

**Oxigén szabad gyökök által mediált változások
a kardiorespiratórikus rendszerben
(kísérletes és klinikai vizsgálat)**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Czopf László

program- és témavezető: Dr. Tóth Kálmán

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Pécs, 1999.

Tartalomjegyzék

Rövidítések és névmagyarázatok jegyzéke	2
1. ÁLTALÁNOS RÉSZ	4
1.1 Az oxigén szabad gyökök keletkezése és hatásai	4
1.2 Az oxigén szabad gyökök feltételezett patogenetikai jelentősége a kardiorespiratórikus rendszerben	5
1.3 Az akut respiratórikus disztrész szindróma és a hiperoxia által létrehozott tüdőkárosodás	13
2. SAJÁT VIZSGÁLATOK	16
2.1 Bevezetés	16
2.2 Alkalmazott módszerek	17
2.3 Eredmények és megbeszélés	29
2.3.1 Pulmonális oxigén toxicitás kivédésének lehetősége intratracheális surfactant készítmények adásával	29
2.3.2 Pulmonális oxigén toxicitás kivédésének lehetősége intratracheálisan adott, liposzómához asszociált antioxidáns enzimekkel	35
2.3.3 Farmakológiai hatások befolyása az oxigén szabad gyök mediálta folyamatokra iszkémiás szivbetegekben	44
2.3.3.1 Per os lovasztatin	44
2.3.3.2 Exogén nitrát	53
2.4 Következtetések	58
Irodalomjegyzék	60
A témához kapcsolódó saját közlemények	78
Köszönetnyilvánítás	81

Rövidítések és névmagyarázatok jegyzéke

- „ARDS” = „acute respiratory distress syndrome” = felnőttkori/akut respiratorikus distressz szindróma
- „BE” = „Bergmeyer egység” = a kataláz aktivitás hagyományos mértékegysége
- „bronchoalveoláris lavage” = Folyadékkal történő többször ismételt hörgőmosás diagnosztikus célból vagy kísérletekben az alveoláris makrofágok különválasztása, a pulmonális surfactant izolálása, az alveolusokba került idegen anyag kimosása céljából.
- „CAT” = kataláz enzim
- „CCS” = „Canadian Cardiovascular Society” által bevezetett súlyossági osztályozás angina pectoris-ban.
- „CHAPS” = 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate = detergens
- „CLSE” = „calf lung surfactant extract” = borjú tüdő mosásával, majd lipidektraktációval nyert surfactant készítmény.
- „compliance” = tágulékonyság
- „Cu, Zn SOD” = réz, cink tartalmú szuperoxid dizmutáz enzim
- „EXOSURF” = a Burroughs Wellcome, később Glaxo-Wellcome Co. (Durham, NC, U.S.A.) gyógyszergyár által forgalmazott szintetikus surfactant.
- „FITC” = fluoreszcein izotiocianát
- „HMG-CoA” = 3-hidroxi-3-metil-glutaril-koenzim A
- „INFASURF” = CLSE (calf lung surfactant extract) = borjú tüdő mosásával, majd lipidektraktációval nyert surfactant készítmény (SONY Inc., Buffalo, NY, U.S.A.)
- „JMEM” = „Joklik's modified minimum essential medium” = sejtek tárolásához és tenyésztéséhez használt oldat.
- „LDL” = „low density lipoprotein”
- „Mn SOD” = mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz enzim
- „OCT compound” = fagyasztott metszetek készítéséhez használt beágyazóanyag.
- „oxigén szabad gyökök” = „reaktív oxigén intermedierék” = „parciálisan redukált oxigén intermedierék” = A jelen munkában az igen reaktív, párosítatlan spinű elektronnal rendelkező (pl. szuperoxid anion, hidroxil gyök, lipidperoxidok, nitrogén monoxid, peroxinitrit), vagy azokhoz hasonlóan viselkedő anyagokat (pl. hidrogenperoxid) jelentik.
- „NBD-Cl₂-PC” = 1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-Glycerol-3-Phosphocoline = NBD fluoreszcens festékkel jelölt foszfatidilkolin
- „NK-sejt” = „natural killer sejt” = citotoxikus funkciójú sejttípus
- „n. s.” = „nem szignifikáns”
- „PDGF” = „platelet derived growth factor” = trombocita eredetű növekedési faktor
- „Rhod-PC” = 1-Palmitoyl-2-Caproyl-sn-Glycerol-3-Phosphocoline-N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl) = rodamminal jelölt foszfatidilkolin
- „scavenger” = gyökfogó, szabad gyököket hatástalanító mechanizmus.
- „S. D.” = standard deviáció = szórás
- „S.E.M.” = „standard error of the mean” = középérték középhibája
- „Sigma” = Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.
- „SOD” = szuperoxid dizmutáz enzim
- „SP-B, SP-C” = surfactant B valamint C apoprotein
- „surfactant” = A tüdő alveolusainak felszínét burkoló, a II. típusú tüdőhámsejtek által termelt felületaktív, döntően lipidekből, kisebb részben apoproteinekből álló anyag.
- „TRITC” = tetrametilrodamin-5-(és-6-)-izotiocianát

1. ÁLTALÁNOS RÉSZ

1.1 Az oxigén szabad gyökök keletkezése és hatásai

Az oxigén szabad gyökök, más néven reaktív oxigén intermedierek folyamatosan termelődnek az élő szervezetben, ahol az aerob anyagcsere melléktermékeként az oxigén részleges redukciója során jönnek létre (Cohen 1994). Különleges jelentőségüket nagyfokú kémiai reakcióképességük adja, melyel non-enzimátikus oxidoredukciós láncreakciókat képesek beindítani. Ezeknek a folyamatoknak elsősorban az élő szervezetet károsító hatásait ismerjük részletesen, melyek kivédésére valamint fékezésére bonyolult enzimatikus és non-enzimátikus antioxidáns kompenzációs mechanizmusok léteznek. Számos oxigén szabad gyök mediálta folyamatnak van fiziológiai jelentősége is. Ezek a folyamatok elsősorban lokális, rendkívül gyors és érzékeny szabályozó mechanizmusok közvetítésében szerepelnek (pl. nitrogén monoxid, peroxinitrit), valamint immunológiai folyamatokban, amikor az idegen ágenszt célzottan károsítják (a monocita - makrofág rendszer és a neutrofil granulociták által közvetített immunitás) (Halliwell 1994).

A szabad gyökök detektálása az igen rövid élettartamuk és a rövid térbeli hatótávolságuk miatt bonyolult. Gyakran a gyökök által mediált reakciók végtermékeit (lipid peroxidok, nitrotirozin, nitrátok, nitritek), a nagy valószínűséggel általuk okozott károsodás mértékét [kálium kiáramlás (Jávor 1990), membrán fluiditás csökkenés, enzimaktivitás csökkenés, nukleinsav károsodás], az ellenük fellépő védekező mechanizmusok aktivitását (szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz, glutation oxidált és redukált forma) mérjük és próbálunk ezekből következtetni a gyökök viselkedésére. A potenciálisan reaktív oxigén intermedierek által okozott károsodások közvetett vizsgálatára a rendszerbe vitt mesterséges vagy

természetes scavengereket (Röth 1987), gyök-keltő rendszereket ill. ezek megváltoztatására alkalmas génkonstrukciókkal történő transzfeekciót használunk (Wispe 1992). A genetikailag valamilyen antioxidáns mechanizmus vagy gyökképzés szempontjából rendellenes (vagy ilyené tett) állatok megfigyelése [pl. extracelluláris szuperoxid dizmutáz hiányos egér (Carlsson 1995)] is fontos indirekt eszköz az oxigén szabad gyökök patofiziológiai szerepének tisztázásában.

1.2 Az oxigén szabad gyökök feltételezett patogenetikai jelentősége a kardiorespiratórikus rendszerben

A kardiorespiratórikus rendszer egyik alapvető funkciója a szervezet és a szervek aerob anyagcseréhez szükséges oxigénnel történő ellátása. Nem meglepő, hogy az oxigén és gyök természetű metabolitjai jelentős oxidatív terhelésnek is teszik ki ezt a szervrendszert, számos szabályozási mechanizmusuk és kórfolyamatuk alapvetően függ össze az oxigén jelenlétével és/vagy hiányával valamint az oxigénkoncentráció változásaival. Ennek megfelelően kiemelt jelentőségű a respiratórikus és keringési szervek antioxidáns apparátusa (Freeman 1982, Panus 1988).

I. táblázat: Példák az oxigén szabad gyökök által keltett károsodásokra a kardiorespiratórikus rendszerben:

- a.
- Hiperoxia (Freeman 1983, Turrens 1984, Padmanabhan 1985, Wispe 1992, Carlsson 1995, Prayssac 1997), toxinok (pl. paraquat), infekciók, dohányzás és légszennyeződés által keltett pulmonális epithel károsodás.
 - akut respiratórikus disztrepsz szindróma (Holm 1985, Holm 1987, Holm 1988, Baker 1989, Baker 1990, Baker 1991, Leff 1993, Hartog 1995, Tanswell 1995, Fink 1996, Janssens 1996).
 - „sok-szerv-elégtelenséggel” („multi-organ-failure”) járó valamint sokkot követő tüdőkárosodás (Szabo 1996).
 - veleszületett respiratórikus disztrepsz szindróma (Davis 1993), bronchopulmonális diszplázia (Saugstad 1996).
 - primér pulmonális hipertenzió.
 - autoimmün tüdőbetegségek.
 - tüdő transzplantátum rejeckió, más szerv transzplantátum rejeckiója kapcsán keletkező tüdőkárosodás.
 - sugárzás okozta tüdőkárosodás.
 - toxikus (pl. bleomicin, paraquat által okozott) valamint idiopátiás tüdőfibrozis,
 - hypoxiás tüdőkárosodás (Török 1986/2).
 - porártalom valamint azbeszt által okozott tüdőkárosodás (Zhu 1998).
 - koronáriaszklerózis (Mózsik 1992), iszkémia-reperfüziós miokardium károsodás (Burton 1985, Róth 1985, Kolata 1986, Török 1986, Ravinder 1996), miokardiális infarktus (Engler 1989).
 - reperfüziós aritmiák (Hankovszky 1986, Török 1987, Bernier 1989, Cerbai 1991, Charnock 1994, Aiello 1995, Twomey 1997); antiaritmiás szerek által okozott toxicitás (Vereckei 1993).
 - a „kábul” és „hibermált” miokardium.
 - szívmutétnél használt kardioplégia során bekövetkező miokardium károsodás (Nicholson 1997).
 - paraoxonáz enzim deficiencia kapcsán fokozott kardiovaszkuláris rizikó.
 - ballonkatéteres tágtáást követő koronária resztenózis (Faxon 1995, Késmárky 1998).
 - szívtranszplantátum rejeckiója kapcsán létrejövő miokardium-károsodás.
- c.
- egyes kardiomyopathiák és toxikus myokardium léziók; pl. antraciklin antibiotikumok (Shan 1996) valamint retrovirus ellenes gyógyszerek által okozott dilatatív kardiomiopátia (Szabados 1999).
 - a vaszkuláris endotélium, majd a teljes érfal károsodása különböző hatásokra (diabétes mellitusz, hipertónia, hiperlipoproteinémia), endotél diszfunkció, ateroszklerózis (Beckman 1994, Witztum 1994).
 - vaszkulitiszek.

Szinte minden vasoaktív anyag (szerotonin, hisztamin, bradikinin, P-anyag, endotelin-1, adenin nukleotidok, noradrenalin, trombin) vazodilatáló hatását endoteliális vasoaktív faktorok módosítják vagy közvetlenül okozzák. 1986-87 óta tudjuk (Palmer 1987), hogy az endotél sejtek nitrogén monoxid gyököt termelnek, mely a vazodilatátor hatások nagy részéért felelős (Moncada 1991). A nitrogén monoxid további funkciói (Tomera 1994): prosztaciklinhez hasonlóan gátolja a trombocita aggregációt, magas koncentrációban gátolja a vaszkuláris simaizom proliferációt (Munro 1994), redox-szenzitív mechanizmus révén gátolja adhéziós molekulák (pl. VCAM-1) nukleáris transzkripcióját (Kubes 1991, Niu 1994), SH csoportok nitrozilálása révén enzimek funkcióját módosítja, hatással van a hemoreológiai paraméterekre (Bogár 1986, Tóth 1994, Tóth 1995), neurotranszmitter. Megváltozott metabolizmusa szerepet játszhat az ateroszklerózis kialakulásában (White 1994). Számos nitrogén monoxid funkciót alapvetően befolyásol egy bonyolultan szabályozott szabad gyökös reakciósor: a nitrogén monoxid szuperoxid gyökkel történő reakciója során peroxinitrit jön létre, amelynek további átalakulása az erősen károsító hidroxil gyök képződéséhez vezet (Freeman 1994, Müinzel 1997). A keletkezett hidroxil gyök a lipideket, tiolcsoportokat oxidálja valamint károsítja a sejtmembránokat (Radi 1991, Beckman 1994, Liu 1994).

A gyulladáshoz vezető folyamatokban, az iszkémia-reperfúziós jelenségekben valamint más, parciálisan redukált oxigén intermediekek által mediált károsodásokban jelentős szerepük van a kemotaxis révén beáramló, endotélhez tapadó, majd a szövetet infiltráló neutrofil granulocitáknak (Litt 1989). A leukocita-endotél adhéziós molekulák fontosak a fenti jelenségekben (Smith 1993, Carlos 1994, Rainger 1995, Murota 1995, Smith 1997). A neutrofil granulociták által termelt reaktív oxigén intermediekek szerepet játszhatnak a vörösvérsejtek membránjának károsításán keresztül a hemoreológiai viszonyok kedvezőtlen megváltozásában (Tóth 1989, Baskurt 1996).

Felmerült a von Willebrand faktor lehetséges szerepe részben a szabad gyökös károsodások közvetítésében (Visher 1995), részben pedig a neutrofil granulociták akkumulálódásában hipoxia során (pl. szervprezerváció során transzplantáció előtt) (Pinsky 1996). A von Willebrand faktor celluláris raktárakból (Weibel-Palade testek) történő felszabadulásának számos potenciális agonistáját ismerték fel az utóbbi időben [trombin, fibrin, hisztamin, komplement C5a, C5b-9, reaktív oxigén intermediek, hipoxia, peptido-leukotriének (LTC4, LTD4)]. Az ezen tényezők által megnövelt nagymolekulású von Willebrand faktor mennyiségnek valamint az azzal együttjáró P-szelektin expresszióknak szerepe lehet az endotélsérüléshez kapcsolódó trombocita adhézió létrejöttében. Patológias trombocita és leukocita adhézió révén szerepet játszhat az ateroszklerózis és a kardiális akut iszkémiás jelenségek kialakításában (Badimon 1993). Trombociták és leukociták által termelt anyagok tovább erősíthetik a von Willebrand faktor felszabadulását az endotéliumból és pozitív visszacsatolást jelenthetnek a gyulladással szabad gyökös folyamatban (Ewenstein 1997). A von Willebrand faktor regulált exocitózisa egyike lehet azoknak a mechanizmusoknak, amelyekkel a vaszkuláris endotélium irányítja a hemosztatikus, trombotikus valamint gyulladáshoz vezető folyamatokat (Gimbrone 1995).

Az iszkémiás szívbetegség patogenezisében és szövődményeinek nagy részében kulcsfontosságú szerepet játszanak a reaktív oxigén intermediek. Az LDL oxidáció, a makrofágokba történő felvétel, az endotél diszfunkció, az ateroszklerotikus plakk ruptúra, a miokardiális infarktus és kábult miokardium valamint a posztperfúziós jelenségek oxigén szabad gyökök közreműködésével alakulnak ki. Amellett, hogy az antiiszkémiás és a prevencióban használt gyógyszerek akut, rövid távú hatásait jól ismerjük, nem teljesen világosak azok a mechanizmusok, amelyek révén ezek a szerek (pl. lipidszökkentők, béta blokkolók, acetilszalicilsav) az életkutatásokat javítják, valamint nem tudjuk, hogy más, rövid távon egyértelműen hatásos szer miért

befolyásolja hátrányosan a hosszabb távú prognózist. A trimetazidin bevezetése óta elsődlegesen antioxidáns mechanizmusú antianginás szert is használunk a betegek kezelésében.

A koronária szívbetegség szekunder prevenciójában meggyőző sikerek érhetők el a hidroximetil-glutaril-koenzim-A (HMG-CoA) redukáz gátló gyógyszerek adásával (Scandinavian 1994, Gotto 1996, Sacks 1998). A kezelt betegcsoport életkilátásai javulnak.

Újabbban a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek primér prevenciójában is jó eredményekről számolnak be (Furberg 1994, Shepherd 1995, Sacks 1998). Plakk stabilizáló, ateroszklerózist gátló, valamint ateroszklerotikus plakk visszafejlesztő hatásaik váltak ismertté (Maas 1994, Brown 1995, Corsini 1995, Jukema 1995).

Régóta tudjuk, hogy a koleszterinszint csökkentése a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás csökkenéséhez vezet (Lipid 1984). A koleszterinszint csökkentése emberben javítja az endotélium dependens koronária vazodilatációt (Egashira 1995). HMG-CoA redukáz gátlók antiateroszklerotikus hatásúak koleszterinnel táplált nyulakban (Bocan 1994). Szímvasztatin egy hónapos kezelés során javította az endoteliális funkciót (O'Driscoll 1997). Állatkísérletekben a koleszterinszint-csökkentése jelentősen csökkentette a vaszkuláris endotél hiperkoleszterinémia által okozott szuperoxid anion képzését (Ohara 1993). Emberben nincsenek egyértelmű bizonyítékok az endotél koleszterinfüggő szuperoxid képzésére, valamint nem világos, hogy ezen gyógyszerek hatása mennyiben a szérum koleszterin szint csökkentésén keresztül valósul meg, mennyiben pedig más, a koleszterin- vagy szteroidszintézisben résztvevő intermedier mennyiségének módosításán, a mevalonsav-anyagsere befolyásolásán (Roulet 1995), protein-izopreniláció gátláson (poszttranszlációs modifikáció) (Roulet 1995, Iwama 1995). géneexpresszió módosításon (Miller 1995), antiproliferatív hatáson (Soma 1995,

Iwama 1995), membrántulajdonságok, membrán NADPH-dependens oxidáz aktivitásának befolyásolásán (Day 1997), hemoreológiai paraméterek módosításán (Tóth 1989), immunológiai úton (Kurakata 1996) vagy eddig ismeretlen mechanizmuson keresztül. Szimvasztatin csökkenti a neutrofil granulociták sejtmembránjában elhelyezkedő NADPH-dependens oxidáz aktivitását (Day 1997), és növeli a plazma NO_2^- , NO_3^- -szintjét (Nakashima 1996). Szimvasztatin csökkenti a miointimális proliferációt koleszterinnel táplált nyulakban (Dol 1996). A trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF) sejtproliferációt vált ki, amely a foszfatidilinozitol-3-kináz enzim aktiválódásával jár. A lovasztatin csökkenti a ^3H -timidin beépülés alapján mérhető celluláris proliferációt valamint a foszfatidilinozitol-3-kináz enzim aktivitását is. A lovasztatin növekedést gátló hatását mevalonsavval meg lehet szüntetni. A mevalonsav-anyagcsere gátló fluoromevalonsav gátolja a sejtproliferációt. Ezek alapján felmerül, hogy a PDGF hatására létrejövő sejtproliferáció fehérje-izopreniláción keresztül megvalósuló folyamat (Iwama 1995). A HMG-CoA reduktáz gátlók, különösen a lipofil sajátságúak mint pl. a szimvasztatin immunológiai hatással is rendelkeznek: limfocita funkció gátló hatások van (limfocita proliferatív választ és az NK-sejt citotoxicitást gátolják), mely 90% feletti HMG-CoA reduktáz gátlás esetén jelenik meg (Kurakata 1996). Olyan koncentrációban, ahol még sem jelentős HMG-CoA reduktáz gátló hatások, sem limfocita funkció gátló hatások nincs, erősen fokozzák a ciklosporin A T-sejtválaszt gátló hatását (Kurakata 1996). Mivel az ateroszklerotikus léziókban T-limfociták is vannak (Watanabe 1995), ezeknek a hatásoknak sem kizárt a jelentősége az ateroszklerózisos patomechanizmus kezelésében.

A gyökös folyamatok hatásmechanizmusban játszott szerepének tisztázására vizsgáltuk meg a HMG-CoA reduktáz gátlók celluláris gyökképzésre gyakorolt hatását hiperkoleszterinémias betegekben.

Az igen régóta használt, de a közelmúltban ismét az érdeklődés előterébe került nitrátok csoportja ellentmondásos szerepet játszik ma a kardiológiai terápiában. A nitrát gyógyszerek hatékony formája a nitrogén monoxid, amely belőlük az endotél és simaizom sejtekben képződik (Feelish 1991). Előrehaladott iszkémiás szívbetegségben az endogén, endotélium által kibocsátott NO mennyiség jelentősen csökken, exogén módon bevitt nitrogén monoxiddal az egyértelmű antianginás hatékonyság mellett az endotél diszfunkció számos következménye kivédhető lenne (pl. a fokozott trombocita aggregáció). Számos helyzetben azonban (pl. reperfüziós állapotok, aktív iszkémia nélküli koronária betegség) a nitrátok alkalmazásának jogossága megkérdőjelezhető. A koronária szívbetegség szekunder prevenciójában az eddigi tanulmányok szerint az életkilátásokat nem javítják. Ugyanakkor a nitrogén monoxid és a szuperoxid anion reakciója következtében súlyosan károsító hatású szabad gyökök keletkezhetnek.

Állatkísérletesen előidézett korai ateroszklerózisban érdekes módon jelentősen emelkedett NO-szintáz okozta nitrozilációt találtak (Minor 1990). Polietilénlikollal összekötött valamint liposzómákhoz asszociált szuperoxid dízmutázzal jelentősen javítani lehetett az acetilkolin és kalcium ionofór hatására bekövetkező endotélium-dependens vazodilatációt koleszterinrel táplált állatokban (Mugge 1991, White 1994). Négy héttel a koleszterin táplálás megkezdése után nyúl aorta szegmentumokban háromszorosa növekedett szuperoxid anion termelődést találtak direkt mérésekkel a kontrollhoz képest (Ohara 1993). Ezekből arra következtethetünk, hogy hiperkoleszterinemiában valamint korai ateroszklerózisban a nitrogén monoxid termelődés nem csökken, hanem a szuperoxid anionnal történő reakciója révén a termelődött NO elbomlik. Az ennek során még az endotéliumban keletkező peroxinitrit gyök sejtmembránkárosító és LDL-oxidáló hatással rendelkezik. Hiperkoleszterinémia során átkapcsolás jön létre az endotélfüggő vaszkuláris relaxáció mechanizmusában is: cGMP-mediálta folyamat helyett a sejtek hiperpolarizációjával járó folyamatot látunk (Najibi 1995).

A krónikusan alkalmazott nitrátok hatásosságát korlátozza a nitrát tolerancia jelensége. Nyulak három napos nitroglicerinnel kezeltét követően az izolált, fenilefrinnel kontrahált aorta szegmensek nitrát toleranciája csökken ha az endotél eltávolították. A nitrát tolerancia tehát legalábbis részben endotélfüggő folyamat. Nitrát toleranciában a vaszkuláris szuperoxid anion képződés kétszeresére emelkedett. A "toleráns" erek endotéljének eltávolítása a szuperoxid anion képzés csökkenéséhez vezetett. Mivel a "nem toleráns" erek endotéljének eltávolítása a szuperoxid anion képzését eredményezte, a nitrát tolerancia során észlelhető fokozott szuperoxid termelés elsődleges helyszíne minden bizonnyal az endotélium. A szuperoxid anion és nitrogén monoxid reakciójából keletkező peroxinitrit rövidebb ideig marad fenn, és a guanil-cikláz enzimet lényegesen kevésbé stimulálja. A nitrát tolerancia során megfigyelhető csökkent vaszkuláris nitroglicerinnel való válaszi normalizálni lehetett liposzómákhoz asszociált szuperoxid dizmutázzal. Hidralazin mind a vaszkuláris szuperoxid-termelés-növekedést, mind a nitrát toleranciát megelőzte. Mivel flavoprotein-oxidáz-gátló megszüntette a nitrát tolerancia hatását a bekövetkező szuperoxid túltermelést valamint mivel specifikus inhibitorokkal a mitokondriális oxidázokat, NO-szintázt, xantinn oxidázt ki lehetett zárni, valószínű, hogy az emelkedett szuperoxid képzés helye nitrát toleranciában a plazmamembrán NADH- és NADPH-dependens oxidáza (Münzel 1995). Lehetséges, hogy az oxidázok aktiválásában neurohumorális jelenségek is szerepelnek, mint például angiotenzin II.

A nitrát gyógyszerek farmakológiai hatásainak pontosabb megértéséhez nélkülözhetetlen a gyökös reakciókban történő részvételük részletesebb elemzése. Emiatt tanulmányoztuk a celluláris valamint vérplazma oxidáns-antioxidáns rendszereire vonatkozó hatásukat.

A felnőttkori respiratórikus disztrész szindróma (ARDS) számos, legkülönbözőbb etiológiájú betegség súlyosan előrehaladott stádiumában fellépő tünetegyüttes, melyre jellemző az oxigénbelélegeztetés ellenére csökkenő artériás oxigén tenzió, a mellkasröntgenvizsgálat során a tüdőben található foltos árnyékoltság; az ezek hátterében álló, nem kardiális eredetű pulmonális ödéma és a modern intenzív terápia mellett is 50-80%-os halálozás. Az oxigén valamint parciálisan redukált intermedierjei (oxigén szabad gyökök) jelentős szerepet játszanak az ARDS patogenezisében, a diffúz endotélkárosodás kialakításában (Cattravas 1996), a surfactant funkció csökkenésében, a gyulladásos reakció létrejöttében és az alveolokapilláris membrán irreverzibilis károsodásában.

1.3 Az akut respiratórikus disztrész szindróma és a hiperoxia által létrehozott tüdőkárosodás

A pulmonális oxigén toxicitás a vaszkuláris membrán károsításán, az alveolokapilláris permeabilitás növelésén, a gyulladásos reakció provokálásán kívül markánsan károsítja az alveolusok felszínét borító surfactant-et és a termelődéséért valamint recirkulációjáért felelős II. típusú tüdőhámsejteket (Hartog 1995). Ez részben az alveoláris felszín sérülékenységéhez, az alveolokapilláris transzportfolyamatok kényes egyensúlyának megbomlásához, a nagy kiterjedésű alveoláris felszín fizikai tulajdonságainak megváltozásához és a tüdő compliance-ának jelentős romlásához vezet. Ezen kulcsfontosságú, sok esetben a kórfolyamat visszafordíthatatlanságához vezető surfactant károsodás ellensúlyozására kísérletünk meg többféle surfactant készítményt kívülről bevinni a kísérleti állatok tüdejébe. A borjú tüdő mosásával (bronchoalveoláris lavage) nyerhető „calf lung surfactant extract - CLSE” tartalmazza a surfactant lipidkomponenseit és B valamint C típusú apoproteinjait is (Matalon 1990), így a felületi feszültség hatásos csökkentésére a bejuttatást követően önállóan képes, míg a szintetikus előállított

EXOSURF, mely meghatározott arányú lipidkomponenseken kívül egy alkoholkomponenst is tartalmaz, a tüdőben kombinálódik az ott jelenlévő apoproteinekkal és fejt ki hatását.

Az intravénásan beadott liposzómákat jelentős mennyiségben veszik fel a retikuloendotéliális rendszer sejtjei, és csak kevés jut el a tüdő sejtjeiig. A tracheába juttatott anyagok nagyobb arányban maradnak a tüdőben, de számolnunk kell a mukociliáris bronchiális tisztítómechanizmussal, a nagy méretű légutakban történő kitapadással, a bonyolult, levegővel telt kapilláris csőrendszerbe történő folyadékbejuttatás fizikai problémáival, az alveolusok szintjéig lejutó kis mennyiséggel, az egyes tüdőrészekbe valamint a különböző alveolusokba kerülő eltérő mennyiségekkel, az alveoláris makrofágok általi felvétellel (Juliano 1981, Michelson 1981, Tanswell 1987, Gregoriadis 1988).

A bejuttatásra aeroszól valamint oldat formájában van lehetőség. Előbbit az egyenletesebb eloszlás, de kis hatásos bejuttatott mennyiség, utóbbit az egyenetlenebb eloszlás és a lényegesen nagyobb hatásos mennyiség jellemzi (Brain 1976, Lewis 1991).

A bejuttatás hatásosságát elsősorban makroszkóposan, különböző festékek valamint izotópos jelölés használatával mutatták meg. Mind az aeroszól, mind az oldat formájában beadott surfactant hatásosnak bizonyult veleszületett respiratórikus disztressz szindrómában valamint állatkísérletesen előidézett felnőttkori respiratórikus disztressz szindrómában (Matalon 1990, Lewis 1991). A tüdőbeli eloszlás és hatásos bejuttatott mennyiség fontosságát jelzi, hogy a veleszületett respiratórikus disztressz szindrómával ellentétben az eddigi humán klinikai vizsgálatokban az *in vitro* és állatkísérletes eredmények ellenére csak átmeneti javulást sikerült elérni az oxigenizációs paraméterekben és a klinikai képen (Nicholas 1997). A surfactant proteinek és lipidkomponensek tüdőbeli mennyiségének géntechnológiai fokozására irányuló próbálkozások ígéretesek (Ye 1994, Korst 1995, Li 1997).

A tüdő oxigén okozta vagy szabad gyökös károsódásainak kivédésére alkalmazott exogén antioxidánsok hatása függ:

1. a tüdő szerkezeti felépítésétől, élettani funkcióitól,
2. az antioxidáns fajtájától,
3. az antioxidáns mennyiségétől, koncentrációjától és térfogatától,
4. a bejuttatás módjától,
5. az oxidatív stressz természetétől.

A károsodott surfactant pótlásán kívül próbálkoztak az alveoláris felszín antioxidáns védelmének növelésével is a lokális enzimatikus és non-enzimatikus antioxidáns rendszerek aktivitásának fokozása formájában. Újszülött állatokon végzett vizsgálatok intratracheálisan önmagában adott recombináns, humán CuZn SOD-vel eredményesek voltak (Davis 1993, Sahgal 1996). Intratracheálisan adott antioxidáns enzimek felnőttben nem bizonyultak meggyőzően hatásosnak a pulmonális oxigén toxicitás során kialakuló károsodás csökkentésére (Crapo 1977). Ennek magyarázata részben az lehet, hogy a nagy molekulák a felnőtt tüdő sejtsíbe nem képesek bejutni. Polietilénlikol valamint liposzómák alkalmazása az antioxidáns enzimek bejuttatása során lényegesen javította terápiás hatásosságukat (Freeman 1985, Padmanabhan 1985, Buckley 1987, Baker 1991, Tanswell 1995), valamint pulmonális antioxidáns enzimek génexpressziójának megnövelése is hatásos volt (Wispe 1992).

2. SAJÁT VIZSGÁLATOK

2.1 Bevezetés

Vizsgálataim fő célkitűzései a következők voltak:

1. Tanulmányozni kívántam a hiperoxia által okozott, oxigén szabad gyökök által mediált pulmonális epitel károsodás kivédésének vagy csökkentésének lehetőségét intratracheálisan adott surfactant készítményekkel valamint liposzómához kötött antioxidáns enzimekkel.
2. Humán vizsgálatokkal tisztázni kívántam a koronária szívbetegség valamint hiperlipoproteinémia kapcsán a vaszkuláris rendszert károsító oxigén intermedierek kimutathatóságát és antianginás valamint antiipémiás gyógyszeres kezelés befolyását a vérből kimutatható szabad gyökös folyamatokra, az intra- és extracelluláris antioxidáns rendszerekre.

2.2 Alkalmazott módszerek

Kísérleti állatok: Hím, Pasteurella-mentes New Zealand fehér nyulakat használtunk, melyek 1.9 és 2.1 kg közti tömegűek voltak (1, 2, 3, 5). A nyulak igényük szerint kaptak táplálékot és vizet. A vizsgálatokat a kísérleti állatokra vonatkozó etikai elvek tiszteletben tartásával végeztük.

Szubletális hiperoxiás károsodás állatkísérletes modellje: (3) A nyulakat speciálisan tervezett, a hőcsere elősegítésére fémtestővel ellátott kamrákban tartottuk olyan módon, hogy az állatok etetése, itatása és az ürülék eltávolítása a kamra gázösszetételének megváltoztatása nélkül lehetséges volt. A hiperoxia során a kamrát 60 órán keresztül folyamatosan 100%-os oxigénnel áramoltattuk át 10 l/perc sebességgel. A kamra légterének oxigénkoncentrációját több alkalommal ellenőriztük oxigén analízátor segítségével és minden alkalommal 96 és 100% között volt. A széndioxid koncentráció 0.3% alatt maradt. A kamra hőmérséklete 23-24 °C, páratartalma: 80% volt. A kontroll csoportot hasonló körülmények között, de a kamrán normális levegőt átáramoltatva tartottuk.

Surfactant fluoreszcens jelölés: (3, 4, 5) (1:500 valamint 1:100 arányban NBD-vel kovalensen összekötött foszfatidilkolint, „NBD-C₁₇-PC”-t / 1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-y)amino]dodecanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphocoline/; más esetben 1:780 arányban rodaminnal kovalensen kapcsolt foszfatidilkolint, „Rhod-PC”-t / 1-Palmitoyl-2-Caproyl-sn-Glycero-3-Phosphocoline-N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl)/ kevertünk a surfactant készítményekhez (EXOSURF, Burroughs Wellcome, később Glaxo-Wellcome; INFASURF, SONY Inc.), majd a fluoreszcens lipidek és az INFASURF oldására használt kloroformot a rendszerből folyamatos keverés mellett 45 °C-on elpárologtattuk (Rotavapor; Büchi, Svájc) és a jelölt surfactant-et fiziológias sóoldatban szuszpendáltuk, majd a lipid-aggregátumok szétozlatása céljából egy 27-gauge átmérőjű injekcióstűn keresztül átnyomtuk. A

fluoreszcens foszfolipidek az Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, U.S.A.) termékei.

Surfactant felületi feszültségének mérése oszcilláló buborékban: (Enhorming 1977, 4, 5) A felületi feszültség mérő készülék ("Pulsating bubble surfactometer", Electronics Co., Amherst, NY, U.S.A.) lehetővé teszi egy felületaktív anyagot is tartalmazó folyadékokban kialakított kis légbuborék gáz-folyadék határfelületén létrejött nyomás folyamatos mérését. A buborék mérete egy kapilláris csövön keresztül adott levegővel változtatható: a sugár 0.55 és 0.4 mm között oszcillál percenként 20 alkalommal (ez a buborék-méret változás 50%-os felületcsökkenésnek felel meg). A felületi feszültséget a kapilláris csőben mért nyomásból és a buborék aktuális méretéből számítjuk a Young - Laplace törvény szerint, a buborékot gömb alakúnak tekintve. Az oszcillálás során a kisebb átmérőhöz tartozó felületi feszültség konstans értéket ér el. Ezt a konstans értéket nevezzük a folyadékfázisban lévő, adott koncentrációjú felületaktív anyag adott hőmérsékleten (esetünkben 37°C, 100% relatív páratartalom), dinamikus kompresszió során mért minimális felületi feszültségének.

Antioxidáns enzimek fluoreszcens jelölése: (Freeman 1985, 1, 2) a Cu,Zn SOD-hez fluoreszcein izotiocianátot kötöttünk (FITC) kovalensen 50 mM Na₂CO₃ (pH 9.5) oldatban 4°C-on egy óra hosszat történő folyamatos keveréssel. A szukcinilált katalázhoz (CAT) tetrametilrodamin-5-(és-6-)-izotiocianátot (TRITC) kötöttünk hasonlóképpen. A FITC-SOD és TRITC-CAT komplexeket Sephadex G-25 gélszűrővel tisztítottuk meg 10 mM KPO₄ (pH 7.4) eluens használatával. A liposzómákhoz kötött fehérje 10%-a volt fluoreszcensen jelölt.

Antioxidáns enzimek liposzómához kötése: (1, 2) Dipalmitoil foszfatidilkolinból (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, U.S.A.), koleszterinből és sztearilaminból (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.) 14:7:4 moláris

arányban sokrétegű, kationos liposzómákat állítottunk elő (Freeman 1983, Turrens 1984) fázisfordításos evaporációs technikával (Szoka 1978, Gregoriadis 1988). Az ilyen lipidösszetételű liposzómák korábbi vizsgálatok szerint nagyobb enzimmennyiség befogadására alkalmasak és a más összetételűekhez képest a hozzájuk asszociált hatóanyag lényegesen nagyobb mennyisége jut be a sejtekbe (Freeman 1983, Panus 1988/2). A foszfolipideket 25 mM koncentrációban 2 ml kloroformban oldottuk fel; majd 5 mg, 2800 E/mg aktivitású, szarvasmarha eredetű Cu,Zn SOD-t (Grünenthal GmbH, Germany), valamint 5 mg, 2500 E/mg aktivitású, szukcinnilált szarvasmarha eredetű katalázt (Worthington Biochemical) (1 ml 7.4 pH-jú kálium foszfát pufferben) tettünk hozzá. 30 másodperces jégen történő ultrahangos keverést követően a kloroformot vákuumos rotoevaporátorral 45 fokon elpárolagtattuk. Az így elkészült liposzómák kvázielasztikus fényszóródás vizsgálattal 1.9 ± 1.5 (S.D.) μm átmérőjűek. A liposzómákhoz nem kötődött enzimeket 30 percig, 4°C -on, $100000\times\text{g}$ -vel történő centrifugálással eltávolítottuk. Az össz-SOD és CAT aktivitás 25%-a maradt a liposzómákban korábbi vizsgálatokkal megegyezően (Freeman 1985, Tanswell 1987). A liposzómákat foszfát pufferrel 7.4 pH-ra beállított sóoldatban reszuspendáltuk 20 mM lipidkoncentrációig és egy 25 gauge vastagságú tűn átnyomtuk. Ezek a liposzómák több napig stabilak maradnak (1).

Intratracheális adagolási mód nyulakban: (1, 2, 3, 5) A nyulakat fülvenán keresztül adott 10 mg/kg ketaminnal altattuk el és maszkon keresztül alkalmazott 1.5% halotán belelegeztetésével (8 l/min 100% oxigénbe keverve) tartottuk fenn az altatást. Ezt követően hossz tengelye körül 360° -ban forgásra képes műtőasztalra rögzítettük őket úgy, hogy a műtőasztal fej felőli részét 5° -kal megemeltük. A bejuttatandó anyagot vékony (22 gauge, 2 inch) katéter (Intracath) segítségével, lidokain helyi érzéstelenítést követően, a membrana cricothyreoidea-n keresztül fecskendeztük a tracheába 1 ml/perc sebességgel. Az adagolás közben a műtőasztalt 5 fordulat/perc sebességgel forgattuk az egyenletesebb tüdőbeli eloszlás érdekében. A beadott térfogat 10.5 ml volt, ami

a nyulak teljes tüdőkapacitásának megközelítőleg 10%-át jelenti. Ez az adagolási mód veszélytelenül kivitelezhető, minden nyúl túlélte a műtétet és a bejuttatás során valamint azt követően normálisan lélegeztek. Az injekciót követően a katétert eltávolítottuk.

A fluoreszcensen jelölt surfactant intratracheális beadása: (3, 5) Az előbbiekben részletezett műtéti szituációban testtömegkilogramonként 80 mg (kb. 110 μmol) foszfolipid tartalmú surfactant-et adtunk be. Az EXOSURF a Burroughs Wellcome (később Glaxo-Wellcome Co., Durham, NC, U.S.A.) ajándéka volt, az INFASURF a SONY Inc. terméke (Buffalo, NY, U.S.A.).

Liposzómákhoz asszociált. fluoreszcensen jelölt antioxidáns enzimek intratracheális beadása: (1, 2) Kb. 20 μmol foszfolipidet tartalmazó liposzómával 2500 E Cu,Zn SOD-t és 1000 E katalázt adtunk be 10 ml foszfáttal pufferolt sóoldatban (pH 7.4). Az így beadott SOD és kataláz aktivitás elérte vagy meghaladta a nyulak tüdejében természetesen jelenlévő összes SOD és kataláz aktivitást (Freeman 1985).

A nyúl tüdő előkészítése biokémiai vizsgálat. sejtizolálás. surfactant izolálás céljából: (1, 2, 3, 5) A bejuttatást követően más-más időpontban megöltük a nyulakat 0.8 mg/kg nátrium pentobarbitál intravénás adásával. A tracheát kanuláltuk, a tüdőt izoláltuk és a pulmonális artérián keresztül hideg foszfáttal pufferolt sóoldattal átmostuk (pH 7.4; Ca^{++} mentes; 4°C) (surfactant izolálás esetén fiziológias NaCl oldattal), amíg a mosófolyadék fel nem tisztult. A tüdőt és a tracheát sértetlenül vettük ki a mellkasból, lemértük, és 30 ml foszfáttal pufferolt sóoldat adagokkal (surfactant izolálás esetén fiziológias NaCl oldattal) többszöri bronchoalveoláris mosás történt 400 ml össztérfogatig (Holm 1985). Az így nyert bronchoalveoláris folyadékot 200xg-vel 6 percig centrifugáltuk (DuPont Sorvall RT 6000 B hűtött centrifugával) a sejtcsapadék (főként alveoláris makrofágok) és sejttörmelék leüleptetésére. A bronchoalveoláris folyadék üledékéből történt az alveoláris makrofágok

izolálása (l. később). A sejtmentes mosófolyadékot használtuk a továbbiakban surfactant izolálásra (l. később). A tüdőt felapírtottuk és homogenizáltuk (egy-egy vizsgálatokban lebenyenként külön) 10 ml/g hideg foszfát pufferben (50 mM K_2HPO_4 , 0.1 M EDTA, pH 7.8) üveg-teflon homogenizátor segítségével. A homogenizátumot lecentrifugáltuk 200xg-n 10 percig a sejtörmelék eltávolítására, majd a felüliszót $-70^\circ C$ -on tároltuk. Biokémiai analízis előtt a mintákat felolvasztottuk és ultrahanggal megkevertük (Baker 1989).

A nyúl tüdő előkészítése mikroszkópos vizsgálatok elvégzése céljából: (1, 2, 3, 5) A nyulakat 15 mg/kg ketamin adásával elaltattuk, a tracheát lidokainnal történt helyi érzéstelenítést követően kanuláltuk, majd az állatokat 15 percig 100% oxigénnel lélegeztettük. Ezt követően 0.2 mg/kg pancuronium intravénás adása után a trachea kanült elzártuk. Miután 5 perc alatt a tüdő abszorpciós atelektázia következtében összeesett, a tüdőt és a szívet pulmonális artérián keresztül történt perfúziót követően eltávolítottuk a mellkasból, a szívet és a mediastinális kötőszövetet a tüdőről leválasztottuk, 50-80 ml beagyazóanyaggal (Tissue-Tek OCT compound, Miles, Diagnostics Division) a tracheán keresztül megtöltöttük, majd $-20^\circ C$ fokra hűtöttük. A beagyazóanyaggal töltött tüdők megkeményedése után a lebenyeket különválasztottuk, a lebenyhörgőkre merőlegesen 2-3 mm vastagságú szeletekre vágtuk, ezekből kb. 1 cm^2 területű blokkokat készítettünk, melyeket beagyaztunk, és $-80^\circ C$ -on tároltuk. 5-6 μm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk egy Tissue-Tek II mikrotóm (Miles; model 4553) segítségével -20 - $30^\circ C$ -on. A metszeteket a mikroszkópiáig $-20^\circ C$ -on tároltuk.

A FITC-SOD komplexek tüdőbeli stabilitásának vizsgálata: (1, 2) 4 órával liposómak bejuttatása után a nyulat megöltük, a tüdőt eltávolítottuk és homogenizáltuk a korábban leírtaknak megfelelően. A homogenizátum felüliszóját besűrítettük Centriprep-10 koncentrátor (Amicon) segítségével és Sephadex G-150 gélkromatográfiát végeztünk 50 mM KPO_4 , 0.1 mM EDTA (pH 7.8) eluenssel. 0.8 ml-nyi frakciókat gyűjtöttünk, melyeket analizáltunk

hözzávetőleges fehérjetartalom, Cu,Zn SOD aktivitás és FITC fluoreszcencia (excitáció: 494 nm, emisszió: 520 nm) (LS 50 Perkin-Elmer fluoriméter) szempontjából.

Alveoláris makrofág izolálás: (1, 2, 3, 5) A bronchoalveoláris folyadék centrifugálása során keletkezett üledéket 3 alkalommal reszuszpendáltuk foszfáttal pufferolt sóoldatban, majd újra lecentrifugáltuk 200xg-vel 6 percig tisztább sejtszuszpenzió elérésére (DuPont Sorvall RT 6000 B hűtött centrifugában) (egyes kísérletekben 500xg 10 perces centrifugálást alkalmaztunk). A vörösvérsejteket 4°C-on 0.83%-os ammóniumklorid oldattal történő 45 perces inkubálás során oldottuk fel. Az így nyert sejtek 95-98%-a alveoláris makrofág és több mint 95%-ban viábilisek tripánké-k-exklúzióval vizsgálva. Ezzel a technikával nyulanként átlagosan $6-11 \times 10^7$ sejt izolálható.

Alveoláris II. típusú tüdőhámsejt izolálás: (1, 2, 3, 5) Az izolálást tripszin és elasztáz alacsony koncentrációjú oldatával végeztük a korábban leírt módosított Finkelstein féle módszer szerint (Finkelstein 1982, Holm 1985, Holm 1988, Baker 1989, Baker 1990). Röviden: A tüdő mellkasból történő kivétele, perfúziója és bronchoalveoláris mosása valamint intratracheálisan adott 5 mg/50 ml BaSO₄ oldattal történt 15 perces inkubáció után alacsony koncentrációjú tripszint (III. típus, marha hasnyálmirigyből; 0.00175%; Sigma), elasztázt (sertés hasnyálmirigyből; 100 U; Worthington Biochemical, Freehold, NJ, U.S.A.) és dezoxiribonukleázt (DN-áz I; marha hasnyálmirigyből; 0.001%; Sigma) alkalmaztunk intraalveolárisan JMEM oldatban (37°C; Sigma). A proteolitikus emésztést 30 perc múlva 100 ml 4°C-os JMEM oldatban adott 10 térfogatszázalék hővel inaktivált főtális marhaszérum, DN-áz (0.005%) és tripszin inhibitor (0.04%; Sigma; szója, I-S) alkalmazásával. A tüdőt felaprítottuk, és tripszinizáló edényben 4°C-on 20 (egyes kísérletekben 35) percig kevertük. Csökkenő porusméretű nejlon szöveten történő szűrést követően (150, 41, és 15 µm) a II. típusú tüdőhámsejteket Percoll (Sigma) diszkontinuus sűrűséggrádiens centrifugálással választottuk ki a durva

sejtszuspenzióból. Az így nyert sejtek több mint 85%-a alveoláris II. típusú tüdőhámsejt a lamelláris testeket jelölő foszfin 3R festődés, az alkalikus foszfátáz pozitivitás ill. a Papanicolau festés alapján. Tripánkék exklúzióval a sejtek több mint 95%-a negatív, tehát viábilis. A sejtszámot Bürker kamrában állapítottuk meg. Egy nyúlból átlagosan $2-3 \times 10^8$ II. típusú tüdőhámsejtet lehet izolálni ilyen módon. A grádiens centrifugálást követően a sejteket 2 alkalommal történő centrifugálással (200xg, 5 perc) és reszuszendálással mostuk (a további felhasználásnak megfelelő pufferben).

Az izolált sejtek előkészítése mikroszkópos vizsgálatok elvégzése céljából:

(3, 5) Az alveoláris makrofágokat és II. típusú tüdőhámsejteket különleges centrifuga (Cytospin) segítségével üveg tárgylemezre centrifugáltuk, lefedtük majd azonnal mikroszkóppal megvizsgáltuk.

Mikroszkópos vizsgálatok: (1, 2, 3, 5) A fagyasztott metszeteken és a tüdőhámsejteken differencia interferencia kontraszt és epifluoreszcens mikroszkópia történt Zeiss IM-35 invertált mikroszkóppal (Zeiss 40x plánakromatikus objektív). A képeket Photometrics Series 200 cooled charge-coupled device kamera rendszerrel (Photometrics, Tucson, AZ, U.S.A) összekötött Macintosh IICI számítógép (Apple, Cupertino, CA, U.S.A) valamint IP-Lab Spectrum 2.2.1 ill. 2.5.5 képfeldolgozó program (Signal Analytics Co., Vienna, VA, U.S.A.) segítségével értékeltük. Az epifluoreszcencia kiváltásához 100 W-os higany ívlámpát használtunk hőszűrővel. Az NBD és FITC vizsgálatához standard FITC szűrőkészletet (485 ± 20 nm excitációs szűrő, 520-560 nm emissziós szűrő), a Rhod-PC és TRITC fluoreszcencia elkülönítéséhez standard TRITC szűrőkészletet (546 ± 10 nm excitációs szűrő, > 590 nm emissziós szűrő) alkalmaztunk. A fluoreszcencia intenzitásokat az adott szűrőkészlettel a metszetben észlelhető autofluoreszcencia mértékével összehasonlítva adtuk meg a háttérfluoreszcencia levonása után. A képek digitalizálása a következőképpen történt: minden négyzet alakú képegség (pixel) 0.21 μm oldalú. Minden látótérben (400x nagyítás) 221184 pixel van,

ami $9754 \mu\text{m}^2$ -nak felel meg ($23 \text{ pixel}/\mu\text{m}^2$). Az egyes pixelekhez a fluoreszcencia intenzitásának megfelelően 0 (fekete) és 16384 (fehér) közötti értéket rendelünk. Ez a felbontóképesség alkalmas arra, hogy fluoreszcens festékek eloszlását megítéljük és összehasonlítsuk a különböző alveoláris szegmentumok és sejtek fluoreszcenciájának mértékét. Egyes vizsgálatokban AusJena Sedival (Jenoptik GmbH, Deutschland) invertált mikroszkópot használtunk 50x nagyítású plánakromatikus objektívvel (3).

Tüdőszövet mikroszkópos vizsgálata a fluoreszcens surfactant valamint antioxidáns enzimek eloszlásának megítélésére: (1, 2, 3, 5) Minden metszet egymástól lehetőleg távoli, valószínűségi alapon kiválasztott területeiről legalább 4 felvétel készült. Nagy érkepleteket vagy hörgőket tartalmazó területeket nem értékeltünk. Az alveoláris struktúrákat a differencia interferencia kontraszt mikroszkópos kép alapján manuálisan jelöltük ki, a területre eső pixelek fluoreszcencia intenzitását megmértük és területegységre eső átlagos intenzitást számoltunk. Hasonlóképpen minden képen mértük a háttérfluoreszcencia átlagos intenzitását is a metszetek olyan területén, mely nem tartalmazott tüdőszövetet. A fluoreszcencia intenzitás-különbségeket mesterséges színezéses technikával is megjelenítettük.

Surfactant izolálás: (Holm 1985, Notter 1985, Holm 1987) A sejtmentes bronchoalveoláris mosófolyadékot (1. előbb) tovább centrifugáltuk (12500xg, 45 min) a foszfolipidek ülepitése céljából, majd az üledéket fiziológias sóoldatban reszuszpendáltuk. A foszfolipidkoncentrációt kloroform - metanol extrakciót követően (Bligh 1959) a foszfátcsoportok mérésével adtuk meg (Chen 1956), a surfactant mennyiségét a benne lévő foszfolipid mennyiségével jellemeztük.

Áramlási-citometriai vizsgálat: (3, 5) Izolált sejtek szuszpenzióján EPICS-V (Coulter Electronics) ill. FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) áramlási citométerrel (argon lézer technika, ultraibolya excitációt is lehetővé

tevő kvarc optikával) végeztünk méréseket. A sejtek azonosítása az egyenes irányú fényszóródás alapján méret szerint, a mérőleges irányú fényszóródás alapján belső tagoltság szerint, a fluoreszcencia alapján autofluoreszcencia és különböző jelölések szerint történt. Az FITC és NBD fluoreszcencia excitációjára 488 nm hullámhosszú argon ion lézert, emissziójának detektálására 530 nm felett áteresztő barrier szűrőt használtunk. Minden mérés előtt kezeletlen alveoláris makrofágok autofluoreszcenciáját is megmértük és a különböző időpontokban történt méréseket erre kalibráltuk. A közepes fluoreszcencia intenzitásokat egyes kísérletekben 5×10^3 vagy 10^4 sejt (2). másokban 2×10^6 sejt (3) fluoreszcencia intenzitás hisztogramjából számoltuk (Hewlett-Packard számítógép rendszer BDIS Consort 30, version F program segítségével). Az autofluoreszcencia intenzitását meghaladóan fluoreszkáló sejtek arányát megadtuk az egyes sejtpopulációkban.

A klinikai vizsgálatokban részt vevő betegcsoportok és a gyógyszerek adagolása:

Nitrát klinikai vizsgálat: (7, 9, 12, 14, 15.) Tizenkettő, korábban gyógyszereket nem szedő, más jelentős betegségben nem szenvedő beteget vizsgáltunk (10 férfi, 2 nő), akiknél enyhe típusos stabil angina pectoris (CCS I-II) miatt elvégzett ergometria során legalább 0.1 mV horizontális vagy deszcendáló ST depresszió lépett fel. Naponta egy alkalommal, reggel 6 órákor monoterápiában 40 mg izoszorbid-5-mononitrátot (Olicard Retard, Solvay Pharma) kaptak. Vért 3 alkalommal vettünk: az iszkémiás szívbetegség diagnózisának felállítását követően gyógyszermentesen, majd egy hetes és két hetes nitrát hatásban, minden alkalommal reggel 8 órákor és éhgyomorral. A 2. és 3. vérvétel 2 órával a gyógyszerbevitel után történt. A betegektől minden alkalommal részletes anamnézist vettünk fel a panaszokra, az egyéb esetleges betegségekre, esetleges egyéb gyógyszeresedésre, bármi egyéb életkörülménybeli változásra valamint dohányzásra, fizikai aktivitásra vonatkozóan. A betegek anginás panaszai a megfigyelés időszaka alatt nem léptek fel (ennek provokálására vagy

attól való tartózkodásra utasítást nem kaptak), egyéb lényegi betegségük nem volt. Más gyógyszert a megfigyelési periódus alatt nem kaptak, azt követően kezdtük meg acetilsalicilsav-kezelésüket, a korábbi életmód megváltoztatását (rendszeres dinamikus testmozgás, dohányzás elhagyása, koleszterinszegény étrend, testsúlyrendezés).

Lovasztatín vizsgálat: (8, 9, 12, 14, 15) 7 beteget vizsgáltunk meg (átlagéletkor: 56.4 ± 7.3 év, 3 nő és 4 férfi), akik a hiperkoleszterinémian (átlagos szérumszint: 6.88 ± 0.38 mmol/l) kívül még legalább egy kiemelt rizikófaktort (dohányzás, hipertónia, igazolt ateroszklerózis) vagy két minor rizikófaktort (cukorbetegség, túlsúly, mozgáshiány, hipertrigliceridémia, kardiovaszkuláris szempontból pozitív családi anamnézis) rendelkeztek, és akiknél két hónapos koleszterinszegény diéta nem okozott jelentős javulást az éhgyomri koleszterinszintben. A betegek korábban lipidcsökkentő kezelést nem kaptak. Szokásos antihipertenzív és acetilsalicilsav kezelés megengedett volt, de ezt egy hónappal a vizsgálat megkezdése előtt stabilizáltuk, és a vizsgálatot megelőző időszakban valamint a vizsgálat 3 hónapja alatt nem változtattuk meg. A betegek napi 20 mg lovasztatint (Mevacor, MSD) vettek be az esti étkezést követően. Alap vérvétel történt a gyógyszerzedés megkezdése előtt, majd egy, két és három hónap múlva, mindegyik alkalommal reggel 8 órakor, éhgyomorral.

Lipidperoxidáció, glutation, antioxidáns enzimek mérése: (7, 8, 9, 12, 14, 15) Az eredményeket a mérési technikából következően vörösvérsejtek esetében a hemolizátum egységnyi térfogatára vonatkoztattuk, de a hematokritot, a vörösvérsejt számot, a vér hemoglobinn koncentrációját, a vörösvérsejtek térfogatát minden alkalommal ellenőriztük és azok nem változtak lényegesen az egyes személyek különböző időpontokban történt vérvételei során. A vérplazmában mért értékeket a plazma egységnyi térfogatára vonatkoztatva adtuk meg, de a plazma fibrinogén koncentrációt, a szérumszintet összefehérje koncentrációt minden alkalommal megmértük és az egyes betegek különböző

vérvételi időpontjai között ezekben a paraméterekben lényeges változást nem tapasztaltunk.

Szuperoxid dizmutáz aktivitás meghatározása tüdő homogenizátumban, alveoláris II. típusú tüdőhámsejtekben 7.8-as pH-n a xantin - xantin oxidáz rendszerben termelt szuperoxid gyök által okozott citokróm-c redukció gátlása alapján, spektrofotometriásan történt (McCord 1969) (Gilford Response UV/Vis spektrofotométer, Ciba Corning Diagnostics, Oberlin, OH, U.S.A.). A Cu,Zn SOD valamint a Mn SOD elkülönítése a Cu,Zn SOD 1 mM KCN-dal történő gátlása alapján volt lehetséges. Egy egység Cu,Zn SOD az az aktivitás, mely 50%-kal gátolja a xantin oxidáz mediálta maximális citokróm-c redukciót. Az enzimaktivitást fehérjemennyiségre vonatkoztatva adtuk meg (1. 2). A vérből történt méréseknél az adrenalin autooxidációján alapuló módszert használtuk (Misra 1972).

A fehérjemeghatározás általában Bradford módszerével történt (Bradford 1976), a tüdőből visszanyert fehérjék géلكromatográfiás analízise során a fehérjekoncentrációt az aromás aminosavak oldalláncai által okozott ultraibolya fényelnyelés alapján becsültük (280 nm hullámhosszon) (Gilford Response UV/Vis spektrofotométer, Ciba Corning Diagnostics, Oberlin, OH, U.S.A.). Ebben a hullámhossz tartományban a mért rendszerben lévő fluoreszcens festék (FITC) abszorpciója nem volt jelentős.

A kataláz aktivitás meghatározása tüdőszövetben és II. típusú tüdőhámsejtekben spektrofotometriásan, a hidrogénperoxid koncentrációjának csökkenéséből (fotometrálas 240 nm-en) történt (Beers 1952, Luck 1963, Cohen 1970). A mintákat a mérés előtt 0.17 M etanollal és 1 mM CHAPS-szal (Sigma) kezeltük (Cohen 1970) az inaktív CAT-H₂O₂ komplexek elbontására. Egy egység kataláz 1 μmol hidrogénperoxidot bont le percenként 25 °C-on, 7.0-es pH-n. Az enzimaktivitásokat a szöveti méréseknél egységnyi tömegű fehérjére vonatkoztatva adtuk meg, a szérumból ill. plazmából történt

méréseknél pedig egységnyi térfogatra vonatkoztatva (a fehérjekoncentráció folyamatos kontrollja mellett).

A glutacion peroxidáz aktivitást Matkovics módszere alapján (Chiu 1976, Matkovics 1988),

a redukált és oxidált glutation meghatározását a módosított Tietze módszerrel (Sedlak 1968, Tietze 1969, Matkovics 1988) végeztük.

A malondialdehid koncentrációjával jellemeztük a lipid peroxidációt és a tiobarbitursavval való reakciójának 532 nm-en való fotometráálásával mértük (Placer 1966, Ohkawa 1979, Matkovics 1988).

Neutrofil granulocita izolálás: (14, 15) Diszkontinuus (ficoll) sűrűséggrádiens centrifugálás módszerével történt nátrium citráttal alvadágátolt vérből.

Neutrofil granulociták stimulált szuperoxid anion képzésének mérése: (7, 8, 9, 12, 14, 15) A sejteket forbol-észter (forbol mirisztát acetát) alkalmazásával aktiváltuk és citokróm-c redukciójának követésével mértük a keletkező szuperoxid anion koncentrációját (Guarnieri 1990).

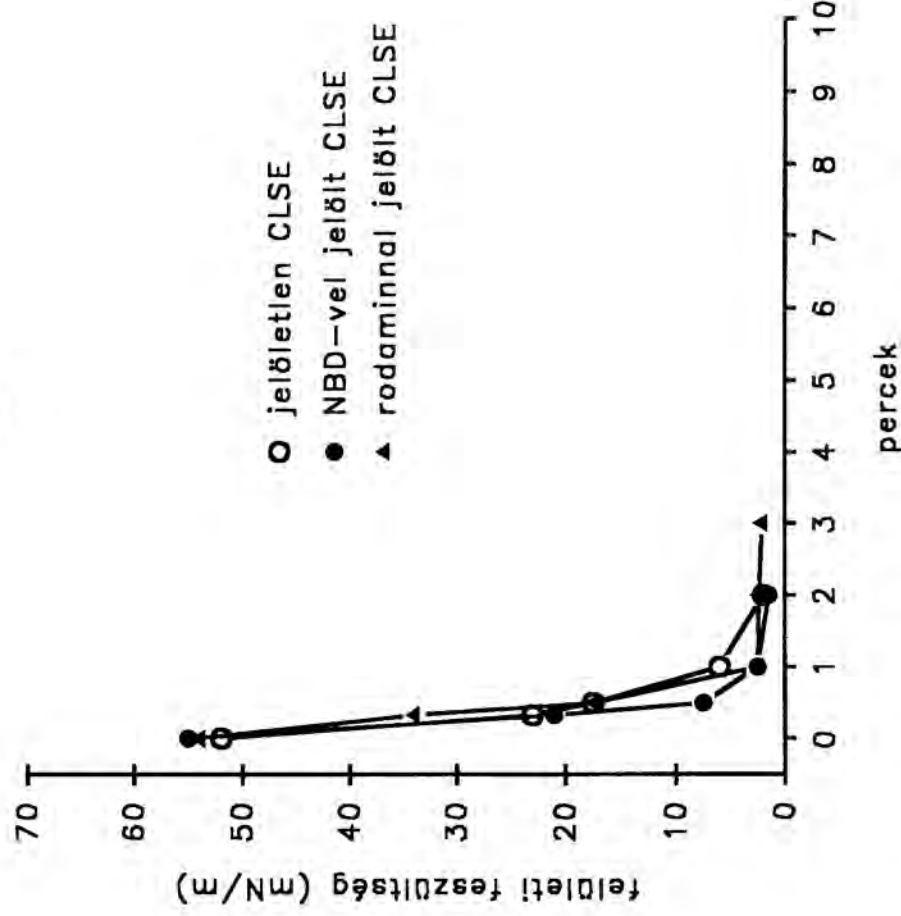
Statisztikai analízis: Az eredményeket (ahol máshogy nem jelöltük) középérték \pm középérték középhibája (S.E.M.) formában adtuk meg. A szignifikáns különbségeket egy- ill. kétmintás t- próbával, valamint variancia analízissel és a Bonferroni által módosított t- próbával elemeztük. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket $p < 0.05$ esetén.

2.3 Eredmények és megbeszélés

2.3.1 Pulmonális oxigén toxicitás kivédésének lehetősége intratracheális surfactant készítmények adásával

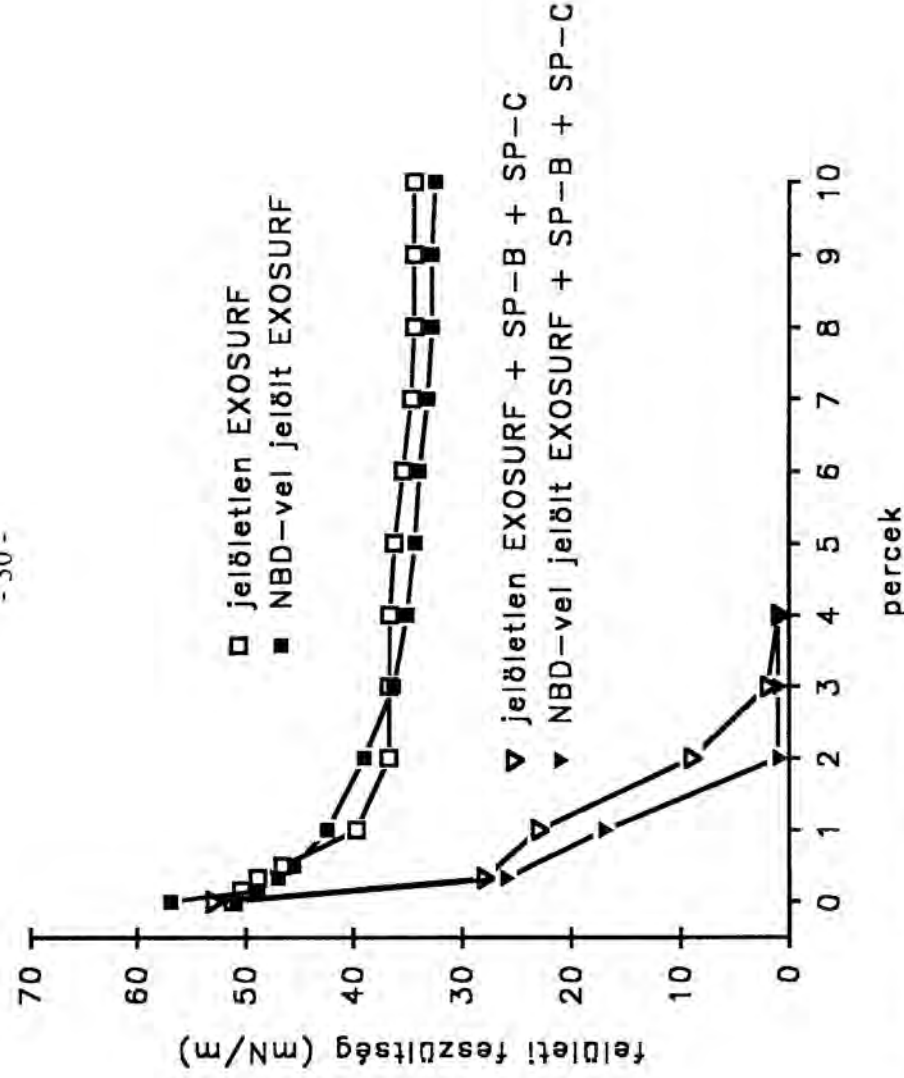
Fluoreszcensen jelölt surfactant készítmények (CLSE és EXOSURF) használatával (lásd részletesen a módszereknél) vizsgáltuk a mikroszkópikus, intraalveoláris eloszlást a kísérleti állatok tüdejében. Nemcsak a terápiás hatásosságot, de a bejuttatás eredményességét is befolyásolja az egyes surfactant készítmények felületi feszültsége.

Pulzáló buborék elven működő felületi feszültség mérővel (lásd részletesen a módszereknél) vizsgáltuk fluoreszcensen jelölt lipidekkel összekevert surfactant készítmények felületi feszültségének viselkedését. A jelölt és jelöletlen CLSE (5 mg/ml) 2 percen belül 2 mN/m alatti minimális felületi feszültséget ért el dinamikus kompresszió során (1. ábra), az EXOSURF azonos koncentrációja jelölt és jelöletlen formában egyaránt 30 mN/m-es érték feletti minimális felületi feszültséget produkált 10 perces oszcillálást követően is 20-30/min pulzációs frekvencia mellett (2. ábra). Fizikai tulajdonságok szempontjából tehát nem különböztek lényegesen a fluoreszcensen jelölt és a jelöletlen surfactant készítmények. B és C típusú surfactant apoproteinek hozzáadása hatására az EXOSURF is elérte 3 perc alatt a 2 mN/m alatti minimális felületi feszültséget jelölt és jelöletlen formában egyaránt (2. ábra) (4, 5). Ez egyrészt aláhúzza a surfactant lipiddékony apoproteinjeinek jelentőségét a surfactant fizikai felületaktív tulajdonságának kialakításában, másrészt bizonyítja, hogy a lényegesen nagyobb méretű és polaritásában, oldékonysági tulajdonságaiban is eltérő fluoreszcens lipid az alkalmazott koncentrációkban nem rontja a surfactant alapvető fizikai tulajdonságait valamint nagy valószínűséggel nem befolyásolja hátrányosan a levegő-folyadék határfelületen történő terjedését.



1. ábra. Jelöletlen és NBD-vel valamint rodaminnal fluoreszcensen jelölt surfactant készítmények (INFASURF = CLSE) minimális felületi feszültsége dinamikus kompresszió során. Felületi viselkedés szempontjából nem különböztek lényegesen a fluoreszcensen jelölt és a jelöletlen surfactant készítmények. A CLSE elérte 2 perc alatt a megközelítően 2 mN/m minimális felületi feszültséget jelölt és jelöletlen formában egyaránt. Az NBD-vel jelölt CLSE esetében a fluoreszcens és nem fluoreszcens lipidek aránya 1:500, a rodaminnal jelölt CLSE esetében 1:780 volt. Lipidkoncentráció: 5 g/l (= 6.875 mM). 50%-os felületkompresszió történt percenként 20 alkalommal (hőmérséklet: 37 °C, relatív páratartalom: 100%). Az ábrázolt felületi feszültségértékek a minimális felület elérésekor mért értékeknek felelnek meg. A grafikon egyes pontjai egyes reprezentatív mérési eredményeket jelölnek. A jelöletlen és jelölt surfactant készítmények felületi feszültsége nem különbözött szignifikánsan egymástól (átlagértékek \pm S. E. M., mértékegység: mN/m):

	kezdet	1 perc	2 perc	3 perc
jelöletlen CLSE (n = 6)	53.3 \pm 2.8	5.7 \pm 2.4	2.0 \pm 0.4	
NBD-CLSE (n = 5)	55.0 \pm 3.3	2.5 \pm 1.0	1.5 \pm 0.3	
rodamin-CLSE (n = 3)	54.4 \pm 3.6	2.5 \pm 1.0	2.4 \pm 1.2	2.1 \pm 0.8



2. ábra. Jelöltlen és NBD-vel fluoreszcensen jelölt valamint a lipidoldékony surfactant apopteinekkel (SP-B, SP-C) kiegészített surfactant készítmények minimális felületi feszültsége dinamikus kompresszió során. Felületi viselkedés szemponyjából nem különböztek lényegesen a fluoreszcensen jelölt és a jelöltlen surfactant készítmények. B és C típusú surfactant apopteinek hozzáadása hatására az EXOSURF is elérte 3 perc alatt a 2 mN/m alatti minimális felületi feszültséget jelölt és jelöltlen formában egyaránt. Az NBD-vel jelölt EXOSURF esetében a fluoreszcens és nem fluoreszcens lipidek aránya 1:500 volt. Lipidkoncentráció: 5 g/l (\approx 6.875 mM). 50%-os felületkompresszió történt percenként 20 alkalommal (hőmérséklet: 37 °C, relatív páratartalom: 100%). Az ábrázolt felületi feszültség értékek a minimális felület elérésekor mért értékeknek felelnek meg. A grafikon egyes pontjai egyes reprezentatív mérési eredményeket jelölnek. A jelöltlen és jelölt surfactant készítmények felületi feszültsége nem különbözött szignifikánsan egymástól (átlagértékek \pm S. E. M., mértékegység: mN/m):

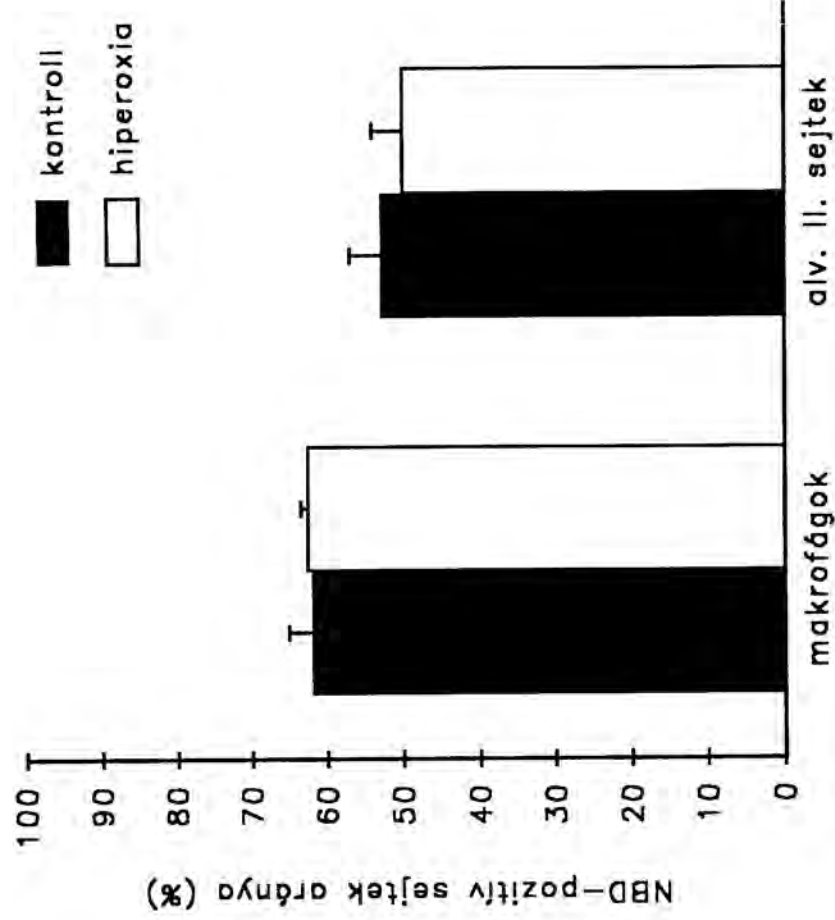
	kezdet	1 perc	2 perc	3 perc	4 perc
jelöltlen EXOSURF (n = 5)	55.3 \pm 3.2	39.7 \pm 1.4	36.7 \pm 2.0	36.7 \pm 1.1	36.7 \pm 1.3
NBD-EXOSURF (n = 5)	56.2 \pm 4.1	42.4 \pm 1.0	39.1 \pm 1.7	36.3 \pm 1.2	35.1 \pm 1.0
jelöltlen EXOSURF + SP-B + SP-C (n = 3)	52.2 \pm 3.5	23.3 \pm 3.0	9.0 \pm 5.1	2.0 \pm 0.6	1.1 \pm 0.4
NBD-EXOSURF + SP-B + SP-C (n = 3)	51.2 \pm 3.5	17.7 \pm 2.5	1.1 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4

További vizsgálatokban altatás során, tracheosztómian keresztül, oldat formájában történő beadás módszerét tanulmányoztuk egészséges és hiperoxia által károsított tüdejű nyulakban. A beadás a teljes tüdőkapacitás 10%-át nem meghaladó folyadékmennyiségben, hossz tengelye körül forgó műtőasztalon történt az eloszlás hatásfokának javítása céljából (lásd részletesen a módszereknél).

A fluoreszcensen jelölt surfactant készítmények bejuttatásának hatásosságát vizsgáltam a beadás után 2, 4 és 24 órával frissen izolált II. típusú tüdőhámsejtek áramlási-citometriás analízisével és videó-mikroszkópiával (lásd részletesen a módszereknél). Kvantitatív fluoreszcens mikroszkópiával a beadott surfactant jelenlétének megfelelő fluoreszcencia kimutatható volt a bronchusokban és az alveolusokban. Jelentős változékonyságot tapasztaltunk azonban a fluoreszcencia intenzitásában a szomszédos alveolusok között valamint egyetlen alveolus különböző felszínei között (3. a. és b. ábra). Áramlási-citometriás analízis jelentős változékonyságot mutatott beadást követően 2, 4 valamint 24 óra múlva frissen izolált II. típusú pulmonális epitél sejtek fluoreszcencia intenzitásában. Az autofluoreszcenciát meghaladóan fluoreszkáló alveoláris makrofágok aránya 2 órával a beadást követően 63% volt EXOSURF esetében. Az autofluoreszcenciát meghaladó mértékben fluoreszkáló II. típusú tüdőhámsejtek aránya 56% volt. A hyperoxianak kitért nyulak tüdejében nem volt lényegesen kevesebb a fluoreszkáló makrofágok aránya, a bejuttatott, jelölt surfactant-et felvevő tüdőhámsejtek aránya sem változott (3. c. ábra). Ezekből a jelenségekből az oldat formájában intratracheálisan beadott surfactant készítmények egyetlen alveoláris eloszlására következtettünk, mind normális levegőn tartott, mind hiperoxiának kitért állatokban (3, 5).



3. a. és b. ábra. Egészséges nyúlban, tracheosztómian keresztül, oldalt formájában beadott, fluoreszcensen jelölt (NBD-C12-PC) surfactant (EXOSURF) intraalveoláris eloszlásának jellemző mikroszkópos képe. A bal oldali képeken a fagyasztott tőmetszet differencia interferencia kontraszt mikroszkópos képe látható, jobb oldaliakon pedig ugyanazon tődőterület epifluoreszcens mikroszkópos képe (485 ± 20 nm excitációs szűrő és 520-560 nm emissziós szűrő használatával) a háttérfluoreszcencia levonását követően. Az alveolus egyes területei az autofluoreszcencia mértékének megfelelően fluoreszkálnak, más területek pedig ezt lényegesen (legalább két nagyságrenddel) meghaladó fluoreszcencia intenzitást mutatnak.

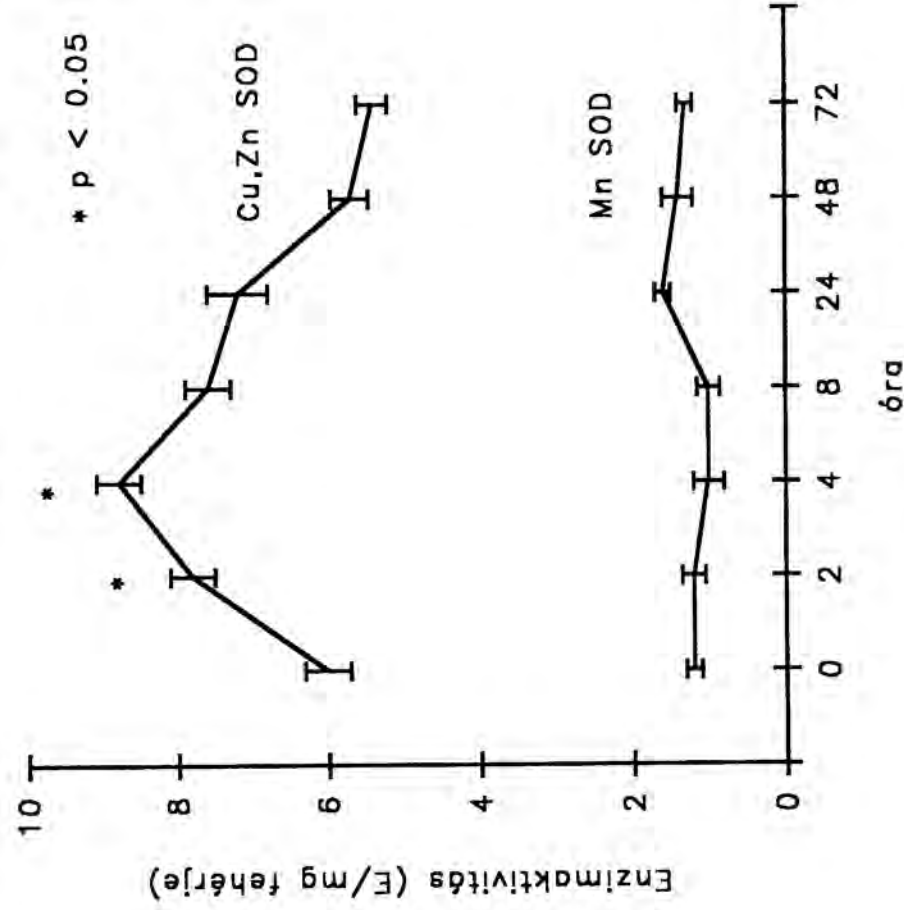


3. c. ábra. Áramlási citometria során az autofluoreszcenciát meghaladóan fluoreszkáló izolált alveoláris sejtek százalékos aránya a normális levegőn tartott valamint a hiperoxiának kitett nyulak csoportjában. Az első két oszlop az NBD-vel jelölt EXOSURF intratracheális beadását követően 2 órával izolált alveoláris makrofágokat, a második két oszlop az ugyanebben az időpontban izolált alveoláris II. típusú tüdőhámsejteket jeleníti meg. A grafikon oszlopai legalább 3 különböző kísérleti állatból származó 10^5 - 10^5 sejt vizsgálatának eredményeit (átlag \pm S. E. M.) jelentik. Az alveoláris makrofágok és alveoláris II. típusú tüdőhámsejtek fele tartalmazta a bejuttatott, fluoreszcensen jelölt surfactant-et. Nem volt szignifikáns különbség sem a hiperoxiás valamint a normális levegőn tartott csoport között, sem pedig a kétféle alveoláris sejttípus között.

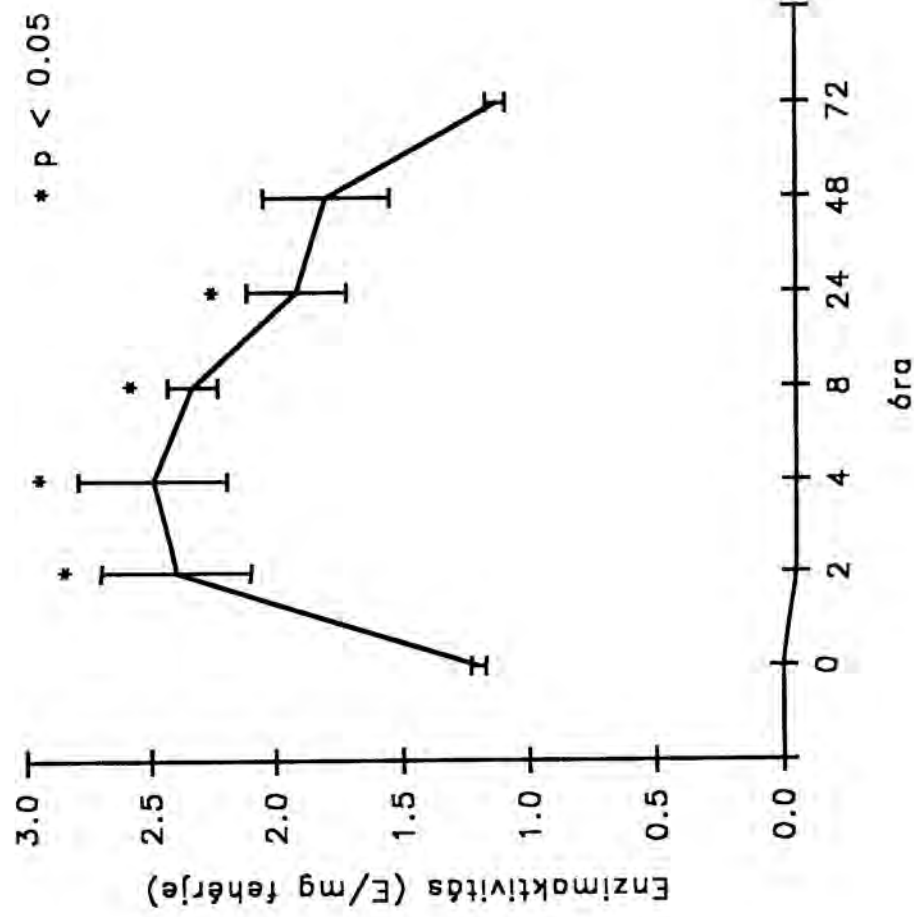
2.3.2 Pulmonális oxigén toxicitás kivédésének lehetősége intratracheálisan adott, liposzómához asszociált antioxidáns enzimekkel

A liposzómákhoz asszociált bejuttatási mód effektivitását valamint a terápiás hatás mechanizmusát kívántuk megvizsgálni celluláris valamint alveoláris szinten. Dipalmitoil foszfatidilkolinból, koleszterinből és sztearilaminból álló sokrétegű, kationos liposzómákat állítottunk elő, melyekhez 5 mg 2800 E/mg fehérje aktivitású borjú Cu,Zn szuperoxid dizmutáz és 5 mg 5000 E/mg fehérje aktivitású borjúmáj kataláz kötöttünk (lásd részletesen a módszereknél). Az eloszlás vizsgálatára a Cu,Zn szuperoxid dizmutáz 10%-ához fluoreszcein-izotiocianátot (FITC), a kataláz 10%-ához tetrametilrodamin-5-(és 6)-izotiocianátot (TRITC) kötöttünk kovalensen (lásd részletesen a módszereknél). Az intratracheálisan történő beadást (lásd részletesen a módszereknél) követően 2, 4, 8, 24, 48 vagy 72 órával az állatokat megöltük és részben szövethomogenizátumot állítottunk elő biokémiai analízis céljából, részben pedig II. típusú tüdőhámsejteket izoláltunk valamint fagyasztott metszeteket készítettünk. Radioaktív izotóppal végzett korábbi vizsgálatok alapján tracheába történt injekciót követően a tüdőszövetbe jutott liposzómák mennyisége tömegegységre vonatkoztatva nem különbözik a tüdőlebenyek között (1, 2). A tüdőlebenyek között nem találtunk lényeges különbséget a fehérjemennyiségre vonatkoztatott enzimaktivitásokban. A tüdőszövet szuperoxid dizmutáz enzim aktivitása legnagyobb volt a beadást követően 4 órával, majd csökkent, és újabb 4 óra múlva a kiindulási érték közelébe tért vissza. A Mn-SOD aktivitás az elvárásnak megfelelően nem változott (4. ábra). A tüdőszövet kataláz aktivitása még 24 óra múlva is szignifikánsan meghaladta a kiindulási értéket (5. ábra). Az egyes tüdőrészekben meghatározott enzimaktivitásértékek ugyanezt a kinetikát követték. A fagyasztott metszetek kvantitatív fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata során emelkedett fluoreszcencia intenzitásokat regisztráltunk az

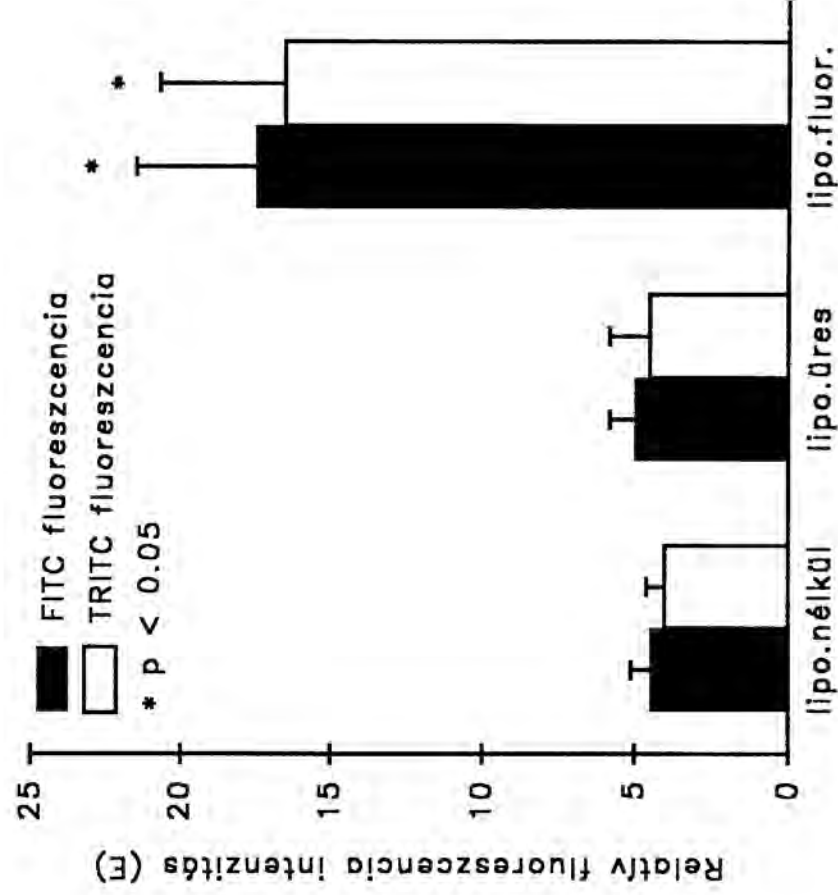
alveolusokban az autofluoreszcenciához képest, de a fluoreszcencia eloszlása alveoláris szinten egyenetlen volt egy alveoluson belül is valamint a szomszédos alveolusok között. Az üres liposzómmákkal kezelt tüdőrészek fluoreszcenciája megegyezett a kezeltetlen tüdő autofluoreszcenciájával (6. ábra) (1, 2). A fluoreszcencia nemcsak a sejtek kontúrára, hanem a sejtek belsőjére is lokalizálódott. Ezt a sejtfelszín fluoreszcens jelölésével valamint lézer konfokális mikroszkópiával is megerősítették (1). A II. típusú tüdőhámsejtek SOD aktivitása a szövetekhez hasonlóan növekvő tendenciájú volt, de szignifikáns fokozódást nem figyeltünk meg (Cu,Zn SOD: 10.5 E/mg fehérje a kontroll 5.5 E/mg fehérje értékéhez képest) (7. ábra). A Mn szuperoxid dizmutáz aktivitás nem változott. A II. típusú tüdőhámsejtek kataláz aktivitása a kontrollhoz képest jelentősen magasabb volt 4 órával a beadást követően (CAT: 6.7 E/mg fehérje a kontroll 5 E/mg fehérje értékéhez képest). 24 óra múlva a kataláz aktivitás még mindig szignifikánsan emelkedett volt (7. ábra). Abban, hogy az intratracheális injekciót követően izolált alveoláris II. típusú tüdőhámsejtek SOD aktivitása összességében nem nőtt szignifikánsan, részben az egyenetlen eloszlás, részben pedig az alveoláris makrofágokba történő felvétel játszhatott szerepet (8. ábra).



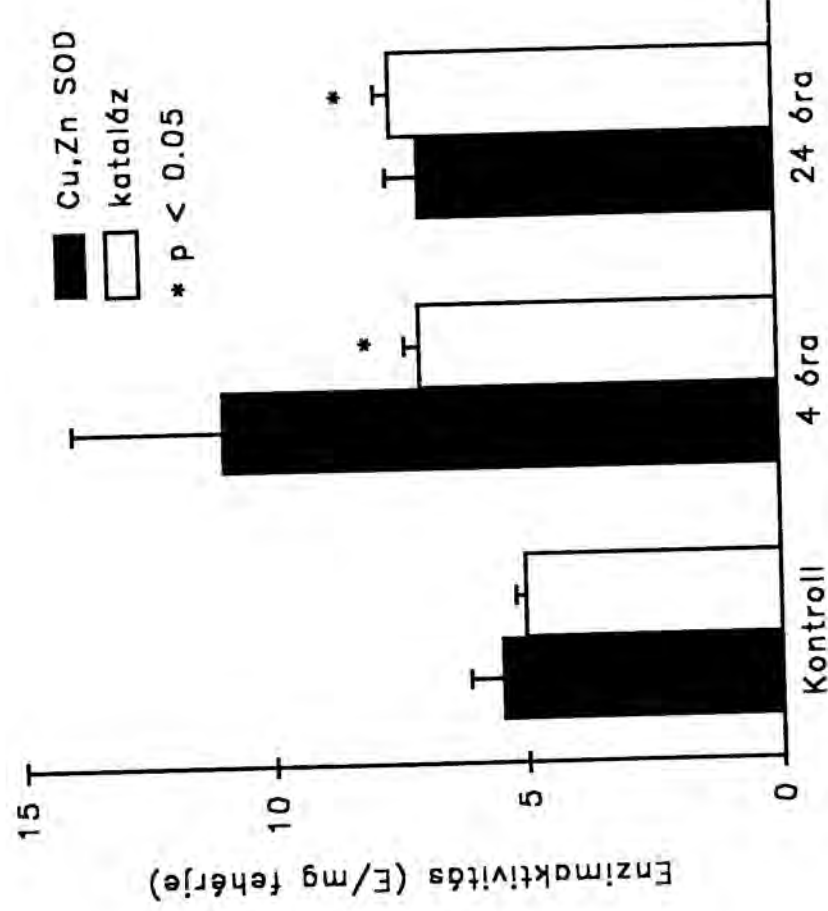
4. ábra. Nyúl tudoszövet fehérjekoncentrációra vonatkoztatott szuperoxid dizmutazaktivitasa fluorezcenszen (FITC) jelölt, liposzómákhoz kötött Cu,Zn szuperoxid dizmutáz enzim beadását követően. A Cu,Zn SOD aktivitás a beadását követően 2 ill. 4 órával szignifikánsan ($p < 0.05$) meghaladja a kiindulasi szintet, a maximális értéket a beadását követően 4 órával érte el. A beadását követően 8 órával már nem mutatható ki statisztikailag szignifikáns kulonboseg a kiindulasi érték és a kezelt tüdőben mérhető érték között. Az endogén Mn SOD aktivitás változatlan maradt. Az ábrán a csillaggal jelölt Cu,Zn SOD aktivitás átlagok szignifikánsan ($p < 0.05$) különböznek a kiindulasi aktivitástól valamint a 48 és 72 óra múlva mért átlagoktól. A kiindulasi értékűek és a 8, 24, 48, 72 óra múlva mért átlagok között nem volt szignifikáns kulonboseg, ugyanígy a Mn SOD aktivitás ingadozása sem volt szignifikáns. A grafikon pontjai legalább 5 különböző állat vizsgálata során elvégzett mérések eredményét (átlag \pm S. E. M.) jelentik.



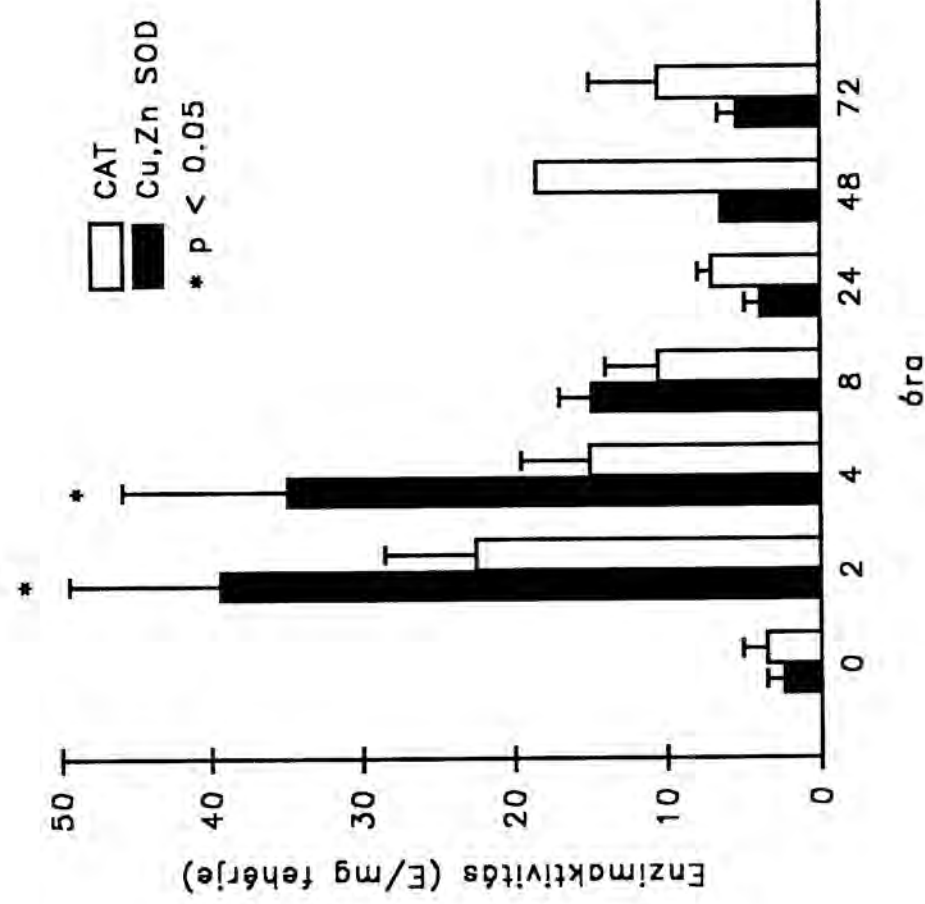
5. ábra. Nyul tudoszövet feherjekoncentraciora vonatkoztatott kataláz aktivitása fluoreszcensen (TRITC) jelölt, liposzómákhoz kott kataláz enzim beadását követően. A kataláz aktivitás a beadást követően 24 oran keresztlül szignifikánsan ($p < 0.05$) meghaladja a kiindulási (endogén) kataláz aktivitást. A maximális értéket a beadást követően 4 órával mértük. A beadást követően 48 órával már nem mutatható ki statisztikailag szignifikáns klonbseg a kiindulási érték és a kezelt tüdőben mérhető érték között. A kiindulási érték és a beadást követően 72 óra múlva mért érték között nem volt szignifikáns klonbseg. A grafikon pontjai legalább 5 klonbzo állat vizsgálata során elvégzett mérések eredményét (átlag \pm S. E. M.) jelentik.



6. ábra. Nyúl tüdő alveoláris struktúráinak fluoreszcenciája 4 órával a liposzómákhoz kötött, fluoreszcensen jelölt antioxidáns enzimek (FITC-vel jelölt SOD és TRITC-vel jelölt CAT) intratracheális beadása után (harmadik oszloppáros). Az első két oszlop („lipo. nélkül”) a natív tüdő autofluoreszcenciájának intenzitását, a második két oszlop („lipo. üres”) az üres liposzómákkal kezelt tüdő alveolusainak fluoreszcenciáját, a harmadik oszloppáros („lipo. fluor.”) a jelölt enzimeket tartalmazó liposzómákkal kezelt tüdő alveoláris fluoreszcenciáját mutatja. A fluoreszcens enzimek intratracheális beadását követően 4 órával az alveoláris struktúrák szignifikánsan ($p < 0.05$) erősebben fluoreszkálnak, mint a kezeletlen valamint az üres liposzómákkal kezelt tüdők alveolusai. A liposzómák beadása nem változtatja meg a tüdőalveolusok autofluoreszcenciáját. Ezt mutatja, hogy a kezeletlen és az üres liposzómákkal kezelt tüdő alveoláris struktúráinak fluoreszcenciája nem különbözött. A grafikon oszlopai 2 állat azonos tüdőlebensnyíl vett szövetblokkjának vizsgálata során (nem egymás melletti 5-5 tüdőmetszet egyenként 4-4 véletlenszerűen kiválasztott látóterének összes alveoláris struktúráján) elvégzett mérések eredményét (átlag \pm S. E. M.) jelentik.

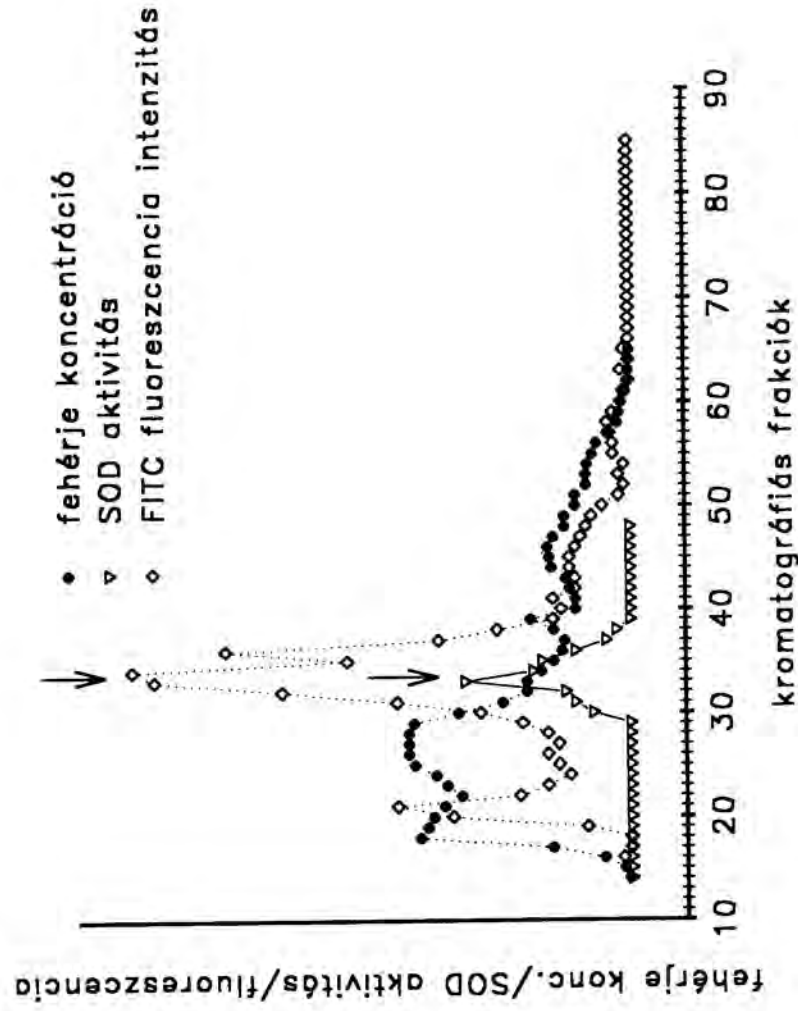


7. ábra. Nyúl tüdő frissen izolált alveoláris II. típusú tüdőhámsejteknek fehérjekoncentrációra vonatkoztatott szuperoxid dizmutáz és kataláz aktivitása a fluoreszcensen (FITC és TRITC) jelölt, liposzómához kötött antioxidáns enzimek (Cu,Zn SOD és CAT) intratracheális beadását követően 4 valamint 24 órával. A Cu,Zn SOD aktivitás összességében nem változott meg szignifikánsan, ami a tüdőszövetben mért aktivitásnövekedéssel és az alveoláris struktúrák fluoreszcens mikroszkópos képeivel összehasonlítva a bejuttatott anyag egyenetlen inter- és intraalveoláris eloszlásának következménye lehet, valamint annak, hogy az alveoláris egyéb struktúrák (makrofágok, esetleg I. típusú tüdőhámsejtek) nagyobb mennyiséget vesznek fel. A kataláz aktivitás kismértékben, a tüdőszövet egészéhez képest lényegesen kevésbé, de a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan ($p < 0.05$) növekedett mind 4 órával, mind 24 órával a beadást követően. A grafikon oszlopai legalább 5 különböző állapot vizsgálata során elvégzett mérések eredményét (átlag \pm S. E. M.) jelentik.



8. ábra. Nyúl tüdőből frissen izolált alveoláris makrofágok fehérjekoncentrációra vonatkoztatott szuperoxid dizmutáz és kataláz aktivitása a fluoreszcensen (FITC és TRITC) jelölt, liposzómákhoz kötött antioxidáns enzimek (Cu,Zn SOD és CAT) intratracheális beadását követően 2, 4, 8, 24, 48 valamint 72 órával. A szuperoxid dizmutáz aktivitás szignifikánsan ($p < 0.05$) emelkedett volt a beadást követően 2 valamint 4 óra múlva izolált sejtekben. A makrofágokban tapasztalt jelentős mértékű aktivitás növekedés valamint az alveoláris II. típusú tüdőhámsejtekben hiányzó szignifikáns aktivitás növekedés alapján feltételezhető, hogy a makrofágok akumulálják a bejuttatott szuperoxid dizmutázt. A kataláz aktivitás növekvő tendenciája a makrofágokban nem ért el szignifikáns szintet. A grafikon oszlopai legalább 3 különböző állat vizsgálatára során elvégzett mérések eredményét (átlag \pm S. E. M.) jelentik, az egyik csoportban (48 óra) csak 2 érték volt, ebben az esetben csak az átlagot adtam meg.

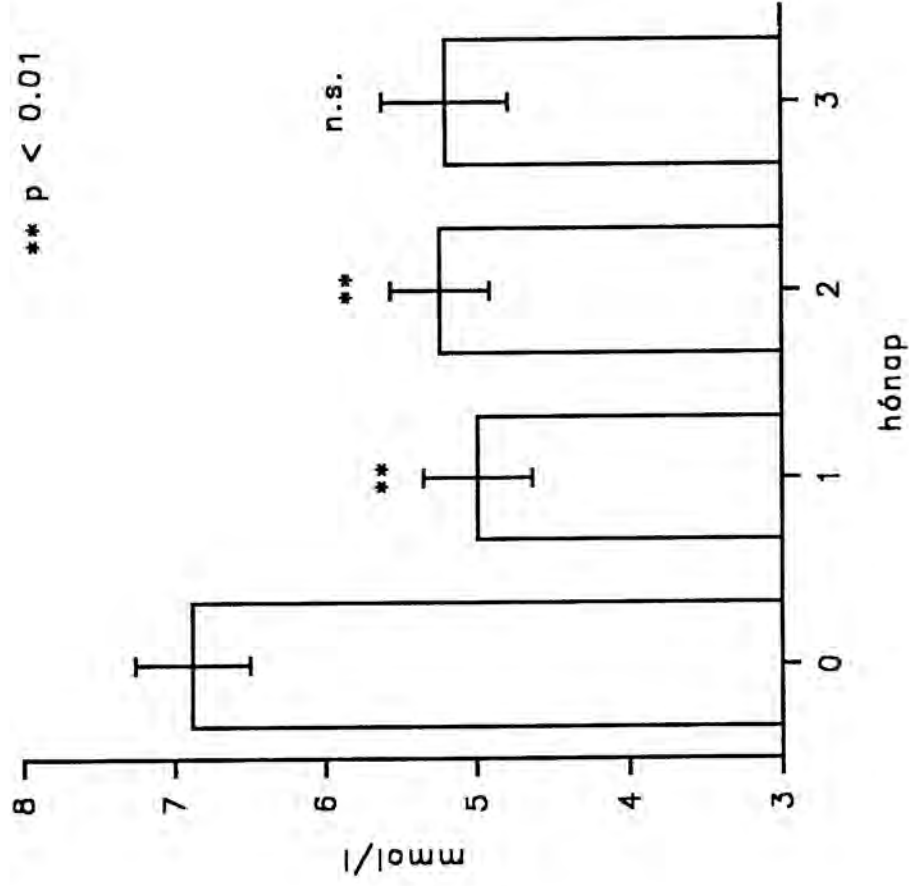
A bejuttatás és a fluoreszcens jelölés hatásosságát kívántam vizsgálni a szövetekből 4 óra múlva visszanyert fehérjék gélkromatográfiás analizisével. 4 órával a beadást követően a szövetekből izolált FITC fluoreszcenciával rendelkező fehérjefrakció azonos volt a Cu,Zn SOD aktivitást mutató frakcióval (9. ábra). A kromatográfia során talált másik fluoreszkáló fehérjefrakció minden bizonnyal megfelel a tüdőben található autofluoreszkáló fehérjé(k)nek, mivel kívülről bevitt fluoreszcens anyaggal nem kezelt tüdőben is megtalálható ez a fluoreszcencia. A tüdőszövet ultrafiltrátuma nem tartalmazott jelentős fluoreszcenciát. A jelöletlen szuperoxid dizmutáz nem rendelkezik jelentős autofluoreszcenciával. Ebből arra következtettem, hogy a fluoreszcens festék és az enzim legnagyobb része stabil kötésben marad órákkal a beadást követően a tüdőben.



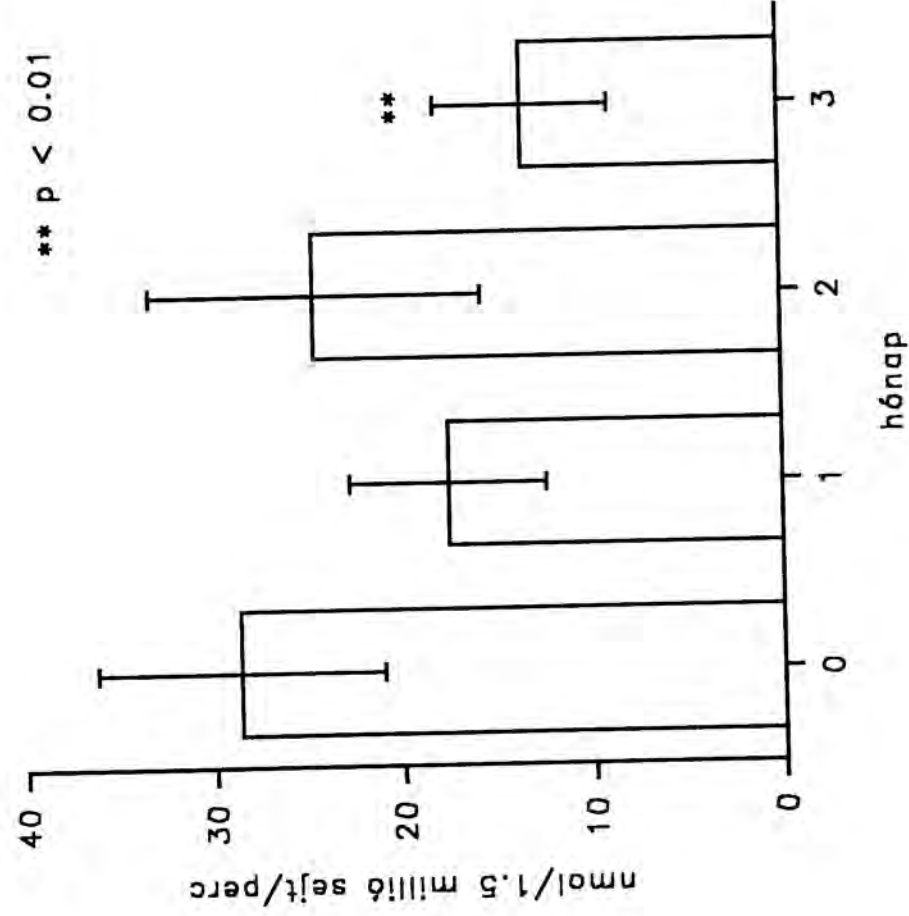
9. ábra. Nyúl tüdőszövet gélkromatográfia során szétválasztott vízóldékony fehérjefrakcióinak elemzése ultraibolya fényelnyelésből (280 nm hullámhossz) becsült fehérjekoncentráció, szuperoxid dizmutáz aktivitás és FITC fluoreszcencia intenzitás alapján. A tüdő feldolgozása 4 órával a fluoreszcensen jelölt, liposzómákhoz kötött szuperoxid dizmutáz intratracheális beadását követően történt. A szuperoxid dizmutáz aktivitást mutató frakciók rendelkeztek egyben a legerősebb FITC fluoreszcenciával is (nyílakkal jelölt csúcsok). Ez alapján feltételezhető, hogy a tracheán keresztül, liposzómák segítségével a tüdőbe juttatott, fluoreszcensen jelölt SOD órákkal a bejuttatást követően is a fluoreszcens festékkel kötésben marad. Ez teszi lehetővé a fluoreszcens mikroszkópia valamint az izolált sejteken végzett áramlási citometria használatát a bejuttatott enzim tüdőbeli eloszlásának vizsgálatára.

2.3.3 Farmakológiai hatások befolyása az oxigén szabad gyök mediálta folyamatokra iszkémiás szívbetegekben (klinikai vizsgálatok):

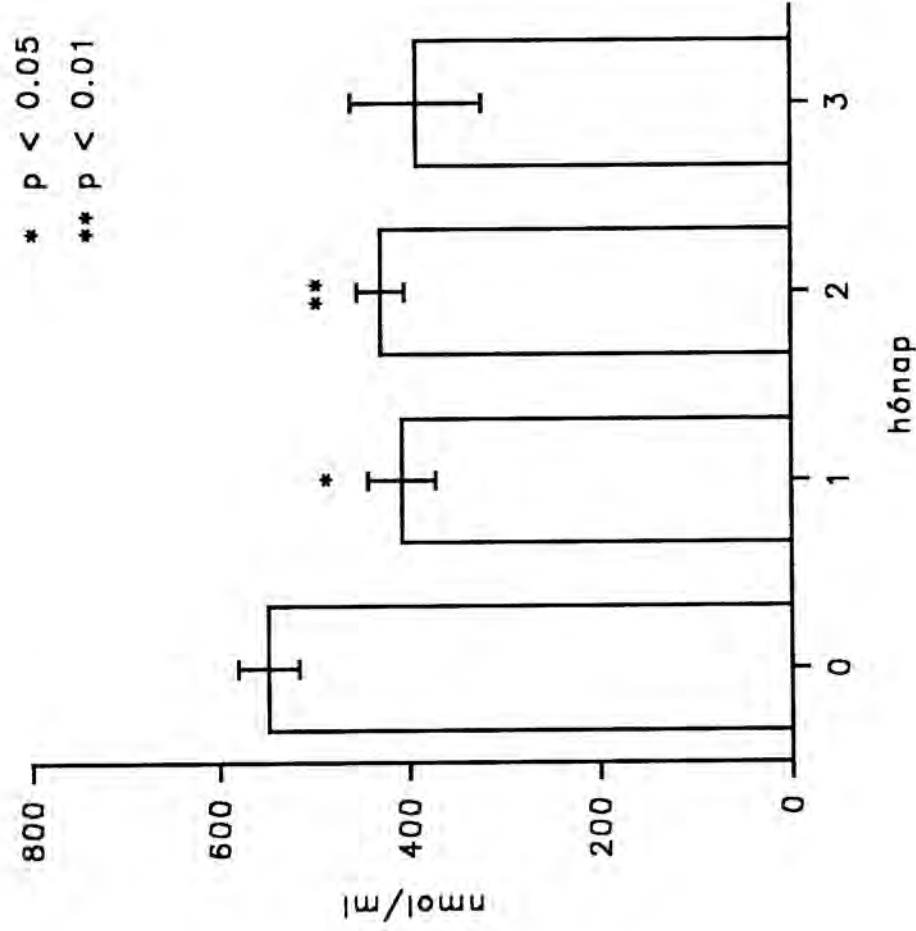
2.3.3.1 Per os lovasztatin kezelés tartós hatását vizsgáltam meg a szabad gyökös reakciókra iszkémiás szívbetegekben (8, 9, 14, 15). Napi 20 mg lovasztatin (Mevacor, MSD) 3 hónapos kezelés során jelentősen mérsékelte az összkoleszterinszintet (10. ábra), csökkentette a kiindulási emelkedett szuperoxid anion termelést a neutrofil granulocitákban kb. 50%-kal (28 ± 8 -ról 13 ± 5 nmol/1.5 millió sejt/perc, $p < 0.01$) (11. ábra), a magas malondialdehid szint a normális szintre csökkent a vörösvérsejtekben (550 ± 30 -ról 430 ± 25 nmol/ml hemolizátumra, $p < 0.05$) (12. ábra). A vörösvérsejt SOD aktivitás kisfokban növekvő tendenciájú volt (nem szignifikáns) (13. ábra), kataláz aktivitásuk nem változott (14. ábra). A glutation peroxidáz aktivitása szignifikáns módon megemelkedett (13.92 ± 0.57 -ről 17.36 ± 1.44 U/ml-re, $p < 0.05$) (15. ábra). A vörösvérsejtek redukált glutation tartalma átmenetileg növekedett (16. ábra), aminek háttérében az összglutation mennyiség növekedése állhat, mert az oxidált glutation mennyisége lényegesen nem változott. A plazma redukált glutation mennyisége szintén emelkedett (17. ábra).



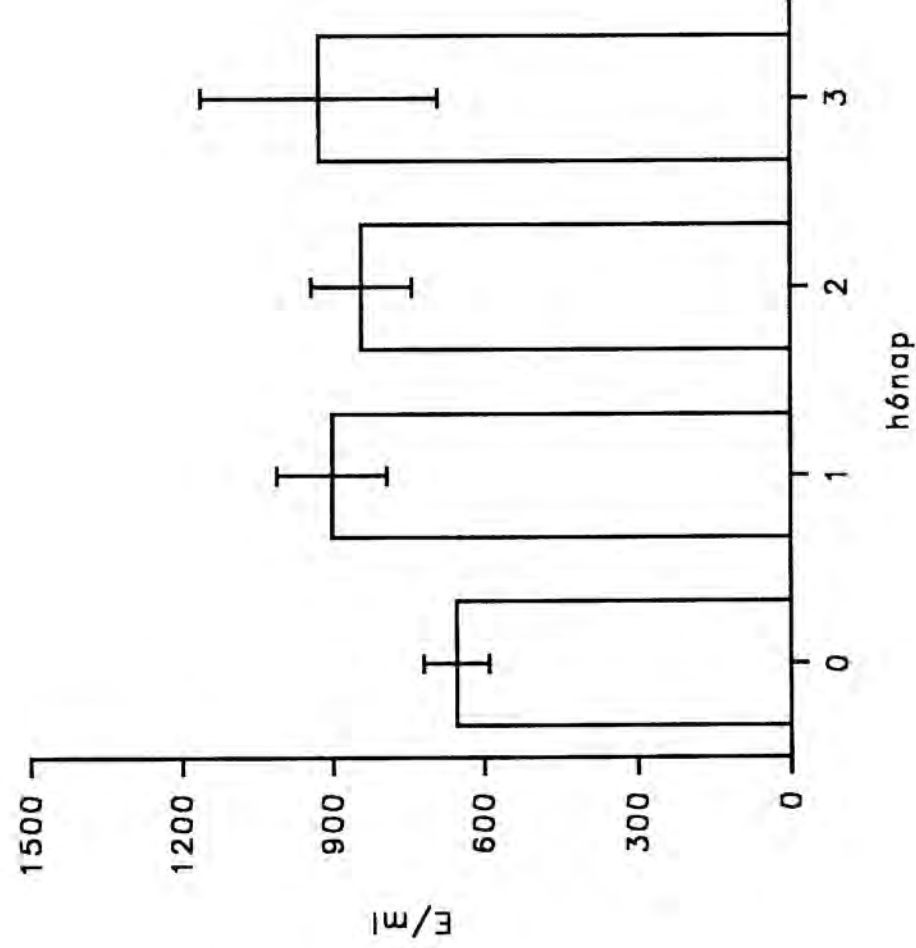
10. ábra. A szérum összkoleszterin szint változása hiperkoleszterinemiás betegekben a 3 hónapos lovastatin kezelés (napi 20 mg) során. A koleszterinszint a kezdeti 7 mmol/l körüli értékről egy hónapon belül 5 mmol/l-re csökkent ($p < 0.01$), és ezen a szinten stabilizálódott. A grafikon oszlopai 7 beteg vizsgálata során elvégzett mérések eredményét (átlag \pm S. E. M.) jelentik. Az utolsó oszlopban csak 4 mérés eredménye szerepel.



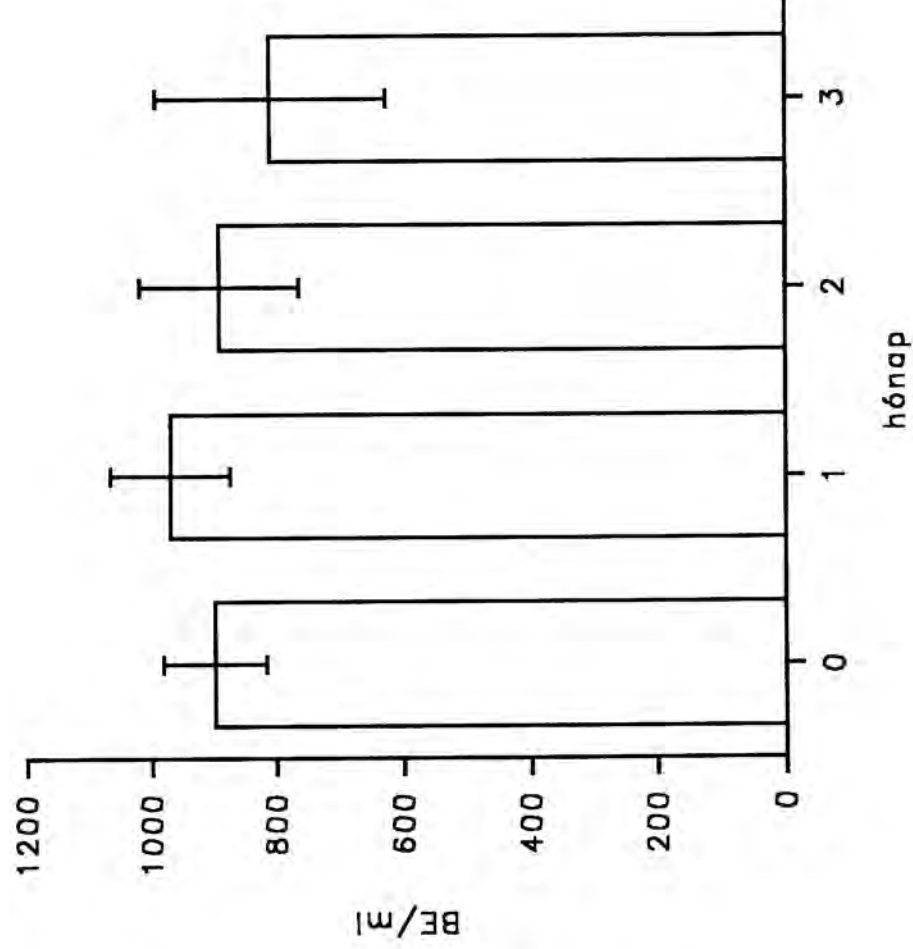
11. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek véréből izolált neutrofil granulociták forbol észterrel (forbol mirisztát acetát) stimulált szuperoxid anion termelése a lovasztatin kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. A kezelés 3. hónapjára a stimulált szuperoxid anion termelés kb. 50%-kal csökkent (28 ± 8 -ról 13 ± 5 nmol/1.5 millió sejt/perc, $p < 0.01$, $n \geq 5$).



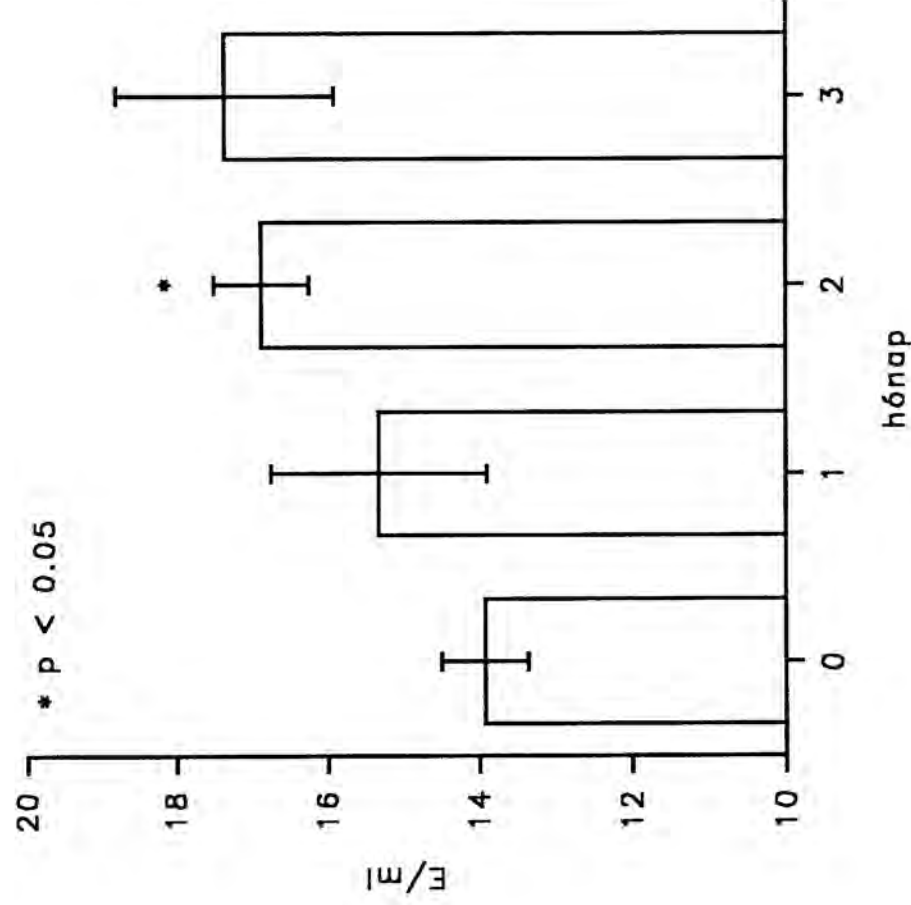
12. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek vörösvérsejtjeinek malondialdehid koncentrációja a lovasztatinnal kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. A kiindulási magas malondialdehid szint a normális szintre csökkent a vörösvérsejtekben az első hónap végére, majd megközelítőleg ezen a szinten maradt (550 ± 30 -ról 430 ± 25 nmol/ml-re, $p < 0.05$, $n \geq 5$).



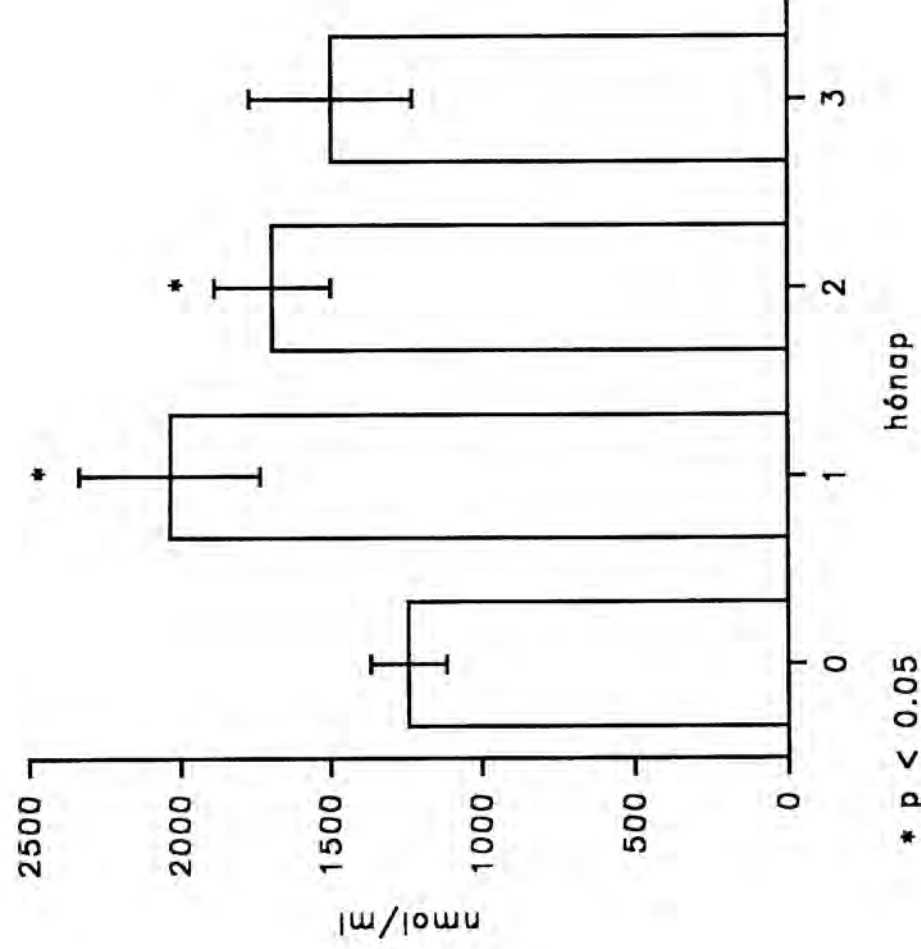
13. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek vörösvérsejtjeinek szuperoxid dizmutáz aktivitása a lovasztatin kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. A három hónap alatt nem volt szignifikáns változás a kiindulási értékhez képest ($n \geq 5$).



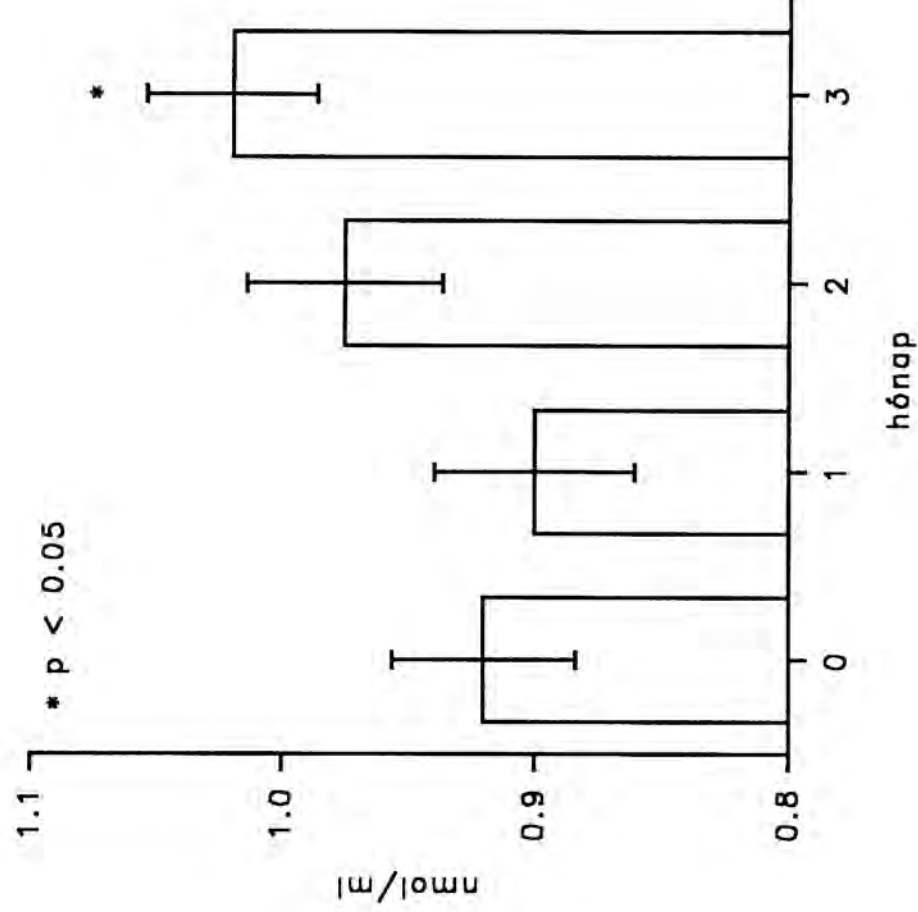
14. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek vörösvérsejtjeinek kataláz aktivitása a lovasztatin kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. A három hónap alatt nem volt szignifikáns változás a kiindulási értékhez képest ($n \geq 5$).



15. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek vörösvérsejjeinek glutation peroxidáz aktivitása a lovasztatin kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. A három hónap alatt növekedés figyelhető meg, mely a második hónapra vált szignifikánssá (13.92 ± 0.57 -ről 17.36 ± 1.44 U/ml-re; $p < 0.05$, $n \geq 5$). A harmadik hónapban csak 4 mérési eredmény volt értékelhető, melyek jelentősen szórtak, szignifikáns különbséget a kezelés előtti értékhez képest nem lehetett látni.

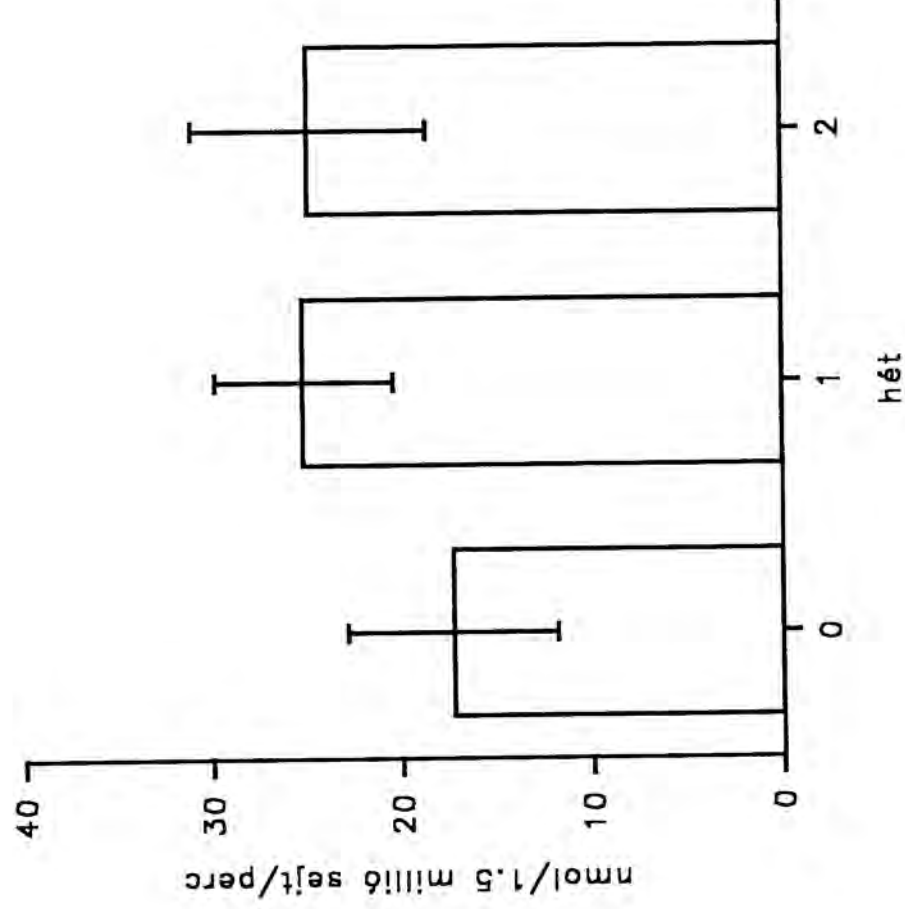


16. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek vörösvérsejtjeinek redukált glutation koncentrációja a lovasztatin kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. Az első és második hónapban szignifikánsan ($p < 0.05$) emelkedett a redukált glutation mennyisége a kiindulási értékhez képest, a harmadik hónapban a kiindulási érték közelébe tért vissza ($n \geq 5$).

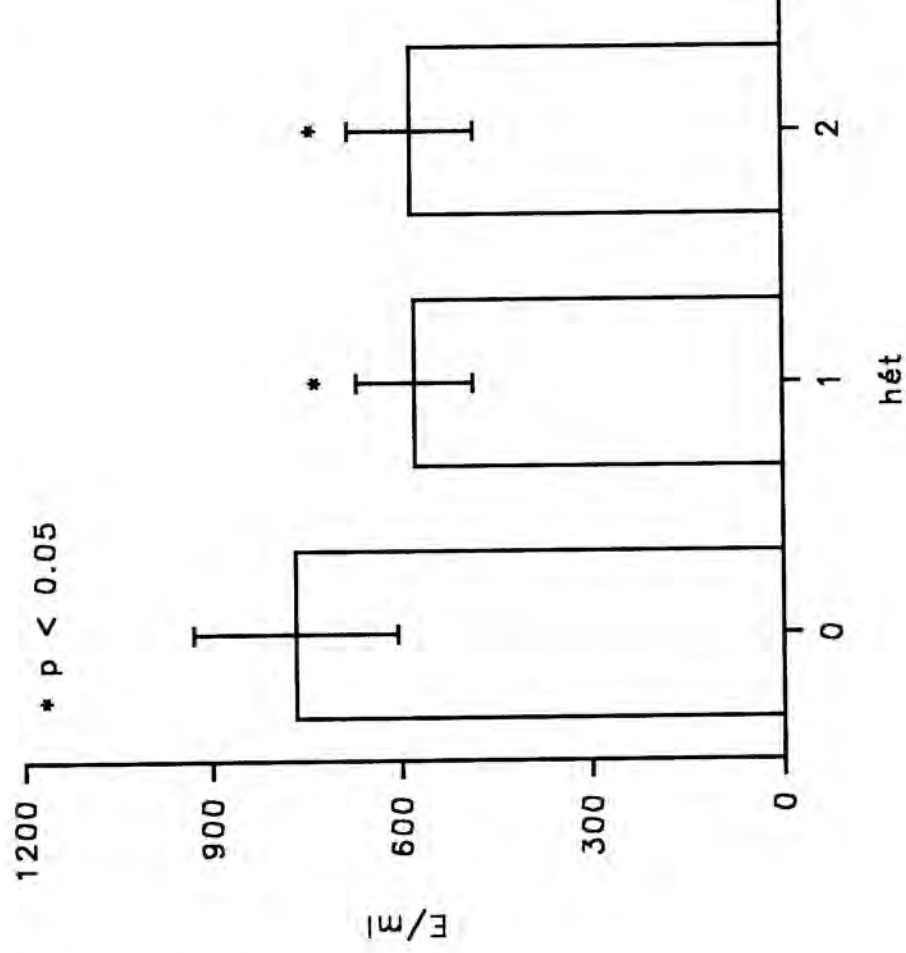


17. ábra. Lovasztatinnal kezelt betegek vérplazmájának redukált glutation koncentrációja a lovasztatin kezelés (napi 20 mg) megkezdésekor, majd 1, 2 valamint 3 hónappal a kezelés megkezdése után. A kezelés 3. hónapjára szignifikáns emelkedést lehetett tapasztalni ($p < 0.05$, $n \geq 5$).

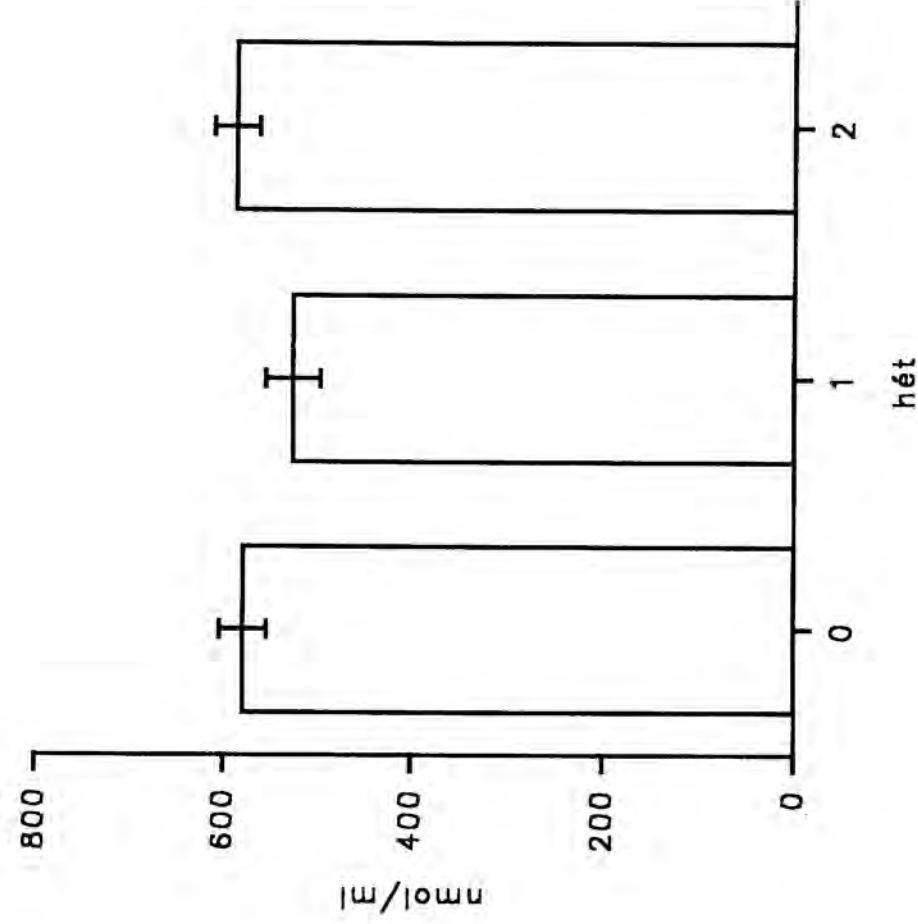
2.3.3.2 Exogén nitrát készítmények hatását vizsgáltam meg a szabad gyökös fiziológias és patológias folyamatokra iszkémiás szívbetegségben (7, 9, 14, 15). 40 mg izoszorbit-5-mononitrát (Olicard Retard, Solvay Pharma) 2 hét alatt kifejtett hatását vizsgáltam meg iszkémiás szívbetegekben a neutrofil granulociták stimulált szuperoxid gyök termelésére, az endogén celluláris és plazma enzimatis és non-enzimatis scavenger mechanizmusokra és a lipíd peroxidációra valamint a reológiai paraméterekre. A neutrofil granulociták alaphelyzetben emelkedett szuperoxid anion képzése a nitrátadás során nem szignifikáns növekvő tendenciát mutatott (18. ábra), a vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz aktivitása kezdeti magas értékről lényegesen csökkent (19. ábra). A vörösvérsejtek valamint a plazma malondialdehid koncentrációja nem változott egyértelműen (20. ábra) (21. ábra), bár a plazma malondialdehid a 2. hétre kissé csökkent: 0.72 ± 0.07 -ről 0.59 ± 0.08 nmol/ml-re ($p < 0.05$). A vörösvérsejtek glutation peroxidáz aktivitása növekedett. A vörösvérsejtek kataláz aktivitása nem változott. A nagy mennyiségű redukált glutation a vörösvérsejtekben nem szignifikáns csökkenő tendenciát mutatott a két hetes kezelés alatt, a nagy mennyiségű oxidált glutation jelentősen csökkent. Napi 40 mg izoszorbit-5-mononitrát nem változtatta meg lényegesen sem a teljes vér és plazma viszkozitást, sem a trombocita aggregációt.



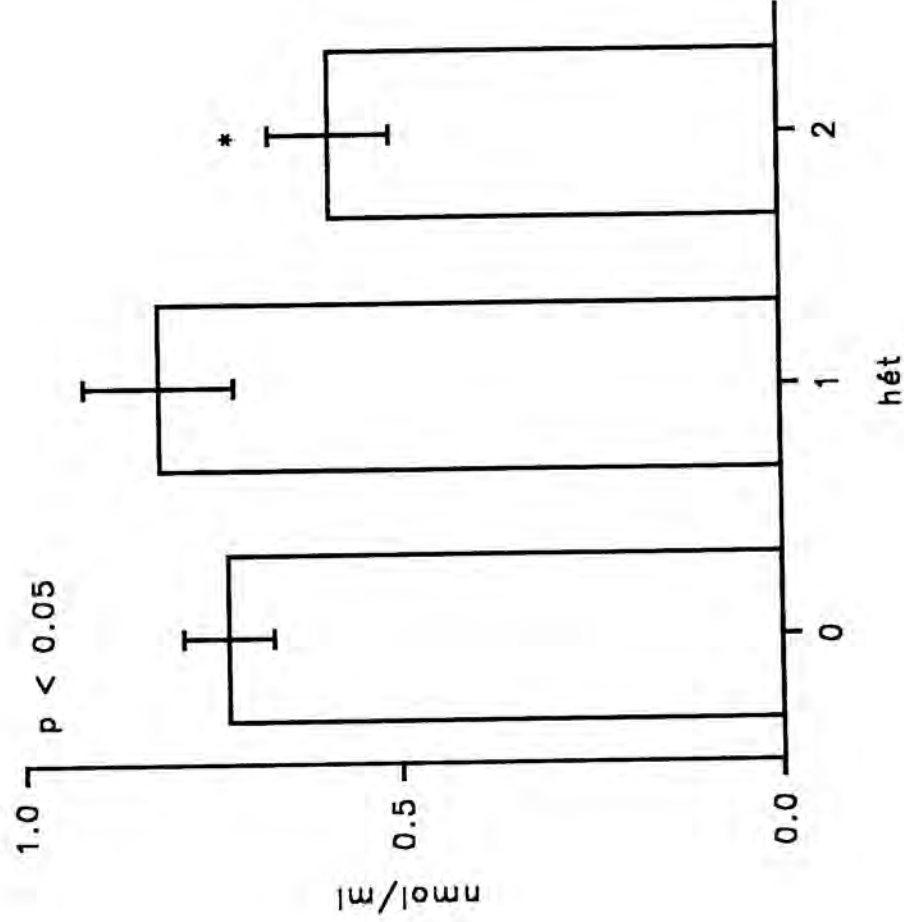
18. ábra. Izolált neutrofil granulociták forbol észterrel (forbol miriszttát acetát) stimulált szuperoxid anion képzése napi 40 mg izoszorbit-5-mononitrát-tal kezelt enyhe stabil effort angina pektoriszban szenvedő betegekben a kezelés megkezdése előtt valamint azt követően egy és két héttel. A neutrofil granulociták alaphelyzetben emelkedett szuperoxid anion képzése a nitrátadás során nem szignifikáns növekvő tendenciát mutatott (n = 12).



19. ábra. Vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz aktivitásának változása napi 40 mg izoszorbit-5-mononitrát-tal kezelt enyhe effort angina pektoriszban szenvedő betegekben a kezelés megkezdése előtt valamint azt követően egy és két héttel. A vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz aktivitása kezdeti magas értékről lényegesen csökkent ($p < 0.05$, $n = 12$).



20. ábra. Vörösvérsejtek malondialdehid koncentrációja napi 40 mg izoszorbit-5-mononitrát-tal kezelt enyhe stabil effort angina pectoriszban szenvedő betegekben a kezelés megkezdése előtt valamint azt követően egy és két héttel. Lényeges változás nem volt (n = 12).



21. ábra. A vérplazma malondialdehid koncentrációjának változása napi 40 mg izoszorbit-5-monoritrát-tal kezelt enyhe stabil effort angina pectoriszban szenvedő betegekben a kezelés megkezdése előtt valamint azt követően egy és két héttel. A kezelés második hetére a plazma malondialdehid koncentrációja kissé csökkent: 0.72 ± 0.07 -ről 0.59 ± 0.08 nmol/ml-re ($p < 0.05$; $n = 12$).

2.4 Következtetések

1. A pulmonális oxigén toxicitás egyik terápiás lehetősége az intratracheálisan adott surfactant. A hatás szempontjából in vivo az EXOSURF is a CLSE-vel megegyezően működik.
2. Az általam alkalmazott fluoreszcens jelölés nem befolyásolja lényegesen a surfactant-ek fizikai tulajdonságait.
3. A surfactant eredményesen juttatható be a tracheán keresztül a tüdőbe, de mind alveoláris, mind celluláris szinten egyenletlen az eloszlása.
4. Liposzómához kötöten antioxidáns enzimek juttathatók az alveolusokba és a tüdőszövet sejtjeibe. Ezek jelentősen megemelik a lokális antioxidáns védelmet és javítják a betegség lefolyását.
5. A liposzómához kötött antioxidáns enzimek 4 óra múlva visszanyerhetők a szövetekből és aktivitásuk is megmarad.
6. A FITC-vel kovalens módon fluoreszcensen megjelölt antioxidáns enzimek jelölése a szöveti transzportjuk során is stabilan kötve marad (legalább 4 óra hosszát).
7. Lovasztatin krónikus kezelés során iszkémiás szívbetegekben csökkentette a neutrofil granulociták stimulált szuperoxid gyök képzését és minden bizonnyal a membránok lipid peroxidációját. A lovasztatin ilyen jellegű hatása valószínűleg nem szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás fokozáson keresztül valósul meg.

8. A glutation mennyiségének fokozódása valamint a glutation peroxidáz enzim aktivitásának fokozódása lovasztatin kezelés során hidrogénperoxid termelődéssel kapcsolatos kompenzációs mechanizmus következménye lehet.

9. A per os nitrát kezelés mérhető, de a lovasztatin kezeléshez képest mérsékeltebb változásokat idéz elő a vérből kimutatható szabad gyökös folyamatokban. Kis mértékben, de egyértelműen csökkenti a vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz aktivitását.

10. A szabad gyökös reakciók hatásainak követése, a kompenzációs mechanizmusok aktivitásának monitorozása fontos eszköz lehet a kardiorespiratorikus rendszer patofiziológiájának mélyebb megértésében, a farmakológiai hatások háttérének és a betegségek prognosztikus tényezőinek feltárásában.

Irodalomjegyzék

- Aiello, E. A., R. I. Jabr, C. W. Cole: Arrhythmia and delayed recovery of cardiac action potential during reperfusion after ischemia. Role of oxygen radical-induced no-reflow phenomenon. *Circ. Res.* 77: 153-162, 1995.
- Badimon, L., J. J. Badimon, J. H. Chesebro, et al.: Von Willebrand factor and cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.* 70: 111-118, 1993.
- Baker, R. R., B. A. Holm, P. C. Panus, S. Matalon: Development of O₂ tolerance in rabbits with no increase in antioxidant enzymes. *J. Appl. Physiol.* 66: 1679-1684, 1989.
- Baker, R. R., P. C. Panus, B. A. Holm, P. C. Engstrom, B. A. Freeman, S. Matalon: Endogenous xanthine oxidase derived O₂ metabolites inhibit surfactant metabolism. *Am. J. Physiol.* 259: L328-L334, 1990.
- Baker, R. R., B. A. Freeman: Exogenous control of pulmonary antioxidant defenses. In: *The Pulmonary Circulation and Acute Lung Injury*, edited by S. I. Said. New York: Futura, 1991.
- Baskurt, O. K.: Activated granulocyte induced alterations in red blood cells and protection by antioxidant enzymes. *Clin. Hemorheol.* 16: 49-16, 1996.
- Beckman, J. S., Z. Y. Ye, P. G. Anderson, J. Chen, M. A. Accavetti, M. M. Tarpey, C. R. White: Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 81-88, 1994.

- Beers, R. F., I. W. Sizer: Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140, 1952.
- Bernier, M., A. S. Manning, D. J. Hearse: Reperfusion arrhythmias: dose-related protection by anti-free radical intervention. *Am. J. Physiol.* 256: H1344-1352, 1989.
- Bligh, E. G., W. J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
- Bogár L., K. Tóth, A. Mátrai, M. Tekeres: Does isorbide-dinitrate have an effect on the rheology of human blood? *Biorheol.*, 23: 295, 1986.
- Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- Brain, J. D., D. E. Knudson, S. P. Sorokin, M. A. Davis: Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ. Res.* 11: 13-33, 1976.
- Brown, B. G., X. Q. Zhao, D. Poulin, J. J. Albers: Atherosclerosis regression and plaque stabilization: a rationale for lipid-lowering in coronary artery disease. *Cardiol. Rev.* 3: 7-15, 1995.
- Buckley, B. J., A. K. Tanswell, B. A. Freeman: Liposome-mediated augmentation of catalase in alveolar type II cells protects against H₂O₂ injury. *J. Appl. Physiol.* 63: 359-367, 1987.

- Burton, K. P.: Superoxide dismutase enhances recovery following myocardial ischaemia. *Am. J. Physiol.* 248: H637-643, 1985.
- Carlos, T. M., J. M. Harlan: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101, 1994.
- Carlsson, L. M., J. Jonsson, T. Edlun, S. L. Marklund: Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6264, 1995.
- Catravas, J. D., A. Cziraki, A. Chester, A. F. Maizza, S. Tajkaremi, A. Kahgani, M. H. Yacoub: Early detection of lung endothelial dysfunction in man. In: *Vascular endothelium: responses to injury*. Ed.: Catravas, J. D., Callow, A. D., Ryan, U. S. Plenum Press, New York, 1996. pp. 11-21.
- Cerbai, E., G. Ambrosio, F. Porciatti, M. Chiarielli, A. Giotto, A. Mugelli: Cellular electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch-clamp study in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation* 84: 1773-1782, 1991.
- Charnock, J. S.: Lipids and cardiac arrhythmia. *Prog. Lipid Res.* 33: 355-385, 1994.
- Chen, P. S. Jr., T. Y. Toribara, W. Huber: Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28: 1756-1758, 1956.
- Chiu, D. T. Y., F. H. Stults, A. L. Tappal: Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 445: 558-566, 1976.

- Cohen, G., D. Dembiec, J. Marcus: Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 34: 30-38, 1970.
- Cohen, G.: Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 738: 8-14, 1994.
- Corsini, A., M. Raiteri, R. M. Soma, F. Bernini, R. Fumagalli, R. Paoletti: Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Am. J. Cardiol.* 76: 21-28, 1995.
- Crapo, J. D., D. M. DeLong, K. Sjostrom, G. R. Hasler, R. T. Drew: The failure of aerosolized superoxide dismutase to modify pulmonary oxygen toxicity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 1027-1033, 1977.
- Davis, J. M., W. N. Rosenfeld, R. J. Sanders, A. Gonenne: Prophylactic effects of recombinant human superoxide dismutase in neonatal lung injury. *J. Appl. Physiol.* 74: 2234, 1993.
- Dol, F., A. Mares, J. Herbert: Simvastatin inhibits myointimal hyperplasia following carotid artery injury in cholesterol-fed rabbits. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 7: 772-778, 1996.
- Egashira, K., A. Takeshita: Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on endothelium-dependent coronary vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748: 622-625, 1995.
- Engler, R., E. Gilpin: Can superoxide dismutase alter myocardial infarct size? *Circulation* 79: 1137-1142, 1989.

- Enhorming, G.: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J. Appl. Physiol.* 43: 198-203, 1977.
- Ewenstein, B. M.: Vascular biology of von Willebrand factor. In: *Vascular endothelium: physiology, pathology, and therapeutic opportunities*; ed. V. R. Born and C. J. Schwartz, Schattauer, Stuttgart, New York, 1997. pp.: 107-122.
- Faxon, D. P., J. W. Currier: Prevention of Post-PTCA Restenosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748: 419-427, 1995.
- Feelish, M., M. Kelm: Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 286-293, 1991.
- Fink, M. P., D. Payen: The role of nitric oxide in sepsis and ARDS: synopsis of a roundtable conference held in Brussels on 18-20 March 1995, *Int. Care Med.* 22: 158-165, 1996.
- Finkelstein, J. N., D. L. Shapiro: Isolation of type II alveolar epithelial cells using low protease concentrations. *Lung* 160: 85-98, 1982.
- Freeman, B. A., S. L. Young, J. D. Crapo: Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J. Biol. Chem.* 258: 12534-12542, 1983.
- Freeman, B. A., J. F. Turrens, Z. Mirza, J. D. Crapo, S. L. Young: Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase. *Federation Proc.* 44: 2591-2595, 1985.

- Freeman, B.: Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. Chest 105 (Suppl.3.): 799-803, 1994.
- Freeman, B. A., J. D. Crapo: Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 47: 412-426, 1982.
- Furberg, C. D., H. P. Adams, W. B. Applegate, R. P. Byington, M. A. Espeland, T. Hartwell, D. B. Hunninghake, D. S. Lefkowitz, J. Probstfield, W. A. Riley, B. Young, for the Asymptomatic Carotid Artery Progression Study (ACAPS) Research Group: Effect of lovastatin on early carotid atherosclerosis and cardiovascular events. Circulation. 90: 1679-1687, 1994.
- Gimbrone, M. A., M. I. Cybulsky, N. Kume, T. Collins, N. Resnick: Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 748: 122-130, 1995.
- Gotto, A. M.: Lipid-lowering trials: What have they taught us about morbidity and mortality? Cardiology 87: 453-457, 1996.
- Gregoriadis, G.: Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress. New York: Wiley, 1988.
- Guarnieri, C., G. Melandori, I. Caldarera, M. Scheda, A. Ligabue, S. Guizzardi, A. Branzi: Reduced oxidative activity of circulating neutrophils in patients after myocardial infarction. Cell. Biochem. Funct. 8: 157-169, 1990.
- Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 334: 721-724, 1994.

- Hankovszky O. H., K. Hideg, I. Bodi, L. Frank: New antiarrhythmic agents. 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamides and 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-3-carboxamides. *J. Med. Chem.* 29:1138-52, 1986.
- Hartog, A., D. Gommers, B. Lachmann: Role of surfactant in the pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome (ARDS), *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 50: 327-377, 1995.
- Holm, B. A., R. H. Notter, J. Siegle, S. Matalon: Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hyperoxia. *J. Appl. Physiol.* 59: 1402-1409, 1985.
- Holm, B. A.: The Role of the Pulmonary Surfactant System in Hyperoxic Lung Injury (PhD thesis). University of Rochester, Rochester, NY, 1987.
- Holm, B. A., S. Matalon, J. N. Finkelstein, R. H. Notter: Type II pneumocytes during hyperoxic lung injury and recovery. *J. Appl. Physiol.* 65: 2672-2678. 1988.
- Iwama, A., M. Sawamura, Y. Nara, Y. Yamori: Effect of lovastatin and fluoromevalonate on phosphatidylinositol-3-kinase activity stimulated with PDGF. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 1: S318-320, 1995.
- Jakobisiak, M., S. Bruno, J. S. Skierski, Z. Darzynkiewicz: Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3628-3632, 1991.

- Janssens, S. P., K. D. Bloch, Z. Nong, R. D. Gerard, P. Zoldhelyi, D. Collen: Adenoviral-mediated transfer of the human endothelial nitric oxide synthase gene reduces acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *J. Clin. Invest.* 98: 317-324, 1996.
- Jávor, T., T. Past, L. Nagy, Gy. Mózsik, I. Wittmann: Free radicals and their interpretations. *Acta Physiol. Hung.* 73: 323-330, 1990.
- Jukema, J. W., A. V. Bruschke, A. J. van Boven, J. H. Reiber, E. T. Bal, A. H. Zwiderman, H. Jansen, G. J. Boerma, F. M. van Rappard, K. I. Lie, et al: Effects of lipid lowering by pravastatin on progression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation* 91: 2528-2540, 1995.
- Juliano, R. L.: Liposomes as a drug delivery system. *Trends Pharmacol. Sci.* 2: 39-41, 1981.
- Késmárky G., K. Tóth, L. Habon, G. Vajda, I. Juricskay: Hémoreheological parameters in coronary artery disease. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 18: 245-251, 1998.
- Kolata G.: Limiting heart attack injury. *Science* 232: 1198, 1986.
- Korst, R. J., B. Bewig, R. G. Crystal: In vitro and in vivo transfer and expression of human surfactant SP-A and SP-B associated protein cDNAs mediated by replication deficient, recombinant adenoviral vector. *Hum. Gene Ther.* 6: 277-287, 1995.

- Kubes, P., M. Suzuki, D. N. Granger: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4651-4655, 1991.
- Kurakata, S., M. Kada, Y. Shimada, T. Komai, K. Nomoto: Effects of different inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, pravastatin sodium and simvastatin, on sterol synthesis and immunological functions in human lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology* 34: 51-61, 1996.
- Leff, J. A. et al.: Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis. *Lancet* 341: 777-780, 1993.
- Lewis, J., M. Ikegami, R. Higuchi, A. Jobe, D. Absolom: Nebulized vs. instilled exogenous surfactant in an adult lung injury model. *J. Appl. Physiol.* 71: 1270-1276, 1991.
- Li, J., R. Spragg: Adenovirus-mediated transfer of phosphocholine cytidyltransferase gene to adult rat alveolar type II cells. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155: A213, 1997.
- Lipid Research Clinics Program: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results: I. Reduction in incidence of coronary heart disease; II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 251: 351-374, 1984.
- Litt, M. R., R. W. Jeremy, H. F. Weisman, J. A. Winkelstein, L. C. Becker: Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia: evidence of neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation*, 80: 1816-1827, 1989.

Liu, S., J. S. Beckman, D. D. Ku: Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1114-1121, 1994.

Luck, H.: Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by H. U. Bergmeyer. New York: Academic, 1963, pp. 885-888.

MAAS Investigators: Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicenter Antiatheroma Study (MAAS). *Lancet* 344: 633-638, 1994.

Matalon, S., B. A. Holm, R. R. Baker, M. K. Whitfield, B. A. Freeman: Characterization of antioxidant activities of pulmonary surfactant mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* 1035: 121-127, 1990.

Matkovics B., Szabó L., Varga I.: Lipid peroxidáció és redukált glutation anyagsere enzimek aktivitás meghatározása biológiai mintákban. *Labor. Diagn.* 15: 248, 1988.

McCord, J. M., I. Fridovich: Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055, 1969.

Michelson, A. M., K. Puget, P. Durosay: Studies of liposomal superoxide dismutase in rats. *Mol. Physiol.* 1: 85-96, 1981.

Miller, A. C., D. Samid: Tumor resistance to oxidative stress: association with ras oncogene expression and reversal by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation. *Int. J. Cancer.* 60: 249-254, 1995.

Minor, R. L. Jr., P. R. Myers, R. Guerra Jr., J. N. Bates, D. G. Harrison: Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 86: 2109-2116, 1990.

- Misra, H. P., J. Fridovich: The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine, a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175, 1972.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer, E. A. Higgs: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 43: 109-142, 1991.
- Mózsik, Gy., M. Fiegler, I. Juricskay, B. Mezey, K. Tóth: Oxygen free radicals, lipid metabolism, and whole blood and plasma viscosity in the prevention and treatment of human cardiovascular diseases. *Bibl. Nutr. Dieta* 49: 111-124, 1992.
- Mugge, A., J. H. Elwell, T. E. Peterson, T. G. Hofmeyer, D. D. Heistad, D. G. Harrison: Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* 69: 1293-1300, 1991.
- Munro, E., M. Patel, P. Chan, L. Betteridge, G. Clunn, K. Gallagher, A. Hughes, M. Schachter, J. Wolfe, P. Sever: Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by lovastatin: the role of isoprenoid intermediates of cholesterol synthesis. *Eur. J. Clin. Invest.* 24: 766-772, 1994.
- Münzel, T., H. Sayegh, B. A. Freeman, M. M. Tarpey, D. G. Harrison: Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance: a novel mechanism of tolerance and cross tolerance. *J. Clin. Invest.* 95: 187-194, 1995.

- Münzel, T., H. Just, D. G. Harrison: The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. In: Vascular endothelium: physiology, pathology, and therapeutic opportunities; ed. V. R. Born and C. J. Schwartz, Schattauer, Stuttgart, New York, 1997. pp.: 205-220.
- Murota, S. I., H. Fujita, I. Morita, Y. Wakabayashi: Adhesion molecule mediated endothelial cell injury elicited by activated leukocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748: 133-147, 1995.
- Najibi, S., R. Cohen: Enhanced role of K^+ channels in relaxations of hypercholesterinemic rabbit carotid artery to NO. *Am. J. Physiol.* 269: H805-811, 1995.
- Nicholas, T. E., I. R. Doyle, A. D. Bersten: Surfactant replacement therapy in ARDS: white knight or noise in the system. *Thorax* 52: 195-197, 1997.
- Nicholson, S. C., M. Squier, D. J. Ferguson, Z. Nagy, S. Westaby, R. D. Evans: Effect of desferrioxamine cardioplegia on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *Ann. Thorac. Surg.* 63:1003-1011, 1997.
- Niu, X. F., C. W. Smith, P. Kubes: Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ. Res.* 74: 1133-1140, 1994.
- Notter, R. H., E. A. Egan, M. S. Kwong, B. A. Holm, D. L. Shapiro: Lung surfactant replacement in premature lambs with extracted lipids from bovine lung lavage: effects of dose, dispersion technique, and gestational age. *Pediatr. Res.* 19: 569-577, 1985.

- Ohara, Y., T. E. Peterson, D. G. Harrison: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 91: 2546-2551, 1993.
- Ohara, Y., T. E. Peterson, H. S. Sayegh, R. R. Subramanian, J. N. Wilcox, D. G. Harrison: Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation* 92: 898-903, 1995.
- Ohkawa, H.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358, 1979.
- Padmanabhan, R. V., R. Gudapaty, I. E. Liener, B. A. Schwartz, J. R. Hoidal: Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132: 164-167, 1985.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, S. Moncada: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
- Panus, P. C., J. Shearer, B. A. Freeman: Pulmonary metabolism of reactive oxygen species. *Exp. Lung Res.* 14: 959-976, 1988.
- Panus, P. C., B. A. Freeman: Liposome-entrapped superoxide dismutase: in vitro and in vivo effects. In: *Liposomes as Drug Carriers*, edited by G. Gregoriadis. New York: Wiley, 1988.
- Pinsky, D. J., Y. Naka, H. Liao, et al.: Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J. Clin. Invest.* 97: 493-500, 1996.

- Placer, Z. A., L. Cushman, B. C. Johnson: Estimation of products of lipid peroxidation in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16: 359-364, 1966.
- Prayssac, P., S. C. Erzurum, C. Danel, N. T. Eissa, R. G. Crystal, P. Herve, M. Mazmanian, P. Lemarchand: Adenovirus-mediated transfer to the lungs of catalase and superoxide dismutase cDNAs prevents hyperoxia toxicity but not ischemia-reperfusion injury in rats. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155: A265, 1997.
- Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman: Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 481-487, 1991.
- Rainger, G. E., A. Fischer, C. Shearman, G. B. Nash: Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro. *Am. J. Physiol.* 269: H1398-1406, 1995.
- Ravinder, P., J. A. Buda, D. M. Flynn, S. A. Blesse, A. M. Shin, M. J. Curtis, D. J. Lefter: Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischaemia-reperfusion. *Circ. Res.* 78: 65-72, 1996.
- Röth, E., B. Török, T. Zsoldos, B. Matkovics: Lipid peroxidation and scavenger mechanism in experimentally induced heart infarcts. *Basic Res. Cardiol.* 80: 530-536, 1985.
- Róth, E., Török, B., Z. Pollák, G. Temes, G. Morvay: Myocardial protection by antioxidant during permanent and temporary coronary occlusion in dogs. *Basic Res. Cardiol.* 82 Suppl. 2: 335-345, 1987.

- Roullet, J. B., H. Xue, C. M. Roullet, W. S. Fletcher, M. J. Cipolla, C. T. Harker, D. A. McCarron: Mevalonate availability affects human and rat resistance vessel function. *J. Clin. Invest.* 96: 239-244, 1995.
- Sacks, F. M., L. A. Moye, B. R. Davis, T. G. Cole, J. L. Rouleau, D. T. Nash, M. A. Pfeffer, E. Braunwald: Relationship between plasma LDL concentrations during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial. *Circulation* 97: 1446-1452, 1998.
- Sahgal, N., J. M. Davis, C. G. Robbins, S. Horowitz, E. G. Langenback, R. H. Perry, D. Colflesh, J. Tierney, S. R. Simon: Localisation and activity of recombinant human CuZn superoxide dismutase after intratracheal administration. *Am. J. Physiol.* 72: L230, 1996.
- Satoh K., Ichihara K.: Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on mitochondrial respiration in ischemic rat hearts. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol. Section*, 292: 271-275, 1995.
- Saugstad, O. D.: Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr.* 85: 1-4, 1996.
- Scandinavian Simvastatin Survival Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344: 1383-1389, 1994.
- Sedlak J., R. H. Lindsay: Estimation of total protein-bound and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25: 192-205, 1968.

- Shan K., A. M. Lincoff, J. B. Young: Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann. Intern. Med.* 125: 47-58, 1996.
- Shepherd, J., S. M. Cobbe, I. Ford, C. G. Isles, A. R. Lorimer, P. W. Macfarlane, J. H. McKillop, C. J. Packard, for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolaemia. *N. Engl. J. Med.* 333: 1301-1307, 1995.
- Smith, C. W.: Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 76-87, 1993.
- Smith, C. W.: Endothelial adhesion molecules and inflammation. In: *Vascular endothelium: physiology, pathology, and therapeutic opportunities*; ed. V. R. Born and C. J. Schwartz, Schattauer, Stuttgart, New York, 1997. pp.: 141-155.
- Szabados E., G. M. Fischer, K. Tóth, B. Csete, B. Némethi, K. Trombitás, T. Habon, D. Endrei, B. Sümegi: Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 309-317, 1999.
- Szabo, C.: The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6: 79-88, 1996.
- Szoka, F., D. Papahadjopoulos: Procedure for preparing liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198, 1978.

- Tanswell, A. K., B. A. Freeman. Liposome-entrapped antioxidant enzymes prevent lethal O₂ toxicity in the newborn rat. *J. Appl. Physiol.* 63: 347-352, 1987.
- Tanswell A. K., B. A. Freeman: Antioxidant therapy in critical care medicine, *New Horizons* 3: 330-341, 1995.
- Tietze F.: Enzymatic method for quantitative determination of total and oxidized glutathione, applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522, 1969.
- Tomera, J. F.: Nitric oxide: The interrelation of its actions. *Drugs of Today*, 30: 611-621, 1994.
- Török, B., E. Röth, V. Bar, Z. Pollák: Effects of antioxidant therapy in experimentally induced heart infarcts. *Basic Res. Cardiol.* 81: 167-179, 1986.
- Török, B., E. Röth, T. Zsoldos, A. Tigyí, B. Matkovics, L. Szabó: Lipid peroxidation in lung of rats exposed to hyperoxic, hypoxic and ischemic effects. *Exp. Pathol.* 29: 221-226, 1986.
- Török, B., E. Röth, B. Mezey, Gy. Temes, K. Tóth, Zs. Pollák: Promising reduction of ventricular fibrillation in experimentally induced heart infarction by antioxidant therapy. *Basic Res. Cardiol.* 82 (Suppl. 2.): 347-353, 1987.
- Tóth, K., I. Wittmann, T. Past, T. Jávör, I. Juricskay: Increase of red blood cell suspension viscosity caused by free radical generator. *Biorheol.* 26: 643, 1989.

- Tóth, K., T. Habon, I. Horváth, B. Mezey, I. Juricskay, Gy. Mózsik: Hemorheological and hemodynamical parameters in patients with ischemic heart disease at rest and at peak exercise. *Clin. Hemorheol.* 14: 329-338, 1994.
- Tóth, K., T. Habon, L. Czopf, D. Endrei, I. Juricskay, Gy. Mózsik: The hemorheologic and hemodynamic effects of Olicard Retard (isosorbide-5-mononitrate) in patients with ischemic heart disease. *Clin. Hemorheol.*, 15: 474, 1995.
- Turrens, J. F., J. D. Crapo, B. A. Freeman: Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 73: 87-95, 1984.
- Twomey, P., J. Taira, W. DeGraff, J. B. Mitchell, A. Russo, M. C. Krishna, O. H. Hankovszky, L. Frank, K. Hideg: Direct evidence for in vivo nitroxide free radical production from a new antiarrhythmic drug by EPR spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 909-16, 1997.
- Vereckei A., A. Blázovics, I. György, E. Fehér, M. Tóth, G. Szénási, A. Zsinka, G. Földiák, J. Fehér: The role of free radicals in the pathogenesis of amiodarone toxicity. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 4: 161-177, 1993.
- Visher, U. M., L. Jormot, C. B. Wollheim, et al.: Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood*, 85: 3164-3172, 1995.
- Watanabe, T., T. Shimokama, S. Haraoka, H. Kishikawa: T lymphocytes in atherosclerotic lesions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748: 40-54, 1995.

- White, C. R., T. A. Brock, L. Y. Chang, J. Crapo, P. Briscoe, D. Ku, W. A. Bradley, S. H. Gianturco, J. Gore, B. A. Freeman, et al.: Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1044-1048, 1994.
- Wispe, J. R., B. B. Warner, J. C. Clark: Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J. Biol. Chem.* 267: 23937-23941, 1992.
- Witztum, J. L.: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344: 793-795, 1994.
- Yei, S., C. J. Bachurski, T. E. Weaver, S. E. Wert, B. C. Trapnell, J. A. Whitsett: Adenoviral-mediated gene transfer of human surfactant protein B to respiratory epithelial cells. *Am. J. Resp. Cell Mol. Bol.* 11: 329-336, 1994.
- Yui, Y., C. Kawai, S. Hosoda, and the Pravastatin Restenosis Trial Group. Pravastatin (Mevalotin) Restenosis Trial after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748: 208-216, 1995.
- Zhu, S., M. Manuel, S. Tanaka, N. Choe, E. Kagan, S. Matalon: Contribution of Reactive Oxygen and Nitrogen Species to Particulate-Induced Lung Injury. *Environ. Health Perspect.* 106 Suppl 5: 1157-1163, 1998.

A témához kapcsolódó saját közlemények

1. Baker, R. R., L. Czopf, T. Jilling, B. A. Freeman, K. L. Kirk, S. Matalon: Quantitation of alveolar distribution of liposome-entrapped antioxidant enzymes. *Am. J. Physiol.* 263: L585-594, 1992.
2. Czopf, L., R. R. Baker, T. Jilling, B. A. Freeman, K. L. Kirk, S. Matalon: Liposome entrapped antioxidant enzyme delivery to the alveoli of the lung. In: Mózsik Gy. (Ed.) *Role of Free Radicals in Biological Systems*. Topics 1993. Akadémiai Kiadó, Budapest.
3. Pataki, G., L. Czopf, B. A. Holm, S. Matalon: Quantification of the alveolar distribution of surfactant mixtures in normal and injured lungs. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 15: 451-459, 1996.
4. Czopf, L., C. T. Myles, S. Matalon: Fluorescent labelling does not affect the minimum surface tension of surfactant mixtures. *The FASEB Journal*, Abstracts, 6: A1269, 1992.
5. Czopf, L., Gy. Pataki, B. A. Holm and S. Matalon: Quantification of alveolar distribution of intratracheally instilled surfactant mixtures. *The FASEB Journal*, Abstracts 7: A499, 1993.
6. Tóth, K., T. Habon, L. Czopf, D. Endrei, I. Juricskay, Gy. Mózsik: The hemorheologic and hemodynamic effects of Olicard Retard (isosorbide-5-mononitrate) in patients with ischemic heart disease. (abstract) *Clin. Hemorheol.*, 15: 474, 1995.

7. Czopf L., K. Tóth, T. Habon, D. Endrei, Gy. Mózsik, E. Róth: The effect of isosorbide-5-mononitrate on the production and metabolism of reactive oxygen species and rheological parameters in patients with ischemic heart disease. (abstract) *Clin Hemorheol.*, 15: 475, 1995.
8. Czopf L., K. Tóth, T. Habon, R. Halmosi, E. Róth: The effect of lovastatin on the production and metabolism of reactive oxygen species and on haemorrheological parameters in patients with hyperlipoproteinemia. (abstract) Third International Congress of the Worldwide Hungarian Medical Academy. Pécs, Hungary, July 4-6, 1996.
9. Czopf L., K. Tóth, D. Endrei, R. Halmosi, E. Róth: Nitrate and lovastatin treatment influences the metabolism of reactive oxygen species in patients with ischemic heart disease. (abstract) First International Symposium on Myocardial Cytoprotection. Pécs, Hungary, September 26-28, 1996. *Cardiologia Hungarica*, Suppl. 1997/2, p. 44.
10. Czopf L., J. Nemes, J. Varga, J. Lantos, E. Róth: The values of detection of free radical mediated reactions in patients. *Acta Chirurgica Hungarica*, 36: 65-66, 1997.
11. Lantos J., E. Róth, L. Czopf, J. Nemes, I. Gál: Monitoring of plasma total antioxidant status in different diseases. *Acta Chirurgica Hungarica*, 36: 188-189, 1997.
12. Halmosi R., L. Czopf, G. Késmárky, T. Habon, K. Tóth, I. Juricskay, E. Róth, J. Lantos, Gy. Mózsik: The effect of lovastatin and nitrate on free radical mediated processes in patients with ischemic heart disease. 2nd International Symposium on Myocardial Cytoprotection, October 8-10, 1998, Pécs, Hungary. Abstract book.

13. Lantos J., E. Róth, R. Szokodi, L. Czopf, G. Késmárky, K. Tóth, R. Halmosi, J. Nemes: Plasma antioxidant status in cardiac diseases. 2nd International Symposium on Myocardial Cytoprotection, October 8-10, 1998, Pécs, Hungary. Abstract book.
14. Czopf L., R. Halmosi, G. Késmárky, T. Habon, K. Tóth, I. Juricskay, E. Róth, Gy. Mózsik: Lovastatin and nitrate therapy induced changes in hemorheological parameters and in free radical mediated processes in patients with ischemic heart disease. Perfusion, 1999. (in press).
15. Halmosi R., Czopf L., Késmárky G., Habon T., Tóth K., Juricskay I., Róth E., Mózsik Gy.: Hemorheológiai paraméterek és szabad gyökös folyamatok változása ischaemiás szívbetegekben nitrát illetve lovastatin kezelés hatására. Cardiologia Hungarica, 1999. (nyomdában).

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni kollégáimnak a munka elvégzésében, megformálásában nyújtott közvetlen, valamint a helyettem elvégzett klinikai munka révén nyújtott közvetett segítséget. Jávor professor úrnak az amerikai tanulmányút engedélyezését, Sadis Matalon professor úrnak a pulmonológiai kísérletes munka támogatását és irányítását, Mózsik Gyula professor úrnak a klinika tudományos aktivitásának tudatos fejlesztését, a kardiológiai munkacsoport támogatását, a dolgozat megírására szánt idő biztosítását és az igen értékes személyes segítséget a téma feldolgozásában, Rudolf Becker-Casademont professor úrnak a téma német irodalmába való betekintés lehetőségét, Tóth Kálmán tanár úrnak a folyamatos, baráti útmutatást és bátorítást a munka befejezésére, az elméleti és klinikai kardiológiai ismeretekben való elmélyülésre. Röth Erzsébet professor asszonynak az igen értékes tudományos együttműködés lehetőségét, Hideg Kálmán professor úrnak a szabad gyökök elméletébe és kémiai viselkedésébe történő bevezetést, Jilling Tamásnak, Pataki Györgynek, Eok-Soo Oh-nak, Carpentato T. Myles-nak, Randall R. Baker-nek, Halmosi Róbertnek, Késmárky Gábornak, Habon Tamásnak, Endrei Dórának, Papp Elődnek a tudományos együttműködést és a POTEI. számú Belklinikáján minden kollégámnak a munka elvégzéséhez és megírásához nyújtott támogatását. Köszönöm kedves feleségemnek, hogy a klinikai és tudományos munkámat értékelte és a mindennapokhoz tartozó összes más feladatot ellátta helyettem.