringő sejtek (elsősorban neutrofilek) aktivációját és gyulladásszerű reakciókat indítanak el nem csak a beavatkozás helyén, hanem az egész szervezetben. A beavatkozások többsége szklerotikus érrendszert érint, gyakran diabétesz mellitusz, és hipertónia jelenlétével is



számolni kell. Ezek az állapotok mind fokozott szabadgyök kiáramlással járnak, amit a sebészeti beavatkozás okozta I/R sérülés csak tovább fokoz.

Az aktivált trombocita döntő szerepet játszik az ateroszklerózis kialakulásában és valószínűleg fokozza az érsebészeti beavatkozások kockázatát is<sup>96</sup>. Ezzel együtt kevés olyan adat áll rendelkezésre, ami magyarázná a betegség rossz prognózisát. Néhány ilyen támpont, a komplement rendszer reperfüzió alatti aktiválódása<sup>97</sup>, a leukocyt-TCT interakció<sup>98</sup>, és a fokozott endotelin kiáramlás<sup>99</sup>.

Jelen vizsgálataink eredményei az antioxidáns prooxidáns egyensúly megbomlására hívják fel a figyelmet, melynek legfőbb következménye, különösen hosszan fennálló iszkémia esetén, hogy a hatékony, izolált trombociták szintjén kimutatható TCT aggregáció gátlás ellenére is fokozott TCT aggregációs készséggel kell számolnunk.

A TCT aggregáció gátlása fontos, és hasznos a súlyos komplikációk elkerüléséhez, de a többi keringő sejt és a környezet állapotában beállott változásokat is figyelembe kell venni, mint amilyen a háttérben permanensen zajló, és az idő múlásával egyre fokozódó szabadgyök produkció, a kórosan alacsony SOD szint, melyet a lipid peroxidáció állandósult, megemelkedett szintje is súlyosbít. A fokozott MPO aktivitás, a gyulladással járó folyamatok felerősödését jelzi. Mindezek együtt olyan környezetet teremthetnek, melyek a trombusképződés és reokklúzió felé vihetik el a folyamatokat.

Számos vizsgálatban tanulmányozták perifériás revaszkularizációs érműtétek során az aggregáció gátló terápia és az antikoagulánsokkal történő kezelés hatékonyságát, de ezen vizsgálatok többségében Doppler ultrahang mérésekkel és angiográfiával ellenőrizték a műtét és a terápia hatékonyságát. A közlemények többsége nem számol be a trombocita funkció változásairól, valamint a gyulladással járó reakciók lefolyásáról sem szolgáltatnak megfelelő adatokat<sup>100</sup>,

Több mint 1400 beteget vizsgáltak multicentrumos vizsgálat során, az alsóvégtagot érintő kritikus végtagiszkémia miatti stent graft beültetése utáni terápia hatékonyságának ellenőrzésére. Béta adrenerg receptor blokkoló, sztatin és aggregáció gátló kezelés

hatékonyságát vizsgálták az egy éves mortalitásra. Egyedül a statinkezelés javította szignifikáns módon a túlélést<sup>101</sup>.

Abban a néhány vizsgálatban, mely kritikus végtagiszkémia során célul tűzi ki a trombocita funkció monitorozását, arra a következtetésre jutnak, hogy az aspirin kezelés a proatherogén kemokin expressziót, és a TCT aggregáció markereit nem képes csökkenteni perifériás artériás érbetegeknél<sup>102</sup>.

Mohan és munkatársai 2007-ban megjelent közleményükben 14 kritikus végtagiszkémia miatt femoro-popliteális bypass műtéten átesett beteg trombocita funkcióját követték 24 órán keresztül, oly módon, hogy teljes vérben vizsgálták a sponán, az ADP-vel és a szerotoninnal indukált aggregációt, valamint flow citometriás módszerrel vizsgálták a TCT felszíni GP-injeit (P-szelektin, , aktivált GPIIb/IIIa stb). Az eredményeket összehasonlították 14 klaudikáció intermittensz miatt kezelt (300 m-nél hosszabb járástávolság) és 15 olyan betegadataival, akiket 22 (13-112) hónappal korábban operáltak hasonló módon. Valamennyi betegcsoportban jelentős spontán TCT aggregációt mértek és a különböző induktorok jelenlétében mért aggregációjuk is fokozott mértékű volt, az aspirin és a warfarin terápia ellenére is<sup>103</sup>.

Vizsgálataink eredményei felhívják az antioxidáns prooxidáns státusz megváltozásának fontos szerepére a figyelmet, a perifériás artériás érbetegek fokozott tromboziskészségének kialakulásában. Megállapításainkat valószínűsítik azok az irodalomban egyre nagyobb számban megjelenő eredmények, melyek a polifenol típusú antioxidánsok aggregáció gátló hatását bizonyítják<sup>104,105</sup>.

## 5. A TROMBOCITA FUNKCIÓ ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ MONITOROZÁSA DIABÉTESZES PERIFÉRIÁS ÉRBETEGEKEN

### 5. 1. Bevezetés

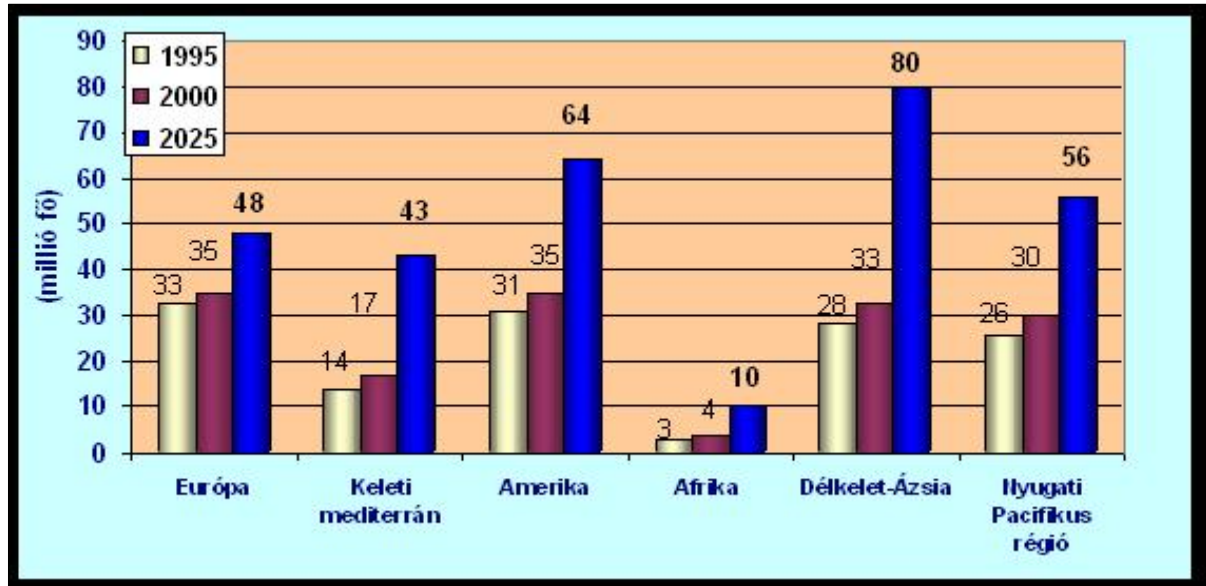
Az orvostudomány egyik fontos mérföldkövét jelentette a XX század 20-as éveiben a Banting és Best által felfedezett inzulin<sup>106</sup>. Néhány évtizeddel később Sir Himsworth H. angol orvos, arra a következtetésre jutott, hogy a kórosan magas vércukor szint két teljesen különböző módon is kifejlődhet, egyfelől inzulin hiányában, másfelől inzulin jelenlétében, és így javasolta az inzulinra érzékeny és az inzulinra rezisztens diabétesz mellitusz megkülönböztetését<sup>107</sup>. Megállapításait később Bornstein és Lawrence erősítették meg<sup>108</sup>.

A múlt század harmadik nagy felfedezése Hollenback és Reaven nevéhez fűződik, miszerint az inzulin vércukorcsökkentő hatása iránt az emberek különböző mértékben érzékenyek, és így az inzulin által stimulált glükóz felvételük is különböző lehet<sup>109</sup>.

Napjainkban az egészségügyi világszervezet, a WHO, két fő formáját különbözteti meg a diabétesz mellitusznak. Ha a magas vércukorszint oka a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben levő  $\beta$ -sejtek destrukciója és elégtelen inzulin termelése, mely lehet veleszületett, és/vagy autoimmun reakció miatti elégtelenség, akkor 1-es típusú (T<sub>1</sub>DM) diabéteszről beszélünk. A diabéteszes betegek 10%-át teszi ki ez az abszolút inzulinhiánnyal járó betegség, mely iránt egyes populációk, például a Finnek, jóval fogékonyabbak, mint a többiek<sup>110</sup>.

Ha a hiperglikémia a nyugati életstílus és táplálkozási szokások, valamint genetikai hajlam együttes következményeként alakul ki, és inzulin rezisztenciával jár együtt, akkor 2-es típusú diabéteszről (T<sub>2</sub>DM) van szó. A T<sub>2</sub>DM heterogén, multifaktoros, poligenetikus betegség, melyet az inzulin szekréció elégtelensége, relatív inzulin hiány és inzulin rezisztencia jellemez, és magas vércukorszinttel párosul. Jellemzője még a vérplazma magas szabadzsírsav (FFA) szintje és gyakran jár együtt hipertóniával. Míg a T<sub>1</sub>DM az összes diabétesz elenyésző hányadát teszi ki (bár az elmúlt 50 évben növekedett az előfordulása), addig a T<sub>2</sub>DM betegség megjelenése napjainkban csaknem eléri a járvány szintjét. Ha a

jelenlegi trend nem változik, 2025-re több mint 300 millió diabéteszes beteg él majd a Földön (21. Ábra).



**21. ábra. A kettéstípusú, T<sub>2</sub>DM, előfordulási gyakoriságának változása (WHO becslés, 1999.)**

A legnagyobb változás Délkelet-Ázsiában várható, de a diabéteszes populáció európai növekedésére is számítani kell. Ez tesz minden újabb adatot fontossá, ami a betegség legyőzéséhez hozzájárulhat.

A diabétesz mellitusz önálló rizikó tényezője a kardiovaszkuláris morbiditásnak és mortalitásnak. A diabétesz mikroangiopátiához köthető szövődményei (nefropátia, retinopátia, neuropátia) mellett a makroangiopátiás szövődmények legtöbbször, mint amilyen a koszorúerek, a nyaki verőerek és a perifériás artériák betegségei, egyre jobban előtérbe kerülnek, mivel legjobban ezek az érterületek vannak kitéve az ateroszklerózis károsító hatásának. Míg a mikroangiopátiára javítólag hat a szigorú glikémiás kontroll, addig erre a nagyerek tekintetében nincs egyértelmű bizonyíték.

Epidemiológiai evidencia a diabétesz mellitusz és a PAD társulása. A diabétesz jelenlétének időtartama korrelál a PAD súlyosságával. A diabéteszes betegek körében gyakoribb az infrapoplitalis artériás okklúzió, és náluk az intavaszkuláris kalcifikáció is súlyosabb, mint a nem diabéteszes betegeknél<sup>11</sup>. A diabétesz jelenléte férfiakban 3,5-szörösére, míg nőkben

8,6-szorosára növeli az intermittáló klaudikáció gyakoriságát<sup>112</sup>, és a végtag amputáció is gyakoribb diabéteszes, mint a nem diabéteszes betegeknél. Egyes szerzők szerint a diabéteszes betegek alsóvégtagi amputációjának relatív rizikója a nem diabéteszes populációhoz képest 12,4 (95%, 10,9-14,9), és 65 év felett ez a szám csaknem megduplázódik<sup>113</sup>.

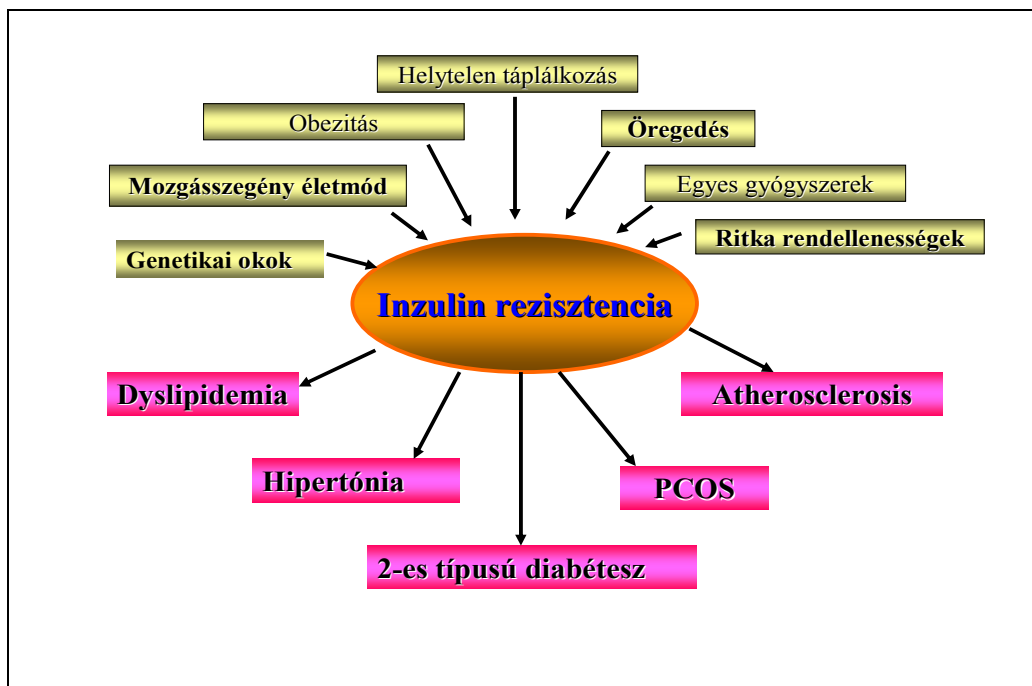
### ***5. 1. 1. Az inzulinrezisztencia kialakulásának elméleti háttere***

A fiziológias glükóz homeosztázis fenntartásához a hasnyálmirigy, a máj (a hepatikus glükóz produkció révén) a vázizomzat és a zsírszövet összehangolt működése szükséges, melyben a legfőbb szabályozó az inzulin.

A glükóz, a többi létfontosságú energiaforrás (zsírsavak és ketontestek,) mellett, kivételes fontosságú. Bizonyos szövetek és sejtek (retina, a vese velőállománya, vörösvérsejt) ugyanis kizárólag ebből nyerik a működésükhöz szükséges energiát, de még az olyan „mindenevő” szerv is, mint a szív, hipoxia esetén elsősorban cukrot használ „üzemanyagként”. A glükóz aktív transzporttal, a glükóz transzporterek (GLUT-ok) segítségével jut be a sejtekbe.

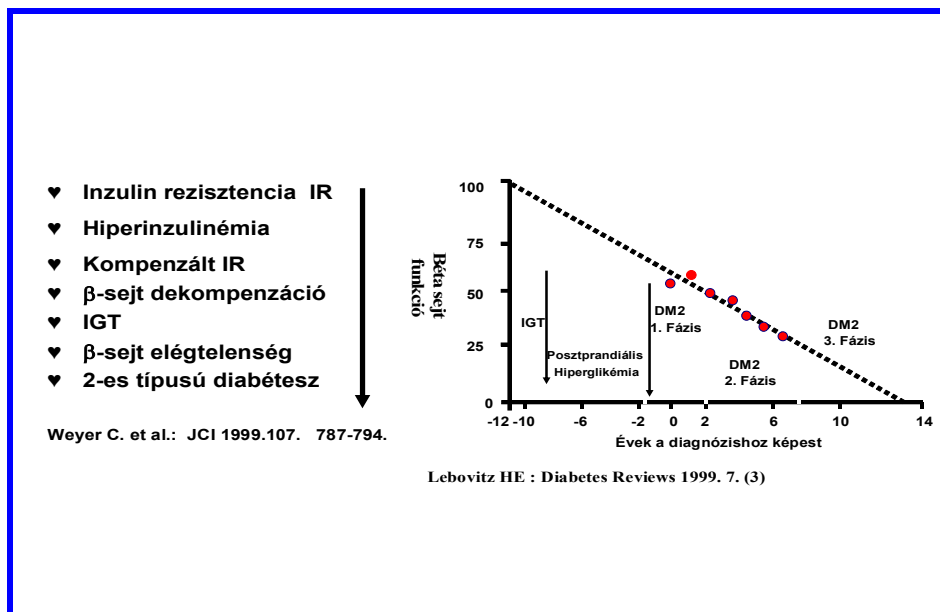
Az inzulinfüggő glükóz transzporter, a GLUT-4 nem fordul elő minden sejtípuson és speciális kompartmentekben helyezkedik el a citoplazmában<sup>114</sup>, ahonnan membránba történő transzlokációját az inzulin receptorfüggő módon szabályozza, miközben számos más intracelluláris folyamatra is hatást gyakorol.

Az inzulin rezisztencia úgy is definiálható, hogy az inzulin a célszerveken (vázizom, szív, zsírszövet, hasnyálmirigy) nem képes a fiziológias hatását kifejteni. Kialakulása soktényezős folyamat. A rezisztencia kialakulása során, a cukoranyagcserét szabályzó rendszerek receptor és posztreceptor szinten is sérülhetnek. Az inzulin rezisztencia talaján idővel számos krónikus betegség (Cushing kór, hiperlipidémia, hipertónia, T<sub>2</sub>DM, policisztás ovárium szindróma (PCOS), akromegália is kifejlődik (22. Ábra). Az abdominális obezitás, inzulin rezisztencia, dizlipidémia és a hipertónia („halálos négyes”) együttes jelentkezését metabolikus szindrómának nevezzük. Ma már ezt a definíciót gyakran kiegészítik a protrombotikus, gyulladással járó állapottal, mint a metabolikus szindróma állandó kísérőjével.



**22. ábra. Az inzulin rezisztencia okai és következményei**

Hosszú évekbe telik, amíg az inzulin rezisztens állapotból kialakul a T<sub>2</sub>DM, mivel az inzulin rezisztenciát a hasnyálmirigy fokozott inzulinintermeléssel még kompenzálni tudja. A hiperinzulinémia árán még évekig fenntartható a normális vércukorszint, melynek nyomán kompenzált inzulinrezisztencia alakul ki, ami végül a hasnyálmirigy fokozatos kimerülését eredményezi. Következményként, az angolszász irodalomban „impaired glucose tolerance” (IGT) néven ismert kórkép jelenik meg, mely végül β-sejt elégtelenséghez és T<sub>2</sub>DM-hez vezet (23. Ábra).

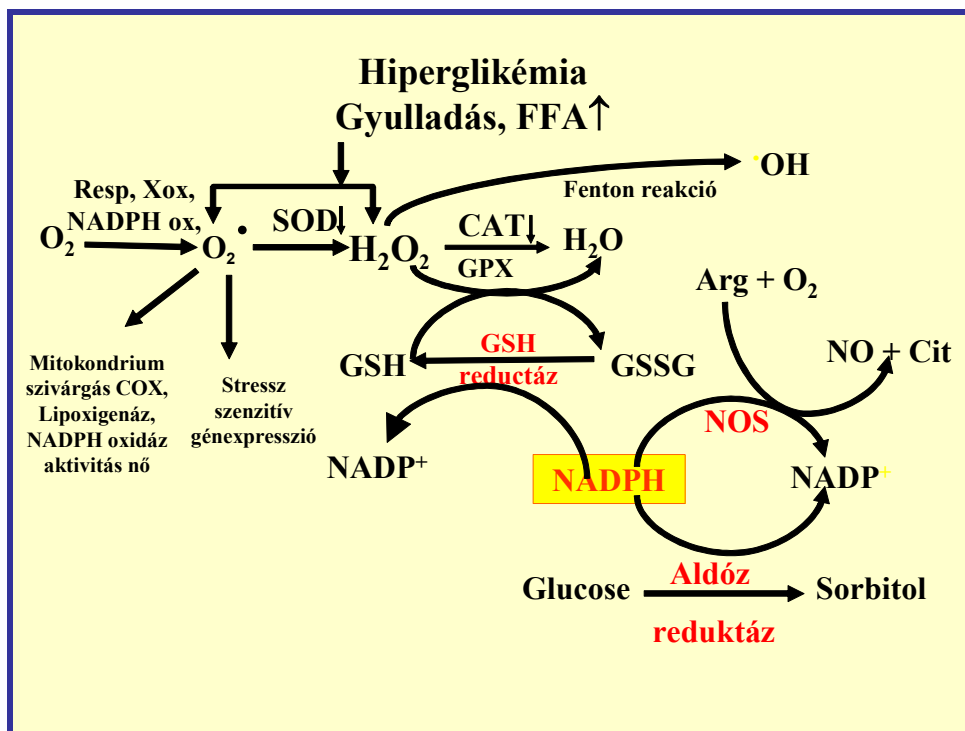


23. ábra. Az inzulín rezisztenciától a T<sub>2</sub>DM-ig.

### 5. 1. 2. A T<sub>2</sub>DM kialakulása és következményei, az inzulín rezisztencia és az oxidatív stressz kapcsolata

A metabolikus eltérések megjelenésétől 10-12 év is eltelhet, mire a betegséget diagnosztizálják. Ilyenkor már csak a kialakult diabéteszt lehet detektálni, ekkorra általában már valamilyen szövődmény is jelen van, leggyakrabban a neuropátia. A diabétesszel együtt járó hiperglikémia talaján kifejlődnek a mikroangiopátiás szövődmények (neuropátia, retinopátia, nefropátia és erektilis diszfunkció), melyek kialakulásában nagy szerepet játszik a redukáló monoszacharidok és az amino csoportot tartalmazó makromolekulák között lezajló, Louis Camille Maillard által 1912-ben leírt, nem enzimatis glikoziláció<sup>115</sup>, és a glükóz autooxidációja. Mindkét esetben nagy mennyiségű oxigén eredetű szabadgyök képződik, és a Maillard-reakció során keletkező előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycosilation endproducts: GES) is részt vesznek a patogenezisben<sup>116, 117</sup>, különösen veszélyeztetve a hosszú féléletidejű fehérjék (pl kollagén, krisztallin, mielin) strukturális és működési integritását.

Míg az inzulinfüggő szövetek nem jutnak megfelelő tápanyaghoz, addig az inzulintól független módon metabolizáló szövetekben (retina, szemlencse, endotélium és az idegek), a fokozott glükóz expozíció hatására megnő az intracelluláris szorbitol és fruktóz szint, mely ozmotikus stresszt jelent a sejt számára. Ennek oka, a magas glükóz szint mellett aktiválódó alternatív cukorlebontrási út két kulcsenzimének (aldóz redukáz és a szorbitol dehidrogenáz) fokozott működése. Ugyanakkor az aldóz redukáz enzimnek a túlműködése fokozott szabadgyök produkcióval is jár, mivel kofaktorként ugyanazt a nikotinamid adenin dinukleotid fosztátot (NADPH-t) használja, melyet a GSH regenerációját végző glutation redukáz, és az endotélium függő simaizom relaxációért felelős NO-szintáz<sup>118</sup>. A magas vércukor- és szabadzsírsav-szint számos módon fokozza a szabadgyök produkciót. Csökkentik a NO biológiai hozzáférhetőségét és a prosztaciklin szintézist, ugyanakkor fokozzák a lipoxigenáz, a ciklooxygenáz (COX) és a NADPH oxidáz aktivitást, ami mitokondriális diszfunkcióhoz vezet<sup>119</sup> (24. Ábra).



24. ábra. Intracelluláris vetélkedés a kofaktorokért.

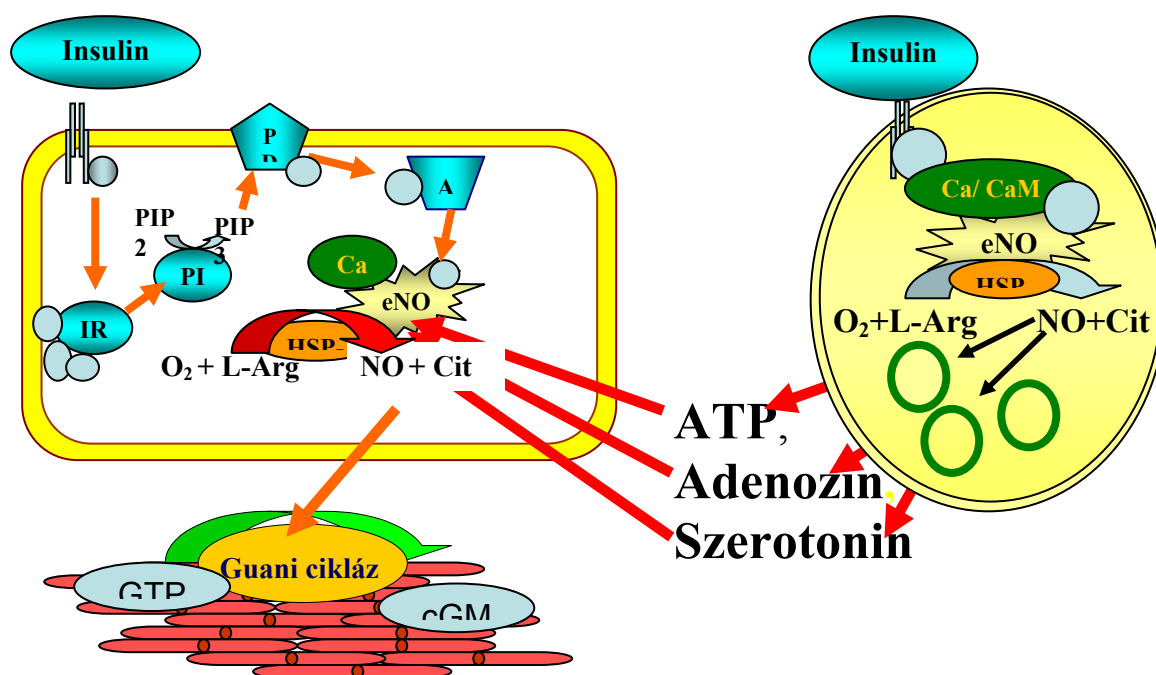
FFA: szabadzsírsav (free fatty acid) Resp: légzési lánc, Xox: xantin oxidáz, SOD: szuperoxid dizmutáz, CAT: kataláz, GPX: glutathion peroxidáz, GSH: redukált glutathion, Arg: arginin,  $H_2O_2$ : hidrogénperoxid, COX: cyclooxygenáz.



A FFA és a glükóz metabolizmus közötti kapcsolatot először Randle PJ és munkacsoportja írta le 1965-ben<sup>120</sup>. Elméletük lényege az volt, hogy az egyik szubsztrát fokozott jelenléte csökkenti a másik oxidációját. Az inzulin a zsírsavak metabolizációját is szabályozza. Inzulin rezisztens állapotban a hormon-szenzitív lipázok kontrollja csökken, az adipocitákban fokozódik a lipolízis és csökken a FFA reészterifikációja, a vérben nő a FFA szint, különösen az éjszakai éhezés során. A vér megemelkedett szabadzsírsav szintje számos módon befolyásolja a cukoranyagcserét<sup>121</sup>.

### ***5. 1. 3. A trombocita funkció változása az inzulin rezisztencia kialakulását követően***

Az endotélium, a szemlencse, a neuronok, és a **vérlemezkék** is az inzulintól független módon veszik fel a cukrot, működésük szabályozásában mégis alapvető szerepet játszik az inzulin. A szénhidrát, és lipidanyagcserére gyakorolt hatásán kívül az inzulin befolyásolja a simaizom tónust az angiogenezist és a hemosztázist is. Direkt vazodilatátor hatását sokan vitatják, bár a vázizom nutritív ereire gyakorolt hatása bizonyított<sup>122</sup>. A vázizomban az inzulin nem csak a véráramlást, hanem a vértérfogatot is növeli, így valódi vazodilatátor hormonnak tekinthető<sup>123</sup>. Az inzulin vazodilatátor hatása mellett, bizonyos körülmények között vazokonstriktor hatást is kifejthet. Az előbbit eNOS –függő, az utóbbit endotelin függő módon, valamint a MAP kináz rendszeren keresztül érvényesíti<sup>124</sup>. Az inzulin trombocita aggregációra gyakorolt hatása mögött a cAMP és cGMP fokozó hatás áll, mely ép endotélium esetén az NO produkció fokozódásához vezet, mely aggregáció gátló hatást eredményez, és a felszabaduló vazoaktív anyagok a simaizom relaxációhoz is hozzájárulnak (26. Ábra).



**26. ábra. Az inzulin hatása TCT-n és endoteliális sejtekben**

IRS-1: inzulin receptor szubsztrát-1, PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz, PIP2: foszfatidilinozitol-4,5-difoszfat, PIP3: foszfoinozitol-3,4,5-trifoszfat, Ca/CaM: kalcium/kalmodulin, HSP-90 hőszokk protein 90, L-Arg: L-arginin, Cit: citrullin, GTP: guanil-trifoszfat, cGMP: ciklikus guanil-monofoszfat, P: foszfat csoport.

## 5. 2. Anyagok és módszerek:

### 5. 2. 1. Betegek

Vizsgálatainkba a Baranya Megyei Kórház perifériás érbeteg ambulanciáján megjelent betegek közül (összesen 46 beteg, a következő megoszlásban: 24 T<sub>1</sub>DM (18 férfi, 6 nő); átlagéletkoruk  $69,0 \pm 2,3$  év), valamint 22 T<sub>2</sub>DM (18 férfi, 4 nő; átlagéletkoruk  $65,7 \pm 3,7$  év)) beteget vontunk be. Egészséges kontrollként 11 anonim véradó vérért használtuk (8 férfi, 3 nő; átlagéletkoruk  $33,0 \pm 6,7$  év). Valamennyi beteg és önkéntes véradó írásban egyezett bele a vizsgálatok elvégzésébe.

Antidiabetikus kezelésként a T<sub>1</sub>DM betegek inzulint kaptak, pontosan meghatározva az alkalmazás körülményeit. A T<sub>2</sub>DM betegek, két kivétellel, akik előrehaladott diabéteszük miatt inzulint kaptak, kombinált orális antidiabetikus terápiában részesültek. Aggregációgátlót valamennyi beteg kapott. Antikoaguláns szerként a T<sub>1</sub>DM csoportban 4

beteg Syncumart, 14 beteg, pedig alacsony molekulatömegű heparint (LMWH) kapott. A T<sub>2</sub>DM csoportban aggregációgátlót valamennyi beteg szedett. Antikoaguláns szerként a T<sub>1</sub>DM betegek közül 4 Syncumart, 10 beteg, pedig LMWH kezelést kapott. A betegcsoportok gyógyszerelésében alapvető különbség csak az antidiabetikus terápiában volt (5. Táblázat). A társbetegségek aránya a két csoportban megegyezett, és a dohányosok aránya sem különbözött szignifikánsan.

**5. Táblázat: Az 1-es és 2-es diabéteszes érbetegeknél alkalmazott gyógyszerek**

<b>Gyógyszerek</b>	<b>T<sub>1</sub>DM</b>	<b>T<sub>2</sub>DM</b>
<b>Aggregáció gátló (Aspirin protect vagy Astrix)</b>	<b>24 / 24</b>	<b>22 / 22</b>
<b>Antikoaguláns (Syncumar)</b>	<b>4 / 24</b>	<b>4 / 22</b>
<b>Antikoaguláns (LMWH)</b>	<b>12 / 24</b>	<b>10 / 22</b>
<b>Antihipertenzív</b>	<b>18 / 24</b>	<b>18 / 22</b>
<b>Inzulin</b>	<b>24 / 24</b>	<b>2 / 22</b>
<b>Orális antidiabetikum</b>	<b>0 / 24</b>	<b>20 / 22</b>
<b>Egyéb</b>	<b>24 / 24</b>	<b>22 / 22</b>

*5. 2. 2. A trombocita aggregáció vizsgálata*

A betegektől és az egészséges önkéntesektől vérvételre csak egyszer került sor. A TCT aggregáció, és a szabadgyök termelés méréséhez (2 x 5 ml) Na-citráttal alvadásgátló, az antioxidáns enzimek méréséhez, és a MDA meghatározáshoz (1x5ml) EDTA-val alvadásgátló vért vettünk (Vacutainer; Becton Dickinson, UK).

A TCT funkcióra vonatkozó méréseket, a vérvételt követő 3 órán belül elvégeztük. A vérképet Minitron típusú automata készülékkel detektáltuk. A plazma glükóz, triglicerid és koleszterin tartalmát a Diagnosticum Rt által forgalmazott Glükóz GOD/PAP, Triglicerid PAP, és Koleszterin PAP reagensekkel, fotometriásan mértük, a reagensek felhasználói útmutatója szerint.

#### ***- A trombocita funkció vizsgálata trombocitadús plazmában (PRP)***

A trombocita funkciót PRP-ben Born módszere szerint vizsgáltuk, Carat TX4 aggregométerrel és mint az előzőekben (ld. 27. oldal) ADP-t (5 és 10  $\mu\text{M}$ ) és kollagént (2  $\mu\text{g/ml}$ ) használtunk inductorként.

#### ***- Trombocita funkció vizsgálata teljes vérben***

A TCT funkciót Chrono-Log aggregométerrel határoztuk meg. Inuktorként ADP-t (5  $\mu\text{M}$ ) és Kollagént (2  $\mu\text{g/ml}$ ) használtunk.

A méréseket folyamatos keverés (400 rpm) mellett 37 °C-on végeztük, a 28. oldalon megadott leírás szerint.

#### ***5. 2. 3. Prooxidánsok vizsgálata:***

*- PMA-val indukált szabadgyök termelés meghatározása teljes vérben.*

A már ismertett módszer szerint végeztük a vizsgálatokat (28. oldal).

*- MDA szint meghatározás hemolizátumban*

A lipid peroxidációt fotometriás módszerrel határoztuk meg, a korábban (28. oldal) leírt módon.

#### ***5. 2. 4. Antioxidánsok vizsgálata:***

*- SOD és GSH mérése*

A SOD aktivitást (28. oldal) és a GSH mennyiségét (31. oldal) a korábban leírtak szerint fotometriás módszerrel mértük.

### **5. 2. 5. INR érték és fibrinogén koncentráció:**

A protrombin idő nemzetközi normalizált rátát (INR) és a fibrinogén szintet a trombusképződés rizikójának felméréséhez használják. Vizsgálatunk során az antikoaguláns terápia hatékonyságát becsültük meg a két paraméter meghatározásával.

A méréseket a PTE ÁOK Központi Laboratóriumában végezték, az általuk használt protokollok alapján.

### **5. 2. 6. Statisztika:**

Eredményeinket a mérések átlaga  $\pm$  az átlag szórása (SE) formátumban adtuk meg. A minták összehasonlítására Student-féle egy- és kétmintás t-tesztet alkalmaztunk. A görbe alatti területeket Microcal/Origin 6.0 professional program segítségével számítottuk ki. Ugyanezzel a programmal korrelációs számításokat végeztünk a vércukorszintek és a teljes vérben ADP-vel, illetve a kollagénnel indukált aggregációs görbék görbe alatti területei között. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

### 5. 3. A perifériás diabéteszes érbetegek vizsgálatának eredményei

A betegek klinikai kémiai paramétereit a 6. Táblázat foglalja össze.

#### 6. Táblázat: A két betegcsoport klinikai kémiai paramétereinek átlagértékei

Betegcsoport	Glükóz	Triglicerid	Koleszterin
T <sub>1</sub> DM	11,4 ± 1,6	1,9 ± 0,3	4,3 ± 0,6
T <sub>2</sub> DM	7,3 ± 0,7	4,3 ± 1,4	5,2 ± 0,7
Egészséges	4,82 ± 0,27	1,1 ± 0,15	4,2 ± 0,5
Normálérték	4,2-6,1 mmol/l	0,4-1,7 mmol/l	3,7-5,2 mmol/l

A betegek vércukor, triglicerid értékei lényegesen magasabbak voltak a normálértéknél. Az átlagos koleszterin szint a normálértéken belül volt, bár a csoport betegei között a normálértéknél magasabb értékek is előfordultak. A fokozott aggregabilitás rizikótényezőjeként kell említenünk a mindkét csoportban megemelkedett fibrinogén szintet is <sup>125</sup>, mely az általunk vizsgált betegek esetében is magasabb volt a normál értéknél (7. Táblázat).

A betegcsoportokban a hemoglobin és hematokrit érték alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban mért, de a különbség csak a T<sub>1</sub>DM csoport betegeinek esetében bizonyult statisztikailag is szignifikánsnak (hemoglobin: p<0.01, hematokrit: p<0.05). A T<sub>1</sub>DM csoportban volt a legmagasabb a fehérvérsejtszám (11,2 ± 1,3 x 10<sup>4</sup> sejt/μl<sup>3</sup>). Értéke szignifikánsan különbözött a Kontroll csoportban mértől (6,71 ± 0,32 x 10<sup>4</sup> sejt/μl<sup>3</sup>), (p<0.01). A T<sub>2</sub>DM csoportban a fehérvérsejtszám 8,92 ± 0,99 x 10<sup>4</sup> sejt/μl<sup>3</sup> volt, és ez az érték nem különbözött szignifikánsan a másik két csoportban mértől.

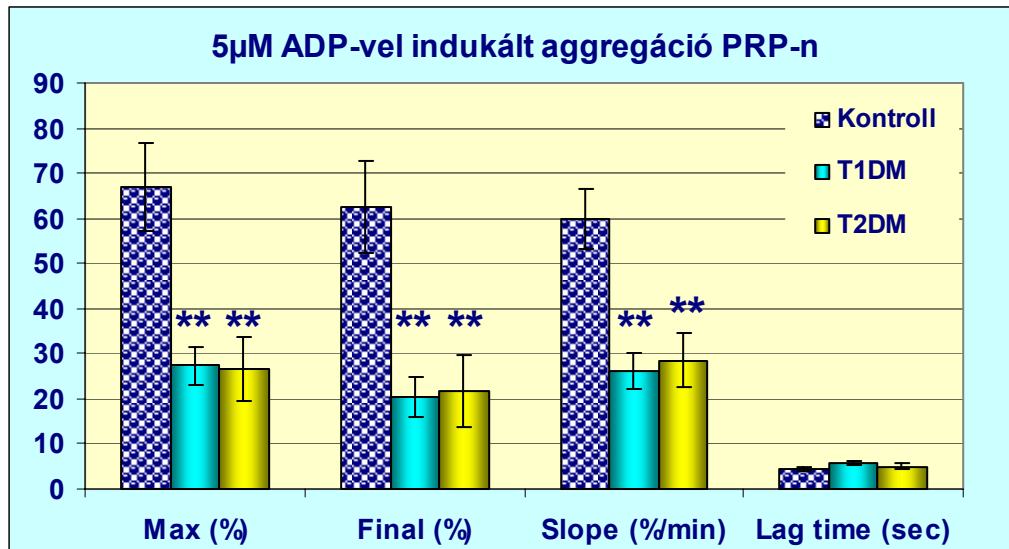
#### 7. Táblázat: INR és fibrinogén értékek

Csoportok	INR	Fibrinogén (g/l)
T <sub>1</sub> DM	1,2 ± 0,1	5,8 ± 0,7
T <sub>2</sub> DM	1,1 ± 0,1	7,3 ± 0,7
Egészséges	1,06 ± 0,24	3,22 ± 1,22
Normálérték	0,81-1,13	2-4,4

A vizsgálatokba bevont diabéteszes perifériás érbetegek átlagértéke sem a T<sub>1</sub>DM, sem a T<sub>2</sub>DM csoport INR illetve fibrinogén szintje nem volt a normál tartományban.

### 5. 3. 1. A trombocita aggregáció vizsgálatok eredményei izolált trombocitákon

Megközelítőleg azonos trombocitaszám mellett jelentős különbségeket tapasztaltunk a betegcsoportok és a **Kontroll** csoport között az ADP-vel indukált aggregációban (27. ábra).



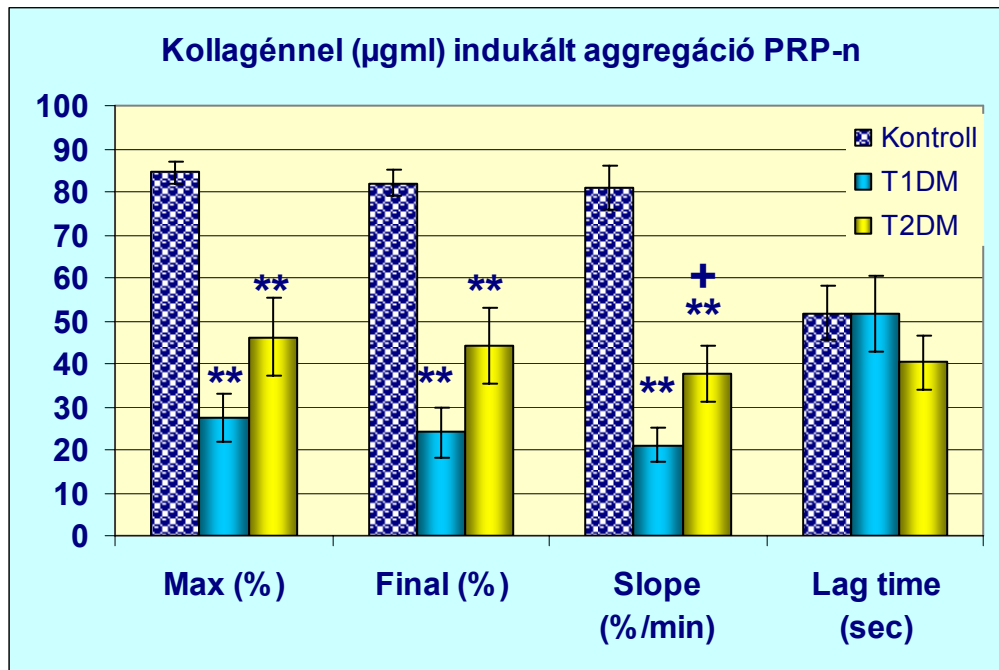
27. ábra. Az ADP-vel (5 µM) indukált aggregáció PRP-n

A feltüntetett paraméterek: **Max**: az aggregáció maximuma %-ban, **Final**: a mérés befejeztével (8 perccel az indukció után) mért aggregáció %-ban megadva, **Slope**: az aggregációs görbe felszálló szárának meredeksége, **Lag time** az induktor mintához történő hozzáadása és az aggregáció megindulása között eltelt idő. \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll.

A betegcsoportokban az ADP-vel indukált aggregáció mértéke (Max (%) és Final), és az aggregációs görbe felszálló szárának meredeksége alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban mért. A 10 µM ADP-vel indukált aggregáció ezzel csaknem teljesen megegyező eredményre vezetett (az adatok nem láthatók). Megítélésünk szerint mindez az aggregáció gátló terápia hatékonyságának köszönhető.

A kollagénnel indukált aggregáció a két betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a **Kontroll** csoportban ( $p < 0.01$ ) mért. A Max(%) és a „Final” aggregáció és a Slope is, mindkét betegcsoportban alacsonyabb, mint a **Kontroll** csoportban mért. A T<sub>2</sub>DM csoportban a Max és a Final aggregáció magasabb értéket mutatott, mint a T<sub>1</sub>DM

csoportban, de a különbség nem volt szignifikáns, a Slope esetében tapasztalt különbség viszont szignifikánsnak bizonyult (28. Ábra).



28. ábra. A kollagénnel (2µg/ml) indukált aggregáció PRP-n  
 \*\* =  $p < 0,01$  vs kontroll, + =  $p < 0,05$  vs T<sub>1</sub>DM

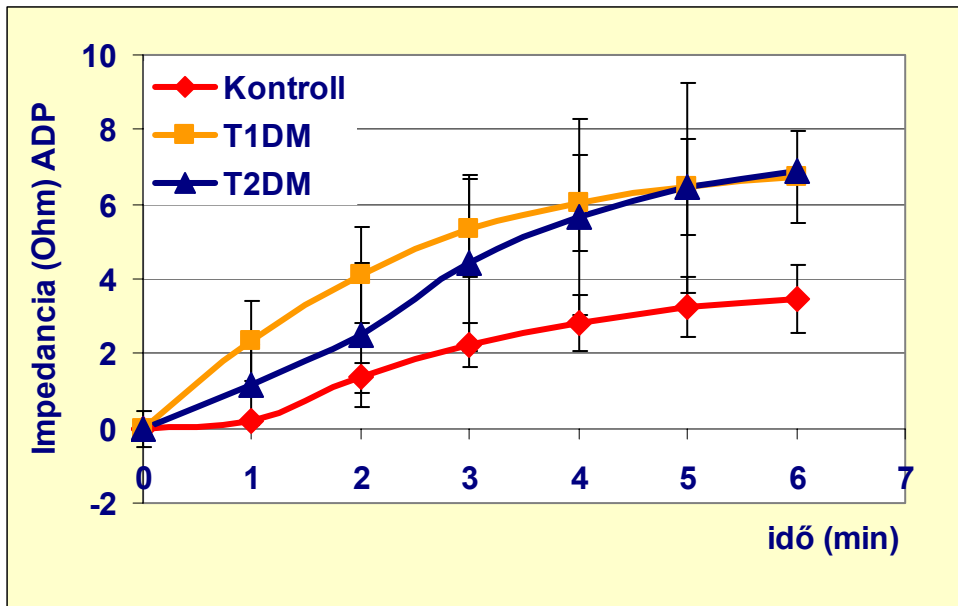
### 5. 3. 2. Trombocita aggregáció vizsgálatok teljes vérben

Az impedancia mérésen alapuló aggregáció mérési technika kevésbé használatos, szemben az izolált trombocitákon végzett vizsgálatokkal. Saját méréseink azonban arra irányították rá a figyelmet, hogy a két mérés párhuzamos alkalmazása hasznos, új eredményeket hozhat.

A teljes vérben ADP-vel indukált aggregációban azt a fajta csökkent aggregábilítást, amit izolált trombocitákon mértünk, már nem tapasztaltuk. Az ADP-vel indukált aggregáció átlaga a két betegcsoportban az induktor hozzáadása utáni 6. percben csaknem a duplája a kontroll csoportban mértnek (29. Ábra). A különbség azonban statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak.

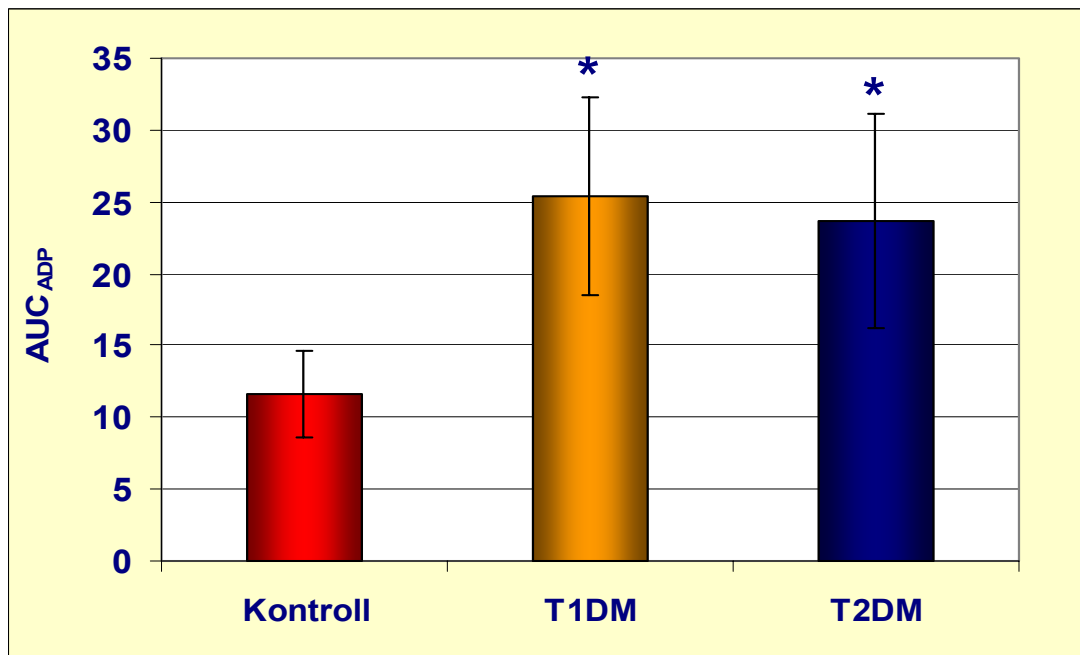
Ezért minden esetben meghatároztuk a görbe alatti területeket (30 - 32. Ábra).





29. ábra. ADP-vel ( $5 \mu\text{M}$ ) indukált aggregáció teljes vérben, az idő függvényében

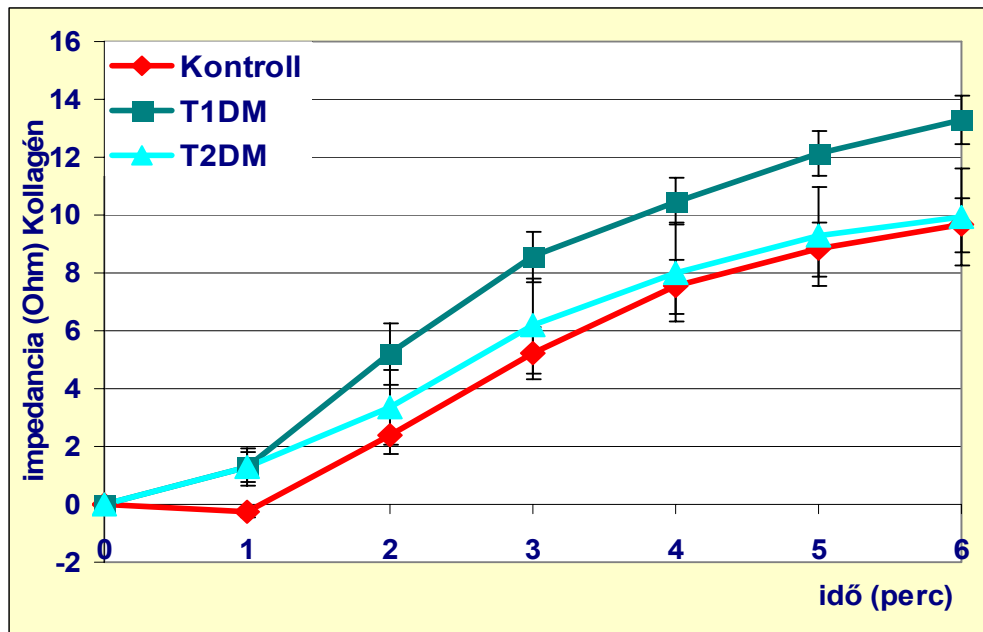
Mindkét betegcsoportban az aggregáció jelentősen emelkedett volt a Kontrollhoz képest



30. ábra. ADP-vel ( $5 \mu\text{M}$ ) teljes vérben indukált aggregáció görbe alatti területei

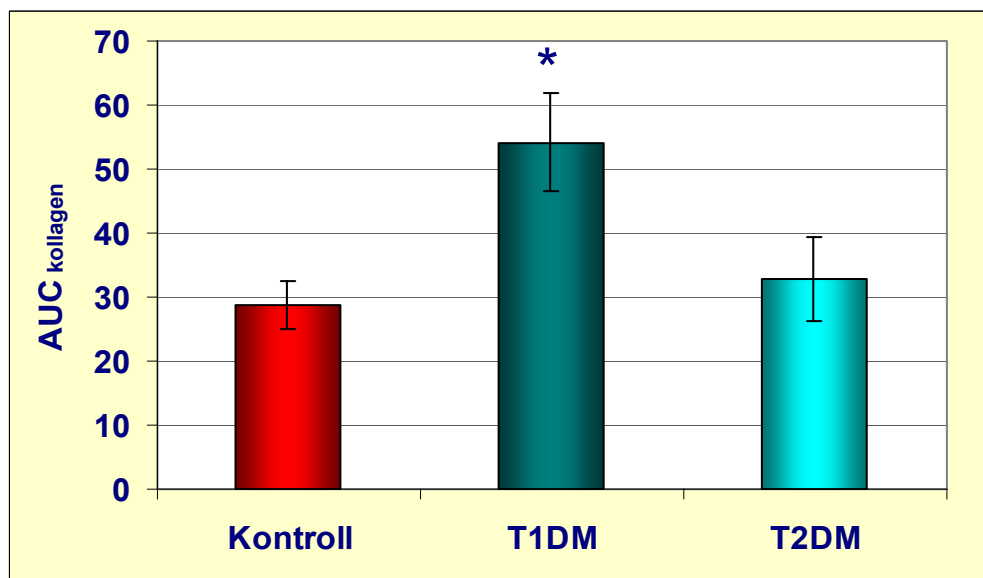
A görbe alatti területek (AUC) értékei alapján szignifikáns különbséget találtunk a kontroll és a diabéteszes betegek ADP-vel indukált aggregációja között. A két diabéteszes csoport aggregációja azonban egymástól nem különbözött.

A kollagén szinte azonos mértékű aggregációt indukált a T<sub>2</sub>DM és a Kontroll csoportban. A T<sub>1</sub>DM csoportban az aggregáció mértéke meghaladta a Kontroll és T<sub>2</sub>DM csoportban mért értékeket (31. ábra).



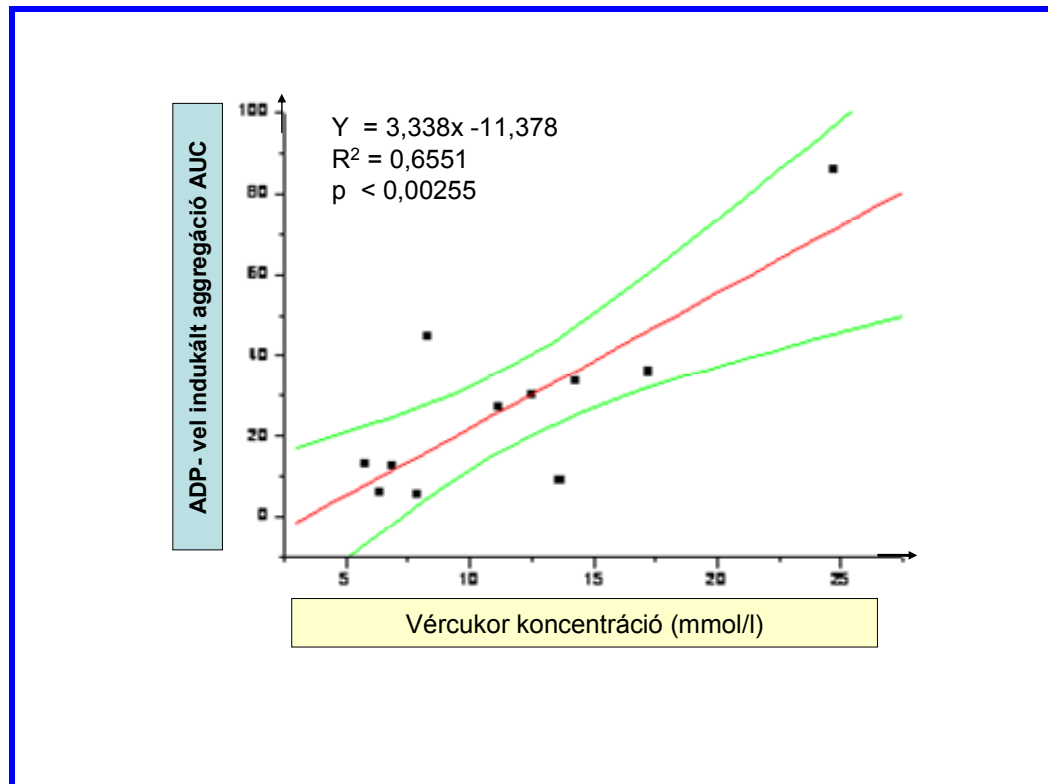
**31. ábra. Kollagénnel (2 µg/ml) indukált aggregáció teljes vérben.**

A kontrollhoz képest a T<sub>1</sub>DM betegek trombocita aggregációja minden vizsgált időpontban magasabb, de a különbség statisztikailag nem szignifikáns.



**32. ábra. A kollagénnel (2 µg/ml) teljes vérben indukált aggregáció görbe alatti területei** \* =  $p < 0,05$ , # =  $p < 0,05$  vs T<sub>2</sub>DM  
A görbe alatti terület alapján a T<sub>1</sub>DM betegcsoportban a kontroll csoporthoz és a T<sub>2</sub>DM csoporthoz képest is szignifikánsan fokozottabb aggregációt mutattunk ki ( $p < 0,05$ ).

A vizsgálatok során korrelációt számoltunk a teljes vérben detektált görbe alatti területek és a betegek vércukor értékei között mind az ADP-vel, mind a kollagénnel indukált aggregáció esetében, és szignifikáns lineáris korrelációt találtunk T1DM betegek teljes vérében az ADP-vel indukált aggregáció során detektált görbe alatti terület és a betegek vércukorértékei között (33. ábra). A többi csoportban ilyen összefüggést nem találtunk.



**33. ábra** A vércukor koncentráció (mmol/l) és az ADP vel teljes vérben indukált aggregáció között lineáris korrelációt mutattunk ki ( $p < 0,002$ ).

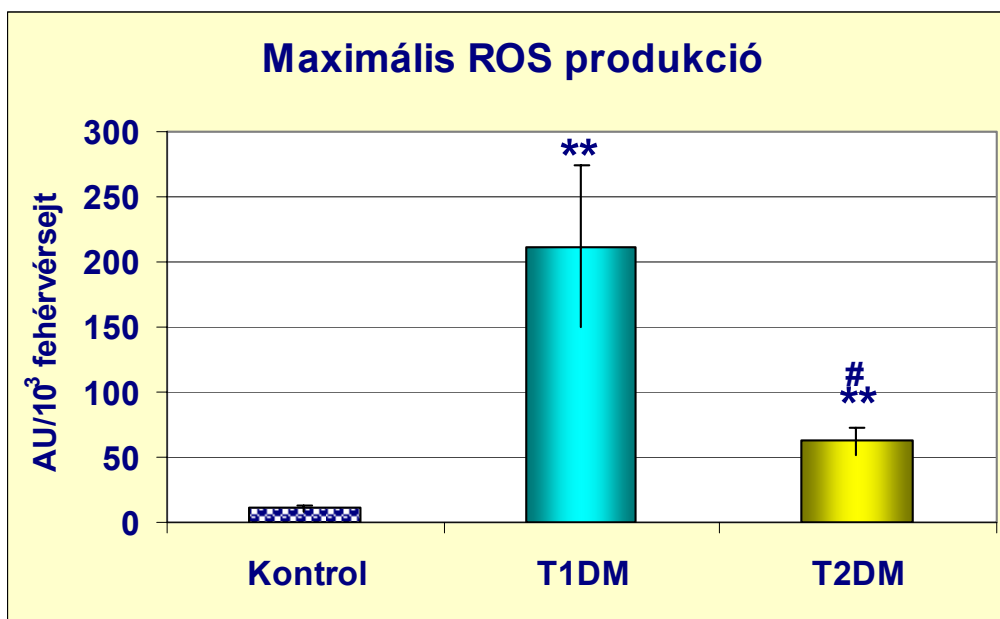
### 5. 3. 3. Prooxidánsok vizsgálatának eredményei

- PMA-val indukált szabadgyök termelés:

A kontroll csoportban a fehérvérsejtszámra korrigált szabadgyök produkció minimálisnak bizonyult ( $9,072 \pm 2,36$  AU/ $10^3$  fehérvérsejtszám). A legintenzívebb szabadgyök termelést a T<sub>1</sub>DM csoportban mértük. Itt a gyöktermelés maximuma mind a Kontroll, mind a T<sub>2</sub>DM csoport maximumát szignifikánsan meghaladta ( $p < 0,01$  vs. kontroll;  $p < 0,05$  vs T<sub>2</sub>DM).

A gyöktermelés maximuma a T<sub>2</sub>DM csoportban is magasabb volt a Kontroll csoportban mért értéknél ( $p < 0,05$  vs kontroll) (34. Ábra).

A betegcsoportokban a „lag time” rövidült és a gyöktermelési görbe felszálló szárának meredeksége nőtt a kontroll csoportban mérthez képest, de a különbségek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak.



34. ábra. A PMA-val indukált, fehérvérsejtszámra korrigált szabadgyök termelés maximuma

\* =  $p < 0,05$  vs Kontroll, \*\* =  $p < 0,05$  vs Kontroll, # =  $p < 0,05$  vs T<sub>1</sub>DM

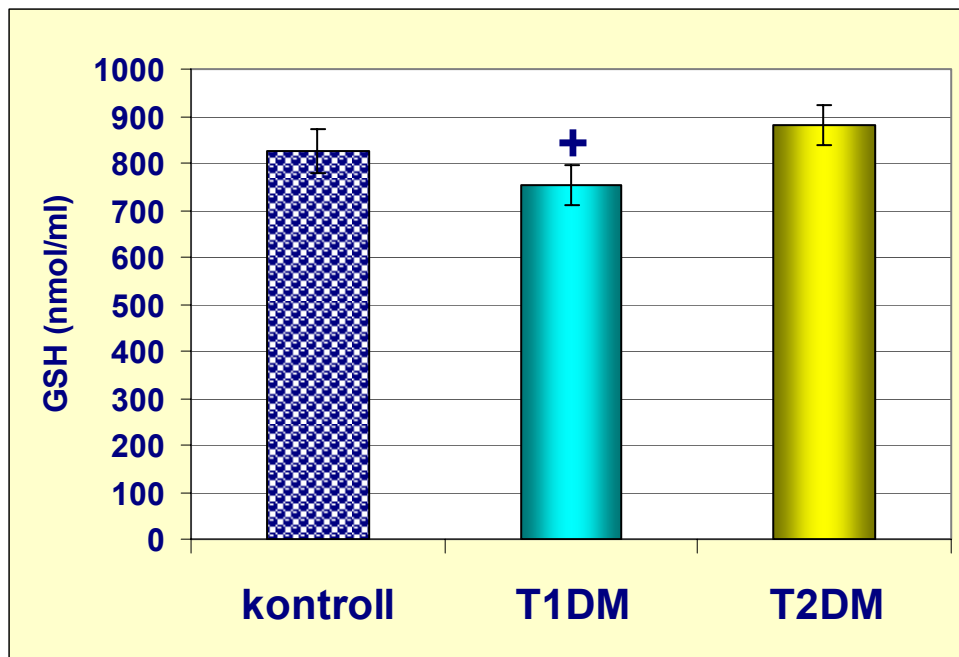
A T<sub>1</sub>DM csoportban a gyöktermelés maximuma hússzorosa volt a kontroll csoportban mértnek, míg a T<sub>2</sub>DM csoportban ez az érték csak ötszörös volt.

- MDA szint hemolizátumban

A három csoport MDA szintje között statisztikailag szignifikáns különbség nem volt.

#### 5. 3. 4. Antioxidánsok vizsgálatának eredményei

A klinikai vizsgálatok második sorozatában az antioxidáns rendszert a SOD és GSH értékekkel jellemeztük.



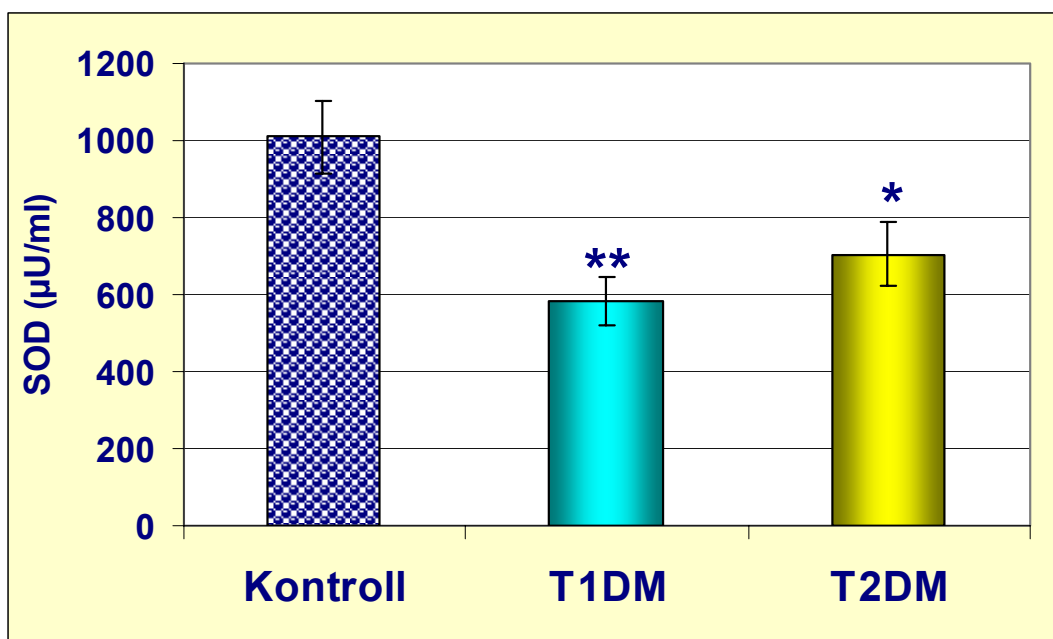
35. ábra A redukált glutathion mennyisége + =  $p < 0.5$  vs. T<sub>2</sub>DM

A T<sub>1</sub>DM csoport GSH szintje kis mértékben, de szignifikánsan alacsonyabb, mint a T<sub>2</sub>DM csoportban mért. A Kontroll és a T<sub>2</sub>DM csoportban a GSH szint nem különbözik.

- Szuperoxid dizmutáz aktivitás

Mindkét betegcsoportban csökkent SOD aktivitást tapasztaltunk, mely különösen a T<sub>1</sub>DM csoportban volt kifejezett (36. Ábra).

A diabétesz által okozott szisztémás oxidatív stressz és oxidatív károsodás kialakulásában fontos komponens az elégtelen SOD működés, mely a mi vizsgálatunkban is megmutatkozott. Vizsgálataink szerint a SOD aktivitás csökkenése a diabétesz típusától függetlenül bizonyult. Egyes kutatók szerint a patológiás helyzetekben tapasztalható elégtelen SOD működés hátterében a kofaktor hiány is szerepet játszik<sup>126</sup>.



36. ábra. A SOD aktivitás \* =  $p < 0,05$  vs. kontroll, \*\* =  $p < 0,01$  vs. kontroll

#### **5. 4. Eredmények összefoglalása és következtetések:**

A diabétesz mellitusz legfőbb jellemzői az éhgyomri hiperglikémia, és az ateroszklerotikus szövődmények magas kockázata, mely a koszorúsereket, az agyi keringést és a perifériás ereket egyaránt érinti. A diabétesz mellitust protrombotikus állapotként is jellemzik. Számos közlemény emeli ki az aggregációgátló terápia fontosságát az iszkémiás események elkerülésében, mégis a diabéteszes betegek a mai napig fokozott rizikójú csoportot képeznek az iszkémiás események tekintetében<sup>127</sup>. Evidenciákat találunk arra nézve is, hogy a fokozott trombózishajlam már az inzulinrezisztencia állapotában is jelen van<sup>128</sup>. Hátterében a fibrinolitikus faktorok csökkenése, és a fibrinolízis inhibitorok koncentrációjának növekedése áll<sup>129</sup>. A XII-es és VII-es koagulációs faktorok fokozott mennyisége szintén asszociálódik az inzulin rezisztenciával.

A plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) szintjének növekedését azonban nem a hiperglikémia, hanem a magas triglicerid szint szabályozza a PAI-1 gén promóter régióján keresztül<sup>130</sup>.

Az endotélium diszfunkció, mely csökkent NO produkcióval és elégtelen NO-mediált vazodilatációval jár, szintén kísérője az inzulin rezisztenciának. Hátterében az elégtelen NO produkció és prosztaciklin szintézis áll. Ezen felül a vérlemezkék rezisztenciája is nő (más okból) az endotélium aggregációgátló hatásával szemben. Így az endotélium és a trombociták felől is a trombusképzést támogató mechanizmusok kerülnek előtérbe. Ugyanakkor bizonyos véralvadási faktorok szintje is emelkedett. A hiperglikémia és az általa okozott nem enzimatis glikoziláció befolyásolja a fibrin molekulák struktúráját és funkcióját is, mely denzebb és a fibrinolitikus stimulusokkal szemben rezisztensebb alvadékot eredményez<sup>123</sup>.

Az Aszpirin a trombózis profilaxisában leggyakrabban és legeredményesebben használt antitrombotikus gyógyszer, mely irreverzibilisen gátolja a TXA<sub>2</sub> keletkezését. A TXA<sub>2</sub> keletkezése azonban nem az egyetlen mechanizmus, ami a vérlemezke aggregációt indukálja. A magas ADP, adrenalin koncentráció, a shear stressz szintén trombocita

aggregációhoz vezet. Így nem meglepő, amikor olyan adatokat találunk, hogy az Aszpirinnel kezelt betegeknek csak 25%-a válaszol megfelelő módon a terápiára.

A vizsgálatainkba bevont diabéteszes perifériás artériás érbetegeket a Baranya Megyei Kórház Érsebészeti Osztályának ambuláns betegei közül random módon választottuk.

Jelen vizsgálatainkat úgy folytattuk le, hogy a betegek a megszokott gyógyszereik hatása alatt álltak. Aggregációgátlót (mono-, vagy kombinációs terápiában) valamennyi beteg szedett, valamint mindkét diabéteszes csoportban a betegek több mint fele antikoaguláns terápiában is részesült. A trombocitafunkció heparin jelenlétében történő változásairól több mint 30 évre visszamenőleg találunk meglehetősen ellentmondásos közléseket. Egészséges önkénteseken Heinrich D és munkatársai kimutatták, hogy a frakcionálatlan heparin aktiválja a trombocitákat, míg az alacsony molekulatömegű heparin aggregáció fokozó hatása 3000 dalton alatt megszűnik<sup>131</sup>.

Mi tulajdonképpen az alkalmazott terápia hatékonyságát monitoroztuk izolált trombocitákon és teljes vérben (A betegek gyógyszerelését az 5. táblázat foglalja össze).

A beválogatott betegek metabolikus státusát jellemezte, hogy, éhgyomri vércukor, és triglicerid szintjük meghaladta a normálértékeket. (6. Táblázat, 61. oldal).

Az izolált vérlemezkéken végzett vizsgálataink jól demonstrálták, hogy az aggregáció gátló terápia a trombociták szintjén hatékonyak bizonyult, hiszen mind az ADP-vel (27. ábra, 63. oldal), mind a kollagénnel (28. ábra, 64. oldal) indukált aggregáció tekintetében szignifikáns aggregáció gátlást detektáltunk a Kontroll csoporthoz képest, bár a csökkenés mértéke a T<sub>2</sub>DM csoportban kisebb mértékű volt, mint a T<sub>1</sub>DM csoportban. Az aggregációs görbe felszálló szárának meredeksége pedig szignifikánsan magasabb volt a T<sub>2</sub>DM csoportban, mint ahogy azt a T<sub>1</sub>DM csoportban detektáltuk.

Teljes vérben végzett aggregáció méréseink alapján azonban nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a három csoport között, sem az ADP-vel (29. ábra, 65. oldal) sem a kollagénnel indukált (31. ábra, 66. oldal) aggregáció tekintetében, így az aggregáció gátló terápia hatékonysága teljes vérben nem volt igazolható.



A mai napig is vita övezi azt a kérdést, hogy van-e direkt asszociáció a vércukorszint, és a trombocita aggregáció között. Jelen vizsgálatunkban pozitív szignifikáns korrelációt mutattunk ki az ADP-vel indukált aggregációs görbe alatti terület és az éhgyomri vércukorszint között, T<sub>1</sub>DM betegeknél (33. ábra, 67. oldal).

A kapott eredmények így arra engednek következtetni, hogy a teljes vérben mért fokozott aggregábilisért nem az aggregáció gátló terápia elégtelen volta a felelős, hiszen a trombociták szintjén megfelelő aggregáció gátlást mutattunk ki. Sokkal inkább feltételezhető a megváltozott környezet szerepe az aggregáció fokozódásban, és az egyébként hatékony aggregáció gátló terápia teljes vérben tapasztalható semlegesítésében. Vallas és munkatársai vizsgálták az aszpirin rezisztencia hátterében zajló folyamatokat és megállapították, hogy a vérlemezkék reaktivitása vaszkuláris betegek és iszkémiás szívbetegek vörösvértesteinek jelenlétében fokozódik<sup>132</sup>

Watala és munkatársai pedig kimutatták, hogy a diabétesz során fokozódó protein glikoziláció együttjár az Aszpirin által mediált fehérje acetiláció csökkenésével, és az Aszpirinnel szembeni rezisztencia kialakulásával<sup>133</sup>.

A megemelkedett fehérvérsejt szám, a fehérvérsejtek fokozott szabadgyök termelése (34. ábra, 68. oldal) szintén szerepet játszhat az aggregáció gátlás teljes vérben mindkét betegcsoportban detektált hiányának. A reaktív oxigén intermedierek az LDL oxidációja révén is fokozni képesek a TCT aggregációt. A SOD, csökkent aktivitása (36. ábra, 70. oldal), mely a fehérvérsejtek ROS termelését már nem tudja semlegesíteni, szintén hozzájárul az aggregáció fokozódásához. Ugyancsak ehhez járul hozzá plazma magas fibrinogén szintje (7. Táblázat) a másodlagos hemosztázis aktivitás fokozódása által, és valószínűleg számos más általunk nem vizsgált faktor is közreműködik a diabéteszes perifériás érbetegek teljes vérében mért fokozott agregábilisához, és általában a betegség rossz prognózisához.

Különösen fontosnak tartjuk ebben a tekintetben a T<sub>1</sub>DM csoportban mért különösen magas ROS produkciót, mely nem különbözött a súlyos, hosszan fennálló végtagiszkémia miatt

rekanalizációs műtétre került betegcsoportban mérttől (Akut csoport), akiknek vizsgálatát a jelen dolgozat első része foglalja össze.

A perifériás okkluzív betegségek legfőbb klinikai tüneteinek (klaudikáció, a nyugalmi fájdalom és a szöveti károsodás) hátterében a beteg, beszűkült artériák lelassult véráramlása, és a szövetek rossz oxigenizációja következtében kialakult mitokondriális diszfunkció áll, melynek következménye az elégtelen ATP és fokozott szabadgyök produkció, valamint a lokális gyulladási reakció<sup>134</sup>, melyet a hiperglikémia csak súlyosbít<sup>135</sup>.

Diabéteszes betegekben számos védőfehérje hiányát, vagy elégtelen működését mutatták ki. Ilyen például a hősokk protein 70 (HSP-70) expressziója<sup>136</sup>, és a jelen dolgozatban is kimutatott SOD aktivitás csökkenés. A SOD működés helyreállításán és a HSP-70 szint expressziójának fokozása révén ható hidroxilamin származék, az Arimoclozol ezen az úton fejt ki protektív hatását a diabétesz számos szövődésével szemben, mint amilyen a neuropátia, retinopátia és az inzulin rezisztencia<sup>137</sup>. is. Experimentális modellekben SOD mimetikus hatású tempol védelmet nyújt, a diabétesz okozta vesekárosodással szemben genetikusan hipertóniás, diabéteszes patkányokban.

A vérlemezkék védelmében az érfal simaizomzatban és a plazmában jelenlevő HSP-20 vesz részt, melynek *in vivo* és *in vitro* is jelentős aggregációgátló hatása van. Jelen vizsgálatunkkal rámutattunk arra, hogy a trombociták rendkívül bonyolult kölcsönhatásban vannak környezetükkel. A trombocitákkal kapcsolatban levő sejtek állapotváltozásai jelentősen befolyásolják működésüket, ugyanakkor a trombociták is hatnak autokrin és parakrin módon egymásra, a környezetükben levő keringő sejtekre és az érfalat felépítő sejtek működésére. Mindezek fényében úgy érezzük, hogy jelenleg érvényben lévő (elsősorban Aszpirin alapú) aggregáció gátló terápia átgondolásra szorul.

## **6. ÚJ EREDMÉNYEK:**

1. Elsőként mértük párhuzamosan perifériás artériás érbetegek trombocita funkcióját és antioxidáns / prooxidáns státusát sürgősségi és elektív revaszkularizációs érműtétek perioperatív időszakában a műtétet követő első hét végéig. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az izolált trombocitákon mért aggregáció gátlás még nem jelent védettséget, mert a vér más keringő sejtjeinek moduláló hatása felülírja az aggregációgátló terápia hatását.

2. Kimutattuk, hogy sürgősségi érműtétek után egy héttel jelentős és statisztikailag is szignifikáns aggregáció fokozódás lép fel, mely mind az ADP-vel mind a kollagénnel indukált aggregációban megnyilvánul. Az ADP-vel indukált aggregáció esetében az aggregáció mértéke az esetek többségében meghaladja a normál tartomány felső határát. A jelenséget a szabadgyök termelés permanens fokozódása és az antioxidáns enzimek (elsősorban a SOD) aktivitásának szignifikáns csökkenése kíséri.

3. Kimutattuk, hogy a revaszkularizációs érműtétek perioperatív időszakában, hogy a hosszan fennálló iszkémia elsősorban a SOD aktivitást meríti ki, és a kritikus végtagiszkémia miatt rekonstrukciós érműtetre kerülő perifériás érbetegek keringő sejtjeinek PMA-val indukált szabadgyök produkciója folyamatosan nő. Kimutattuk továbbá, hogy a hosszan fennálló iszkémia után revaszkularizációs műtetre kerülő betegek esetében a keringés helyreállítása nem jár együtt az antioxidáns / prooxidáns egyensúly helyreállításával, hiszen a műtétet követően még egy hétig a PMA-val indukált szabadgyök produkció lényegesen meghaladja a Kontroll csoportban mért értéket, és az antioxidáns enzimek aktivitása sem áll helyre.

4. Elsőként monitoroztuk diabéteszes, T<sub>1</sub>DM és T<sub>2</sub>DM, perifériás érbetegek trombocita funkcióját párhuzamosan teljes vérben és trombocitadús plazmában. Jelentős különbséget

találtunk a két betegcsoport között. Az ADP-vel indukált aggregációra, a teljes vérben mért görbe alatti területek alapján mindkét betegcsoport fokozottabb aggregációval válaszolt, mint a Kontroll csoport. Ezen kívül korrelációt mutattunk ki az éhgyomri vércukorszint és az ADP-vel teljes vérben indukált aggregációs görbék görbe alatti területei között. A Kollagénnel indukált aggregációra a T<sub>1</sub>DM csoport érzékenyebb volt.

**5.** Diabéteszes perifériás érbetegeken először mutattunk ki szignifikáns és jelentős SOD deficienciát, melyet a diabétesz típusától függetlennek bizonyult.

**6.** A PMA – val indukált gyöktermelést mindkét betegcsoportban a Kontroll csoporthoz képest szignifikánsan fokozottabbnak találtuk. Új eredménynek tekinthető, hogy ebben a tekintetben szignifikáns különbség mutatkozott a két diabéteszes betegcsoport között. A T<sub>1</sub>DM csoport betegeinek szabadgyök produkciója több mint háromszorosa volt a T<sub>2</sub>DM csoporténak.

## 7. FELHASZNÁLT IRODALOM

---

- 1 Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. Inflammatory, haemostatic, and rheological markers for incident peripheral arterial disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J*. 2007 28(3):354-62.
- 2 Hoeks SE, Scholte op Reimer WJ, Lenzen MJ, van Urk H, Jörning PJ, Boersma E, Simoons ML, Bax JJ, Poldermans D. Guidelines for cardiac management in noncardiac surgery are poorly implemented in clinical practice: results from a peripheral vascular survey in the Netherlands. *Anesthesiology*. 2007 Oct;107(4):537-44.
3. Gradsack Mária, Horváth Sándor Árpád MICROSTIM készülék használata az ajkai Magyar Imre Kórházban és a zirci Erzsébet Kórházban MIM Medical Info Media 2005. 11. 03.
- 4 L'Italien GJ, Cambria RP, Cutler BS, Leppo JA, Paul SD, Brewster DC, Hendel RC, Abbott WM, Eagle KA. Comparative early and late cardiac morbidity among patients requiring different vascular surgery procedures. *J Vasc Surg*. 1995 Jun;21(6):935-944.
- 5 Mamode N, Scott RN, McLaughlin SC, McLelland A, Pollock JG. Perioperative myocardial infarction in peripheral vascular surgery. *BMJ*. 1996 Jun 1;312(7043):1396-1397.
- 6 Vohra R, Zahrani H, Lieberman DP. Factors affecting limb salvage and mortality in patients undergoing femoral embolectomy. *J R Coll Surg Edinb*. 1991. 36(4):213-5.
- 7 E Arató, M Kürthy, G Jancsó, G Kasza, I Rozsos, H Merkli, E Pál, L Kollár, E Róth. The revascularization syndrome of the lower limbs. *Perfusion* 2005; 18:168-176.
- 8 Arató E, Kollár L, Kürthy M, Jancsó G, Róth E, Merkli H, Pál E, Litter I. Az also végtagi revaszkularizációs szindrómáról. *Érbetegségek* 2004; 11: 115-121.
- 9 Buchholz AM, Bruch L, Schulte KL. Activation of circulating platelets in patients with peripheral arterial disease during digital subtraction angiography and percutaneous transluminal angioplasty. *Thromb Res*. 2003. 109(1):13-22.
- 10 Rajagopalan S, Mckay I, Ford I, Bachoo P, Greaves M, Brittenden J. Platelet activation increases with the severity of peripheral arterial disease: implications for clinical management. *J Vasc Surg*. 2007 46(3):485-90.
- 11 Shapiro AD. Platelet function disorders. *Haemophilia*. 2000 Jul;6 Suppl 1:120-7.
- 12 von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease *Circ Res*. 2007. 100(1):27-40.

- 
- 13** Everts PA, Jakimowicz JJ, van Beek M, Schönberger JP, Devilee RJ, Overdevest EP, Knape JT, van Zundert A. Reviewing the structural features of autologous platelet-leukocyte gel and suggestions for use in surgery. *Eur Surg Res.* 2007. 39(4):199-207.
- 14** Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep.* 2008. 60 (1):101-108.
- 15** Dugrillon A; Eichler H, Kkern S, Klüter H, Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2002. 31 (6) 615-619.
- 16** Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 2002 70 (12):6524-33.
- 17** Henry Z. Movat, William J. Weiser , Michael F. Glynn , and James F. Mustard: Platelet phagocytosis and aggregation *The Journal of Cell Biology*, 1965. (27) 531-543.
- 18** Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol.* 2007. 14 (1):55-61.
- 19** Harker LA, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest.* 1969. 48.(6) 963-74.
- 20** Fishley B, Alexander WS. Thrombopoietin signalling in physiology and disease. *Growth Factors.* 2004. 22 (3):151-155.
- 21** Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol.* 2006. 43.(1 Suppl) S94-100.
- 22** Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost.* 1995. 74 (1) 224-7.
- 23** Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2003.73.(3) 232-41.
- 24** Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci.* 2004. 117(Pt 16):3415-25.
- 25** Reilly IA, FitzGerald GA. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood.* 1987 69. (1):180-186.
- 26** Di Minno G, Silver MJ, Murphy S. Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood.* 1983. 61 (6):1081-5.

- 
- 27** Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004 126(3 Suppl):234S-264S
- 28** Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, FitzGerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med*. 1986.315 (16):983-9.
- 29** Chirkov YY, Holmes AS, Willoughby SR, Stewart S, Wuttke RD, Sage PR, Horowitz JD. Stable angina and acute coronary syndromes are associated with nitric oxide resistance in platelets. *J Am Coll Cardiol*. 2001.37. (7):1851-1857.
- 30** Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, Horowitz JD. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation*. 1999 .100(2):129-34.
- 31** Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med*. 2007 262(2):157-72.
- 32** Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993. 16(2):434-44.
- 33** Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998. 339(4):229-34.
- 34** Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999.340(2):115-26.
- 35** Knobler H, Savion N, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Varon D. Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients. *Thromb Res*. 1998. 15;90(4):181-90.
- 36** Iida N, Iida R, Takeyama N, Tanaka T. Increased platelet aggregation and fatty acid oxidation in diabetic rats. *Biochem Mol Biol Int*. 1993.30(1):177-85.
- 37** Davì G, Catalano I, Averna M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattoni G, Patrono C. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1990.322(25):1769-74.
- 38** Tomaselli L, Cerletti C, de Gaetano G, Notarbartolo A, Davì G, Pupillo M. Normal platelet function, but increased platelet activation in vivo in diabetic patients. *Thromb Haemost*. 1990. 64(4):604.

- 
- 39** Mandal S, Sarode R, Dash S, Dash RJ. Hyperaggregation of platelets detected by whole blood platelet aggregometry in newly diagnosed noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Pathol.* 1993.100(2):103-7
- 40** Carvalho AC, Colman RW, Lees RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med.* 1974.290(8):434-8
- 41** Kjeldsen SE, Lande K, Gjesdal K, Westheim A, Foss OP, Leren P, Eide IK. Increased platelet release reaction in 50-year-old men with essential hypertension: correlation with atherogenic cholesterol fractions. *Am Heart J.* 1987.113(1):151-5.
- 42** Aoki I, Aoki N, Kawano K, Shimoyama K, Maki A, Homori M, Yanagisawa A, Yamamoto M, Kawai Y, Ishikawa K. Platelet-dependent thrombin generation in patients with hyperlipidemia. *J Am Coll Cardiol.* 1997. 30(1):91-6.
- 43** Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein affect platelet aggregation in vitro. *Thromb Res.* 1989. 53(6):561-7.
- 44** Aviram M, Fuhrman B, Keidar S, Maor I, Rosenblat M, Dankner G, Brook G. Platelet-modified low density lipoprotein induces macrophage cholesterol accumulation and platelet activation. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989. 27(1):3-12
- 45** Zhao B, Rickert CH, Filler TJ, Liu B, Verhallen PF, Dierichs R. Adhesion of washed blood platelets in vitro is advanced, accelerated, and enlarged by oxidized low-density lipoprotein. *Am J Hematol.* 1995. 49(3):177-82
- 46** Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96(12):6931-6.
- 47** Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2002. 1(4):273-88
- 48** Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol.* 2005. 100(2):179-190.
- 49** Kato H, Kogure K.: Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. *Cell Mol Neurobiol.* 1999. 19(1):93-108.
- 50** Gonenc A, Hacisevki A, Bakkaloglu B, Soyagir A, Torun M, Karagoz H, Simsek B. Oxidative stress is decreased in off-pump versus on-pump coronary artery surgery. *J Biochem Mol Biol.* 2006. 39(4):377-82.



- 
- 51** Sezer M, Oflaz H, Gören T, Okçular I, Umman B, Nişancı Y, Bilge AK, Sanli Y, Meriç M, Umman S. Intracoronary streptokinase after primary percutaneous coronary intervention. *N Engl J Med.* 2007. 356(18):1823-34.
- 52** Krumholz HM, Goldberger AL. Reperfusion arrhythmias after thrombolysis. Electrophysiologic tempest, or much ado about nothing. *Chest.* 1991. 99 (4 Suppl):135S-140S.
- 53** Arato E, Kurthy M, Jancso G, Sinay L, Kasza G, Verzar Z, Benko L, Cserepes B, Kollar L, Roth E. [Oxidative stress and leukocyte activation after lower limb revascularization surgery] *Magy Seb.* 2006. 59(1):50-57.
- 54** Laird JR. The management of acute limb ischemia: techniques for dealing with thrombus. *J Interv Cardiol.* 2001 14(5):539-546.
- 55** Adiseshiah M, Round JM, Jones DA. Reperfusion injury in skeletal muscle: a prospective study in patients with acute limb ischaemia and claudicants treated by revascularization. *Br J Surg.* 1992. 79. (10) 1026-10269.
- 56** Falkensammer J, Oldenburg WA. Surgical and medical management of mesenteric ischemia. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2006. 8(2): 137-143.
- 57** Ferencz A, Szanto Z, Kalmar-Nagy K, Horvath OP, Roth E. Mitigation of oxidative injury by classic and delayed ischemic preconditioning prior to small bowel autotransplantation. *Transplant Proc.* 2004. 36. (2) 286-288.
- 58** Harkin DW, Barros D'sa AA, McCallion K, Hoper M, Halliday MI, Campbell FC. Circulating neutrophil priming and systemic inflammation in limb ischaemia-reperfusion injury. *Int Angiol.* 2001. 20(1):78-89.
- 59** Arató E., Kürthy M., Jancsó G., Kasza G., Sinay L., Rozsos I., Kollár L., Róth E.: Az oxidatív stressz szerepe az alsóvégtagi revaszkularizációs szindrómában. *Érbetegségek,* S2; 39. 2005.
- 60** Arato E, Kurthy M, Jancso G, Sinay L, Kasza G, Verzar Z, Benko L, Cserepes B, Kollar L, Róth E. Alsóvégtagi revaszkularizációs műtéteket követő oxidatív stressz vizsgálata. *Magy Seb.* 2006. 59(1):50-7.
- 61** Róth E, Hejje L : Oxygen free radicals in heart disease. In: *Cardiac Drug Development Guide.* Ed. M. K. Pugsley. Humana Press Inc. Totowa NJ. 2003: 47-66
- 62** Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2008

- 
- 63** Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol.* 1992. 262: 488-503.
- 64** Chello M, Mastroroberto P, Marchese AR, Mactese G, Santangelo E, Amantea B. Nitric oxide inhibits neutrophil adhesion during experimental extracorporeal circulation. *Anaesthesiology.* 1998. 89: 443-448.
- 65** Nossuli T.O, Hayward R, Jensen D, Scalia R, Lefer A. M. Mechanism of cardioprotection by peroxynitrite in myocardial ischaemia and reperfusion injury. The American Physiological Society, *Am J Physiol.* 1998. 275(2 Pt 2):H509-19.
- 66** Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW. Localization of xantine-oxydase in mammary-gland epithelium and capillary epithelium. *Cell* 1981; 25: 67-82.
- 67** Babior BM, Peters WE. The superoxide producing enzyme of human neutrophils: further properties. *J Biol Chem.* 1981. 256: 2321-2323.
- 68** Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischaemia. *Gastroenterology*, 1981. 81:22-29.
- 69** Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischaemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995. 57: 311-332.
- 70** Pogetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Bannerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischaemia is mediated by xantine-oxydase. *J Trauma* 1992. 32: 723-727.
- 71** Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. Circulation xantine-oxydase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischaemia – reperfusion. *Am J Physiol* 1992. 263: L394-L401.
- 72** Hamid Rabb, Yvonne M. O’Meara, Patrick Coleman, Hugh R. Brady. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney International* 1997. 51: 1463-1468.
- 73** Nielsen VG, Tan S, Baird MS, McCammon AT, Parks DA. Gastric intramucosal pH and multiple organ injury: impact of ischaemia – reperfusion and xantine-oxydase. *J Inflamm.* 1995.-6; 46: 144-154.
- 74** Nielsen VG, Tan S, Baird MS, Samuelson PN, McCammon AT, Parks DA. Xanthine oxidase mediates myocardial injury after hepatoenteric ischemia-reperfusion. *Crit Care Med.* 1997.25 (6):1044-50.

- 
- 75** Werner E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci.* 2004. 117(Pt 2):143-53
- 76** Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci.* 2005. 62(19-20):2173-93
- 77** Kurose I, Granger DN. Evidence implicating xanthine-oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann NY Acad Sci* 1994; 723: 158-179.
- 78** Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of neutrophil in myocardial ischaemia – reperfusion. In Ed M Karmazyn, Myocardial ischaemia mechanism, reperfusion, protection. Birkhauser Verlag Basel/Schwitzerland 1996. pp. 263-284.
- 79** Róth E, Jancsó G. The role and possibilities of the experimental surgery in Hungary. 9th Congress of the International Federation of Societies for Surgery of the Hand. Budapest, Hungary 13-17 June, Medimond International Proceedings, 2004. 85-90.
- 80** Fogarty TJ, Cranley JJ, Krause RJ, Strasser ES, Hafner CD A method for extraction of arterial emboli and thrombi. *Surg Gynecol Obstet.* 1963. 116:241-4.
- 81** Born G, Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962. 194:927-979.
- 82** Ingerman-Wojenski CM, Silver MJ. A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood lumi-aggregometer. *Thromb Haemost.* 1984. 51(2):154-6.
- 83** Stevens JB and AP Autor. Induction of superoxide dismutase by oxygen in neonatal rat lung. *J Biol Chem.* 1977, 252:3509.
- 84** Brennan M-L, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 2003. 349:1595-604
- 85** Brevetti G, Schiano V, Laurenzano E, Giugliano G, Petretta M, Scopacasa F, Chiariello M. Myeloperoxidase, but not C-reactive protein, predicts cardiovascular risk in peripheral arterial disease. *Eur Heart J.* 2008. 29(2):224-30.
- 86** Haimovici H. Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria: evaluation of a hitherto unreported syndrome with report of two cases. *Surgery.* 1960. 47. 739-47.
- 87** Belkin M, LaMorte WL, Wright JG, Hobson RW 2nd. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg.* 1989. 10(1):14-8

- 
- 88** Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest.* 1977. 59(5):959-65.
- 89** Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Páy A. Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis.* 2005. 26(9):1646-9
- 90** Jane A. Leopold and Joseph Loscalzo Jane A. Leopold and Joseph Loscalzo Oxidative Enzymopathies and Vascular Disease *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:1332-1340;
- 91** Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, Dodd SL, Iraklis I., The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc Endovascular Surg.* 2008. 42(2) 101-12.
- 92** Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jeziarska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004. 36(2) 205-15.
- 93** Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res.* 2004.45(10):1846-51.
- 94** Cinnella G, Vendemiale G, Dambrosio M, Serviddio G, Pugliese PL, Aspromonte G, Altomare E. Effect of Propofol, Sevoflurane and Desflurane on systemic redox balance. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007. 20(3):585-93.
- 95** Jia-Li Luo, Folke Hammarqvist, Kerstin Andersson, and Jan Wernerman Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue *Am J Physiol Endocrinol Metab* 21998. 75: E359-E365
- 96** May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 28(3):s5-10.
- 97** Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2004. 21(5):401-9.
- 98** Dashwood MR, Tsui JC. The effect of acute ischemia on ET-1 and its receptors in patients with underlying chronic ischemia of the lower limb. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006. 231(6):802-5
- 99** Esposito CJ, Popescu WM, Rinder HM, Schwartz JJ, Smith BR, Rinder CS. Increased leukocyte-platelet adhesion in patients with graft occlusion after peripheral vascular surgery. *Thromb Haemost.* 2003. 90(6):1128-34.

- 
- 100** Drescher P, Crain MR, Rilling WS. Initial experience with the combination of reteplase and abciximab for thrombolytic therapy in peripheral arterial occlusive disease: a pilot study. *J Vasc Interv Radiol.* 2002. 13(1):37-43.
- <sup>101</sup> Schanzer A, Hevelone N, Owens CD, Beckman JA, Belkin M, Conte MS. Statins are independently associated with reduced mortality in patients undergoing infrainguinal bypass graft surgery for critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2008. 47(4):774-781.
- 102** Cleanthis M, Bhattacharya V, Smout J, Ashour H, Stansby G. Platelet monocyte aggregates and monocyte chemoattractant protein-1 are not inhibited by aspirin in critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007. 33(6):725-30
- 103** Mohan IV, Mikhailidis DP, Stansby GP. Platelet activation in bypass surgery for critical limb ischemia. *Vasc Endovascular Surg.* 2007. 41(4):322-9. [Click here to read](#)
- 104** Olas B, Wachowicz B, Tomczak A, Erler J, Stochmal A, Oleszek W. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* in vitro. *Platelets.* 2008 (1):70-7
- 105** Yang YM, Wang XX, Chen JZ, Wang SJ, Hu H, Wang HQ. Resveratrol attenuates adenosine diphosphate-induced platelet activation by reducing protein kinase C activity.
- 106** Banting F, Best C: The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 1922. 7. 256-271
- 107** Himsworth H. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. 1936. *Lancet* i: 127-130
- 108** Bornstein J, Lawrence RD Two types of diabetes mellitus. With and without available of plasma insulin. 1951. *Br Med J* 7: 732
- 109** Hollenbeck C, Reaven GM. Variations in insulin-stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 64(6):1169-73.
- 110** Peter S. Trends in the incidence of type I diabetes mellitus worldwide. *West Indian Med J.* 2007. 56(3):264-9.
- 111** Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care.* 2001. 24(8):1433-7
- 112** Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc.* 1985. 33(1):13-8.

- 
- 113** Diabetes-Related Amputations of Lower Extremities in the Medicare Population -- Minnesota, 1993-1995, MMWR Weekly 1998. 47. 649-652
- 114** Kandrór KV, Pilch PF. Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol.* 1996. 271(1 Pt 1):E1-14.
- 115** Louis Camille Maillard: Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *Compte-rendu de l'Académie des sciences*, tome 1912. 154. 66-68. (Réaction de Maillard )
- 116** Wagner Z, Molnár GA, Mazák I, Vass T, Wagner L, Tamasko M, Laczy B, Nagy J, Wittmann I. A nem enzimátikus glikáció atherogén hatásának mechanizmusa diabétesz mellituszban és vesebetegségben. *Metabolizmus* 2004. 2. (3) 130-134.
- 117** Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J.* 1988. 256(1):205-12.
- 118** Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress Stephen S.M. Chung, Eric C.M. Ho, Karen S.L. Lamsookja K. Chung, J. *Am Soc Nephrol* 2003. 14. S233-S236
- 119** Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2006. 116(4):1071-80.
- 120** Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA, Hales CN The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 1965. 131(1):324-33.
- 121** Anderson RC. Carnitine palmitoyltransferase: a viable target for the treatment of NIDDM? *Curr Pharm Des.* 1998. 4(1):1-16.
- 122** Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Trovati M. Relevance of the vascular effects of insulin in the rationale of its therapeutical use. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2007. 7(4):228-49.
- 123** Raitakari M, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Laine H, Mäkeä P, Teräs M, Sipilä H, Niskanen T, Raitakari OT, Iida H, et al. Insulin increases blood volume in human skeletal muscle: studies using [<sup>15</sup>O]CO and positron emission tomography. *Am J Physiol.* 1995. 269(6 Pt 1):E1000-5.
- 124** Mather K, Anderson TJ, Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J Vasc Res.* 2001. 38 (5):415-22.

- 
- 125** Peerschke EI, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ and MM Johnson Correlation between fibrinogen binding to human platelet aggregability *Blood* 55. 841-847 1980.
- 126** Song Y, Wang J, Li XK, Cai L. Zinc and the diabetic heart. *Biometals*. 2005. 18(4):325-32.
- 127** Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007. 14 (2):124-31.
- 128** Redgrave JN, Lovett JK, Syed AB, Rothwell PM. Histological features of symptomatic carotid plaques in patients with impaired glucose tolerance and diabetes (oxford plaque study). *Cerebrovasc Dis*. 2008. 26 (1):79-86.
- 129** Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med*. 2007 262. (2):157-72.
- 130** Zhao R, Ma X, Shen GX. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells induced by oxidized very low density lipoproteins. *Mol Cell Biochem*. 2008. 317(1-2):197-204
- 131** Heinrich D, Görg T, Schulz M. Effects of unfractionated and fractionated heparin on platelet function. *Haemostasis*. 1988.18 Suppl 3:48-54.
- 132** Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation*. 1998. 97(4):350-5.
- 133** Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med*. 2005. 83(2):148-58.
- 134** Makris KI, Nella AA, Zhu Z, Swanson SA, Casale GP, Gutti TL, Judge AR, Pipinos II. Mitochondriopathy of peripheral arterial disease. *Vascular*. 2007. 15(6):336-43.
- 135** Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol*. 2008. 45. 1-16.
- 136** Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes*. 2002.51 (4):1102-9.
- <sup>137</sup> Kürthy M, Mogyorósi T, Nagy K, Kukorelli T, Jednákovits A, Tálosi L, Bíró K.

---

Effect of BRX-220 against peripheral neuropathy and insulin resistance in diabetic rat models. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;967:482-9



---

## 8. ATÉMÁVAL KAPCSOLATOS PUBLIKÁCIÓK

### 8. 1. Közlemények:

1. **Kürthy M**, Mogyorósi T, Nagy K, Kukorelli T, Jednákovits A, Tálosi L, Bíró K.

Effect of BRX-220 against peripheral neuropathy and insulin resistance in diabetic rat models.

Ann N Y Acad Sci. 2002 Jun;967:482-9. **IF: 1,682**

2. Róth E, Jancsó G., Szántó Z., **Kürthy M**.

Endogén adaptáció a diabétesz tükrében.

Metabolizmus 1. (3) 169-175. 2003

3. Arató E., Kollár L., **Kürthy M**., Jancsó G., Róth E., Merkli H., Pál E., Litter I.:

Az alsó végtagi revaszkularizációs szindrómáról.

Érbetegségek 2004; 11: 115-121.

4. Arató E, **Kürthy M**, Jancsó G, Kasza G, Rozsos I, Merkli H, Pál E, Kollár L, Róth E.

The revascularisation syndrome of the lower limbs

Perfusion 18 (5) 1-8 2005. **IF: 0.2**

5. Arató E, **Kürthy M**, Jancso G, Sinay L, Fehér I, Kollar L, Róth E.

Monitoring of prooxidant-antioxidant state following limb revascularisation surgery

Journal of Vascular Research 43 (1): 45-45 2006. **IF: 2,61**

6. Arato E, **Kürthy M**, Jancso G, Sinay L, Kasza G, Verzar Z, Benko L, Cserepes B, Kollar L, Roth E.

Oxidative stress and leukocyte activation after lower limb revascularization surgery

---

Magy Seb. 2006 Feb;59(1):50-7.

7. Lantos J, Csontos C, **Kürthy M**, Ferencz S, Róth E: Monitoring of oxidative stress during treatment of burn injury.

Eur. Surg. Res. 2007; 39(S1):81. **IF: 0,755**

8. **Maria Kurthy**, Endre Arato, Gabor Jancso1, Laszlo Sinay, Zsofia Verzar, Barbara Cserepes, Janos Lantos, Sandor Ferencz, Szabolcs Bertok , Andrea Ferencz, Lajos Kollar, Elisabeth Roth

Duration of hypoxia influences platelet function due to free radical production in revascularization surgery of lower limb

Perfusion 2007; 20 (6) 187-194. **IF: 0,2**

9. Arató E, **Kürthy M**, Jancsó G, Sinay L, Kasza G, Menyhei G, Shafiei M, Varga Z, Bertalan A , Verzár Zs, Kollár L, Róth E

Az alsóvégtagi compartment szindróma kórtana és diagnosztikai lehetőségei

Magyar Sebészet, 2007; 6: 301-306

10. E. Arató , G. Jancsó, L. Sinaya, **M. Kürthy**, J. Lantos , S. Ferencz, S. Horváth , M. Shafiei, G. Kasza, Z. Verzár, L. Kollár, E. Róth, G. Wéber and G. Menyhei

Reperfusion injury and inflammatory responses following acute lower limb revascularization surgery

Clinical Hemorheology and Microcirculation 2008 39. 79–85 **IF: 0,977**

11. Sinay L, **Kürthy M**, Horváth S, Arató E, Shafiei M, Lantos J, Ferencz S, Bátor A, Balatonyi B, Verzár Z, Süto B, Kollár L, Wéber G, Roth E, Jancsó G.

Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model.

Clinical Hemorheology and Microcirculation 2008;40 (2):133-42. **IF: 0,977**

---

## **8. 2. A témával kapcsolatos absztraktok:**

**1. Kürthy M,** Arató E, Jancsó G, Gasz B, Kollár L, Róth E

A thrombocyta funkció és az antioxidáns státusz vizsgálata akut verőér elzáródást követően.  
Érbetegségek S1. 2005. 5.

**2. Kürthy M,** Arató E, Jancsó G, Lantos J, Fehér I., Kollár L, Róth E.

Egyes és kettéstípusú diabéteszes perifériás érbetegek thrombocita funkciója és szabadgyök termelése; in vitro inzulin hatása

Cardiologia Hungarica 35 Supplementum A. A23.

**3. Kürthy M,** Arató E, Jancsó G, Lantos J, Fehér I, Ferencz A, Róth E:

Thrombocyte function and free radical production of type 1 and type 2 diabetic patients; the effect of insulin in vitro

Diabetologia 48. Supplement 1. A 411 2005. **IF: 5.337**

**5. Kürthy M,** Arató E, Jancsó G, Lantos J, Ferencz A, Fehér I, Róth E, Kollár L

In vitro inzulin hatása 1-es és 2-es típusú, perifériás érszövődményekkel komplikált diabéteszes betegek thrombocyta funkciójára és szabadgyök termelésére.

Érbetegségek 2005. Suppl. 2. 39.

**6. Kurthy M,** Arato E, Jancso G, Lantos J, Cserepes B, Ferencz S, Roth E.

Thrombocyte function following revascularisation surgery surgery of lower limb

Eur. Surg Res. 38. S(1) (P41) 131. **IF: 0,706**

---

**7. Kürthy M**, Arató E, Jancsó G, Lantos J, Cserepes B, Ferencz S, Sinay L, Róth E.

Thrombocyte function in the perioperative phase of acute and elective peripheral revascularisation surgery

Experimental and Clinical Cardiology 11. (3) A35. 256. 2006.

**8. Kürthy Mária**, Dr Arató Endre, Dr Jancsó Gábor, Dr Lantos János, Dr Ferencz Sándor, Dr Bertók Szabolcs, Dr Ferencz Andrea, Dr Cserepes Barbara, Dr Horváth Szabolcs, Prof Dr Kollár Lajos, Prof Dr Róth Erzsébet

Az antioxidáns –prooxidáns státusz és a trombocita funkció monitorozása alsóvégtagi revaszkularizációs műtétek során.

Érbetegségek S1, 7. 2007.

**9. Maria Kurthy**, Endre Arato, Gabor Jancso, Barbara Cserepes, Janos Lantos, Sandor Ferencz, Szabolcs Bertok, Andrea Ferencz, Erzsebet Roth

Thrombocyte function and oxidative stress markers in blood of type 1 and type 2 diabetic patients and healthy subjects: the in vitro effects of insulin

Diabetologia 50. S1 S298. 2007. **IF: 5,337**

**10. Arató E, Kürthy M**, Jancsó G, Kasza G, Sinay L, Fehér I, Kollár L, Róth E.

Az antioxidáns prooxidáns státusz változása akut alsó végtagi revaszkularizációs műtétet követően.

Magyar Sebészet 58. 279. 2005.

**11. M Kurthy**, E. Arato, G. Jancso, J. Lantos, S. Ferencz, E. Bojtor, L. Sinay, L. Koller, E. Roth

Oxidative stress markers and thrombocyte function in type -1 and type-2 diabetic patients and in vitro effects of insulin

Journal of Vascular Research 45 (Suppl. 2) 85. 2008. **IF: 2,46**

**12. Rozsos I**, Sinay L, Kasza G, Litter I, **Kürthy M**, Weisdorn R, Róth E, Kollár L

---

A diabetic foot szindrómás betegek hemorheológiai nyomomkövetése

Érbetegségek Suppl. 2. 38.2005.

**13.** Arató E, **Kürthy M**, Jancsó G, Kasza G, Sinay L, Rozsos I, Kollár L, Róth E

Az oxidatív stressz szerepe az alsóvégtagi revaszkularizációs szindrómában

Érbetegségek 2005. Suppl. 2. 39.

**14.** Lantos J, Csontos C, Kurthy M, Füredi R, Róth E.

The time curse of leucocyte activation markers after burn injury.

Eur. Surg. Res. 38. S(1) (P45) 134 **IF: 0,706**

**15.** Dr Sinay László, Dr Arató Endre, Dr Kasza Gábor, Dr Jancsó Gábor, **Kürthy Mária**, Dr

Bertalan Andrea, Dr Verzár Zsófia, Prof. Dr Kollár Lajos

Mikrocirkuláció megítélése compartment szindrómában rekesznyomás mérésével és szöveti oxigénszaturáció meghatározásával.

Érbetegségek S1, 7. 2007.

**16.** Dr Ferencz Sándor, **Kürthy Mária**, Dr Bertók Szabolcs, Dr Horváth Szabolcs, Prof Dr

Róth Erzsébet, Prof Dr Wéber György

Érbetegségek progressziójának követése: trombocita aggregáció, szabadgyök termelés és antioxidáns enzimek kapacitásának mérése alsóvégtag amputált betegeknél.

Érbetegségek S1, 7. 2007.

**17.** Dr István Miklós, **Kürthy Mária**, Dr Lantos János, Dr Róth Erzsébet

Klinikai adatok, thrombocitafunkciós vizsgálatok, valamint antioxidáns státusz elemzése orális antikoaguláns terápiában részesülő betegeknél. Érbetegségek S1, 7. 2007.

---

**18.** Dr Lantos János, Dr Csontos Csaba, Dr Mühl Diana, **Kürthy Mária**, Dr Ferencs Sándor,  
Dr Róth Erzsébet

Fehérvérsejtek szabadgyök-termelésének és adhézións molekula kifejeződésének vizsgálata  
égett és szeptikus betegekben.Érbetegségek S1, 7. 2007.

**19.** Sínay L, Arató E, Horváth Sz, **Kürthy M**, Bátor A, Németh G, Balatonyi B, Róth E,  
Kollár L, Jancsó G. Hasi aorta okklúziót követő korai intermittáló reperfúzió hatása a  
reperfúziós károsodásra kísérletes és klinikai modellen. Érbetegségek, 2007/Suppl 2; 16

**20.** Arató E, Sínay L, Kasza G, M Shafiei, Varga Z, Kollár L, **Kürthy M**, Jancsó G, Róth E.  
Alsóvégtagi rekonstruktív érműtétek során adott E-vitamin hatása a reperfúziós  
károsodásokra.

Érbetegségek, 2007/Suppl 2; 24

**21.** E.Arato, L. Sinay, **M. Kürthy**, G. Kasza, G weber, L. Kollar, E. Roth,

Leukocyte activation and redox changes following aorto-biphemoral bypass surgery

57th European Society for Cardiovascular Surgery Barcelona, Spain, April. 24-27. 2008.

Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery 7 (1) 2008.

**22.** J. Lantos, Cs Csontos, D Muhl, V. Foldi, S. Szentes, L. Bogar, **M. Kürthy**, G. Weber, E.  
Roth

Comparative study of phagocyte function in critically ill patients: respiratory burst and  
adhesion molecule expression

Journal of Vascular Research 45 (supplement 2) 96. 2008. **IF: 2,63**

A dolgozattal kapcsolatos közlemények összesített impakt faktora: **7,39**

A dolgozattal kapcsolatos absztraktok összesített impakt faktora: **17,18**

**Kumulatív impakt faktor: 25,57**

---

### 8. 3. A témához szorosan nem kapcsolódó közlemények és absztraktok:

#### Közlemények

1. Szatmáry L., Rablocky Gy., Fráter E., **Kürthy M.**  
GYKI-23107 antifibrilláns hatása kutyák kísérletes dizitmiáiban  
Cardiologica Hungarica, 14/2: 139-146, 1985
2. Szatmáry L., Rablocky Gy., Fráter E., **Kürthy M.**  
A GYKI-23 107 antiarrhythmicum in situ szívelektrofiziológiai vizsgálata kutyákon  
Cardiologica Hungarica, 14/2: 131-137, 1985
3. Zubovics Z., Toldy L., Varró A., Rablocky G., **Kürthy M.**, Dvorták P., Jerkovich G., Tomory É.:  
Synthesis and antiarrhythmic activity of N-aryl alkylene-diamines  
Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther. 21/5 370-378 1986
4. Varró A., Rablocky G., Jaszlits L., **Kürthy M.**, Zubovics Z., Toldy L.:  
Pharmacological investigation of new antiarrhythmic agent 23-107  
Drugs under Exp. And Clin. Res. 13(1): 21-28, 1987
5. Rablocky G., Varró A., **Kürthy M.**, Bódi I., Jednákovits A., Szatmáry L., Jaszlits L., Király I.:  
Pharmacology of B-GYKI-23 107 a new antiarrhythmic agent  
Pharmacol Res. Commun. 20: Suppl. I 71-72, 1988
6. Mátyus P., Szilágyi G., Rablocky G., **Kürthy M.**,  
Some aspects of the chemistry of pyrimido (1,2b)pyridazinones  
J. Heterocyclic Chem. 25: 1535, 1988 **IF: 0.669** (1997)
7. Szatmáry L., Rablocky G., **Kürthy M.**, Fráter E., Solti F.,  
Antifibrillatory effect of GYKI-23 107 in ventricular vulnerability induced by local cooling and  
programmed stimulation in canine models  
Acta Med Hung. 45: 221-229, 1988
8. Szatmáry L., Rablocky G., **Kürthy M.**, Varró A., Solti F.:  
Electrophysiological effects of the antiarrhythmic agent GYKI-23 107 in dogs  
Acta. Med. Hung. 45: 209-219, 1988
9. Arányi P., Rablocky Gy., **Kürthy M.**, Jaszlits L., Jednákovits A., Horváth E., Kasztreiner E., Bódi I.,  
Mátyus P., Csókás Gy., Kovács A.

---

GYKI-12 743, a novel antihypertensive compound with special alpha-adrenergic blocking profile  
*Acta physiologica Hungarica: Acta physiol. Hung.* 75. 155-156. 1988.

**10. Kosáry J., Kasztreiner E., Rablocky G., Kürthy M.,**  
Synthesis and cardiotoxic activity of 2,4 -diamino-1,3,5-triazines  
*Eur. J. Med. Chem.* 24: 97-99, 1989 **IF: 0.809**

**11. Kürthy M., Kőrösi, Hátori T, Rabloczky GY,**  
Positive inotropic effects of GYKI-52 713 in conscious and anaesthetized animals  
*Acta Physiologica Hungarica: Acta physiol. Hung.*75. 191-192. 1990.

**12. Jaszlits L, Rabloczky G, Csókás G, Bódi I, Kürthy M, Horváth E, Kovács A, Jednákovits A,**  
Arányi P, Mátyus P  
GYKI-12 743, a novel antihypertensive compound with special alpha-adrenergic blocking profile.  
*Acta Physiol Hung.* 1990;75 Suppl:155-6.

**13. Mátyus P., Makk N., Tegdes A., Kosáry J., Kasztreiner E., Podányi B., Rablocky G., Kürthy M.**  
Synthesis and cardiotoxic activity of pyridazo (5,4b) (1,4) oxadiazones and 1,4 dioxino (2,3-  
d)pyridamines  
*J. Heterocyclic Chem.*1990. 27: 151-155, **IF: 0.669**

14. Kasztreiner E., Rabloczky G., Makk N., Mátyus P., Diesler E., Tegdes A., Kosáry J., Czákó K.,  
Gyürky S., Cseh G., **Kürthy M.**, Jaszlits L.:  
Synthesis and Positive inotropic activity of novel pirimido (5,4-b)-(1,4)oxazin-7 (8H)-ones  
*Eur J. Med. Chem.* 1990. 25: 333 **IF: 0.809**

**15. Érczy I, Rabloczky G., Varró A., Somogyi G., Kürthy M., Bódy I.**  
Synthesis and antiarrhythmic activity of aminoguanidine derivatives  
*Eur. J. Med. Chem.* 1993. 28: 185-193 **IF: 0.809**

**16. Bíró K., Bácsy E., Jaszlits L., Jednákovits A., Hegedűs E., Kürthy M.**  
Influence of BRLP-42 Treatment on Early Signs of Diabetic Retinopathy  
Biorex Research and Development Co.  
*Diabetologia Hungarica* 1994. (2.) (Suppl.I)

**17. Bíró K., Kukorelli T, Jaszlits L, Jednákovits A, Hegedűs E., Kürthy M.**  
Effect of BRLP-42 on the Peripheral Neuropathy of STZ-Diabetic Rats  
Biorex Research and Development Co.  
*Diabetologia Hungarica* 1994. (2) 1994.



---

**18.** Sebokova E, **Kurthy M**, Mogyorosi T, Nagy K, Demcakova E, Ukropec J, Koranyi L, KlimesI. Comparison of the extrapancreatic action of BRX-220 and pioglitazone in the high-fat diet-induced insulin resistance.

Ann N Y Acad Sci 2002. 967:424-430. **IF: 1,682**

**19.** Róth Erzsébet, Jancsó Gábor, Mohammad T Jaberansari, **Kürthy Mária**, Cserepes Barbara, Lantos János.

Endogén adaptáció és kardioprotekció: az ACE gátlás új indikációja.

Cardiologia Hungarica, 2003. (Suppl.6); 72-76.

**20.** Ferencz A, Racz B, Gasz B, Benko L, Jancso G, **Kurthy M**, Roth E.

Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation.

Microsurgery. 2006;26(1):54-7. **IF: 0,711**

**30.** Elizabeth Róth, Barbara Cserepes, Balázs Gasz, Boglárka Rác, János Lantos, **Mária Kürthy**, Balázs Gaszner, Gábor Jancso.

Ischaemic and pharmacological preconditioning induces heme oxygenase-1 expression in cultured myocardium

Journal of Molecular and Cellular Cardiology Volume 40, issue 6, p959, june 2006. **IF: 4.954**

**31.** Cserepes, G Jancso, B Racz, B Gasz, A Ferencz, L Benkő, B Borsiczky, R Füredi, S Ferencz, **M Kürthy**, B Gaszner, J Lantos, E Róth.

Cell protective role of urocortin in myocardial pre- and postconditioning.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology Volume 40, issue 6, p959, june 2006. **IF: 4.954**

**32.** E Arató, M Kürthy<sup>1</sup>, L Sínay, G Kasza , G Menyhei, S Masoud , A Bertalan<sup>2</sup> Zs Verzár<sup>2</sup>, L Kollár, E Róth<sup>1</sup> G Jancsó<sup>1</sup>

Pathology and diagnostic options of lower limb compartment syndrome

Clinical Haemorheology and Microcirculation

received: 12.3.2008 accepted: 28.5.2008 **IF:1,242**

---

## Absztraktok

- 1. Kürthy M.**, Varró A., Rabloczky G., Mader R. M., Zubovics Z., Toldy L.,  
Pharmacological study of the new antiarrhythmic drug, GYKI-23 107  
Acta Phys. Acad.Sci.Hung., 63: 250, 1984  
**IF: 0.12**
2. Heltai K., **Kürthy M.**, Rabloczky G.,  
Investigation of two new positive inotropic compounds (GYKI-52 843 and GYKI-52 713) in  
anaesthetized and conscious animals  
J. Mol. Cell. Cardiol. 19, Suppl.III S33, 1987  
**IF: 4.091**
- 3. Kürthy M.**, Rabloczky G., Heltai K., Kasztreiner E., R. Mader M.  
Cardiovascular pharmacology of a new positive inotropic compound (GYKI-12 735)  
J. Mol. Cell. Cardiol. 19, Suppl.III S50, 1987  
**IF: 4.091**
4. Rabloczky G., **Kürthy M.**, Heltai K., R. Mader M., Kasztreiner E., Varró A., Körösy J., Mátyus  
P.,  
Comparative evaluation of cardiac actions of some new positive inotropic compounds with different  
mode of action  
J. Mol. Cell. Cardiol. 19, Suppl.III S77, 1987  
**IF: 4.091**
- 5. Kürthy M.**, Rabloczky Gy, Varró A, Szatmáry L, Jaszlits L, Wellmann J, Érczi I.  
New antiarrhythmic drug with positive cardiac action  
Adv. In Pharmacol. Res. And Practice in: Tardos L., Rabloczky G.,: Pharmacology of Cardiovascular  
System 4th International Congress of Hungarian Pharmacological Soc. ,1985, Sec.2., 399-402
6. Jednákovits A, Jaszlits L, Bíró K, Pogátsa G, Hegedűs E and **M.Kürthy**  
Effect of BRLP-42 on Vascular Reactivity of Diabetic Arterial Beds  
Biorex Research and Development Co.  
Diabetologia Vol. 37 (SupplI) 1994.19 A 7  
**IF: 5.136**
7. Hegedűs E, Bíró K, Jaszlits L, Jednákovits A, **Kürthy M.**, and Bácsy E  
Protective Effect of BRLP-42 on Experimental Retinopathy  
Biorex Research and Development Co., and \* Institute of Experimental Medicine

**IF: 5.136**

**8.** Rozsos I, Sinay L, Kasza G, Litter I, **Kürthy M**, Weisdorn R, Róth E, Kollár L

A diabetic foot szindrómás betegek hemorheológiai nyomomkövetése

Érbetegségek 2005. Suppl. 2. 38.

**9.** Cserepes B, Jancso G, Rác B, Gasz B, Ferencz A, Borsiczky B, **Kürthy M**, Lantos J, Róth E

Az Urocortin jelentősége a szívizom pre-és poszt kondicionálásában

Cardiologica Hungarica 36. A15. 2006.

**10.** Jancso G, Cserepes B, Gasz B, Ferencz A, Borsiczky B, **Kürthy M**, Lantos J, Róth E.

Hemoxigenáz – 1 expressziója és citoprotektív hatása a myocardium késői prekondicionálásában

Cardiologica Hungarica 36. A20. 2006.

**11.** Lantos J, Csontos C, **Kürthy M**, Füredi R, Róth E.

The time course of leucocyte activation markers after burn injury.

Eur. Surg. Res. 38. S(1) (P45) 134

**IF: 0,706**

**12.** Cserepes B, Jancso G, Racz B, Gasz B, Gaszner B, **Kürthy M**, Lantos J,

Róth E

Cell protective role of urocortin against ischemia/reperfusion injury in the process of pre-and postconditioning on cultured cardiomyocytes

Experimental and Clinical Cardiology 11. (3) A8. 248. 2006.

**13.** Bátor A, Jancsó G, Sinay L, **Kürthy M**, Lantos, Németh G, Balatonyi B, Arató E, Róth E.

Oxidatív stressz és leukocita aktiváció csökkentése iszkémia-reperfúziót követően poszt kondicionálással.

Folia Hepatologica, 2007 október vol11, suppl 3; 10

**14.** Jancsó Gábor, **Kürthy Mária**, Cserepes Barbara, Lantos János, Sinay László, Arató Endre Róth Erzsébet.

Reperfúziós károsodások csökkentése poszt kondicionálással.

Cardiologica Hungarica 2007. Május (Suppl.A) A19

**25. Dr Jancsó Gábor, Dr Sinay László, Kürthy Mária, Dr Lantos János, Bátor Anna, Németh Gábor, Balatonyi Borbála, Dr Arató Endre, Prof Dr Róth Erzsébet**

Iszkémiás poszt kondicionálás hatása hasi aorta okklúziót-reperfúziót követő oxidatív stressz

---

mértékére.

Magyar Sebészet Suppl.

**16. E Róth, B Cserepes, , B Rác, J Lantos, Sz Horváth, S Ferencz, M Kürthy, Sz Bertók, G Jancsó.**

Postconditioning and urocortin treatment conferred protection against ischaemic-reperfusion injury on cultured cardiac myocytes. XIX World Congress of the ISHR 2007.06 22-25. Bologna, Italy.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, june 2007.

**IF: 4,954**

A témához szorosan nem kapcsolódó közlemények impaktfaktora: **17,308**

A témához szorosan nem kapcsolódó absztraktok impaktfaktora: **31,76**

**Összes impakt faktor: 49,00**

---

## **9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:**

Hálás szívvel, és nagy szeretettel köszönöm Róth professzorasszonynak a munkám során nyújtott felbecsülhetetlen segítségét és támogatását, mely nem csak a szakmai kérdésekre, hanem minden létező problémámra kiterjedt.

Nagyon nagy szeretettel mondok köszönetet Dr Arató Endrének a Baranya Megyei Kórház főorvosának, és Dr Jancsó Gábornak, munkatársaimnak, akikről nyugodtan mondhatom, hogy a közös szakmai munka és az együttes gondolkodás során igazi jó barátaim lettek, amire nagyon büszke vagyok. Itt szeretném megköszönni Tóthné Fajtik Csilla fáradhatatlan, és lekiismeretes aszisztensi munkáját, mellyel nagymértékben hozzájárult a laboratóriumi munkák sikeréhez.

Szeretném megköszönni Wéber György professzor úrnak, aki Róth professzor asszonytól vette át az intézet vezetését, hogy lehetőséget adott a munka töretlen folytatásához.

Nagyon sok segítséget kaptam a Sebészeti Oktató és Kutató intézetben dolgozó valamennyi munkatársamtól, mégis szeretném kiemelni Dr Lantos János hasznos tanácsait, és segítségét, valamint Bakainé Matus Ilonának, titkárónknak az adminisztratív munkákban nyújtott segítséget.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Férjemnek, fiaimnak és szüleimnek azt a sok szeretetet és türelmet, amivel támogatták munkámat és minden törekvésemet.