

**A fruktóz-1,6-difoszfát (FDF) cardioprotektív  
hatásának klinikai és kísérletes vizsgálata**

**Doktori (PhD) értekezés**

**Dr. Gál János**

**PTE, ÁOK, Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézet**

**Programvezető: Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanár  
PTE, ÁOK, Kísérletes Sebészeti Intézet**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**2000**

**„Népszerű orvosaink között azokat kell a legjobbaknak mondanunk, akik a legkevesebb kárt okozták”.**

***Paracelsus (1493-1541)***

## Tartalomjegyzék

A rövidítések jegyzéke.....	5
<b>I. Bevezetés.....</b>	<b>8</b>
I/1. A szívműtétek során alkalmazott cardioprotekció történeti áttekintése.....	10
I/2. A szívizom anyagcseréjének sajátosságai normoxiás, hypoxiás és ischaemiás környezetben.....	13
I/3. Az ischaemia-reperfúzió hatása a szív purin- és pirimidin-metabolizmusára.....	16
I/4. A fruktóz-1,6-difoszfát (FDF) cytoprotektív hatásának elméleti háttere.....	17
I/5. Vizsgálataink célkitűzései.....	21
<b>II. Betegek, kísérletes modellek és módszerek.....</b>	<b>23</b>
II/1. FDF hatásának vizsgálata szívsebészeti betegeken.....	23
II/1.1. Betegcsoportok.....	23
II/1.2. A funkcionális és laboratóriumi paraméterek monitorozása.....	27
II/1.3. A szív nukleotid metabolizmusának vizsgálata.....	29
II/1.3.1. Anyag és módszer.....	29
II/2. Az FDF coronariákra kifejtett direkt hatásának vizsgálata in vitro patkányszív-modelleken.....	31
II/2.1. Anyag és módszer.....	31
II/2.1.1. A kísérletek leírása.....	33

<b>II/3.</b>	<b><i>Izolált vena saphena érgyűrűk reakcióinak vizsgálata in vitro modellkísérletekben</i></b> .....	<b>35</b>
	II/3.1. Anyag és módszer .....	35
	II/3.1.1. A kísérletek leírása.....	37
<b>II/4.</b>	<b><i>Az adatok statisztikai feldolgozása</i></b> .....	<b>40</b>
<b>III.</b>	<b>Eredmények</b> .....	<b>41</b>
<b>III/1.</b>	<b><i>Klinikai mérési eredmények</i></b> .....	<b>41</b>
	III/1.1. A funkcionális és laboratóriumi vizsgálatok eredményei.....	41
	III/1.2. A szív nukleotid anyagszere vizsgálatának eredményei.....	45
	III/1.3. Megbeszélés.....	49
<b>III/2.</b>	<b><i>Az FDF coronariákra kifejített direkt hatásának eredményei, in vitro patkányszív-modelleken</i></b> .....	<b>54</b>
	III/2.1. Eredmények.....	54
	III/2.2. Megbeszélés.....	62
<b>III/3.</b>	<b><i>Izolált vena saphena érgyűrűkön mért, FDF kiváltotta cGMP szint változás eredményei</i></b> .....	<b>64</b>
	III/3.1. Eredmények.....	64
	III/3.2. Megbeszélés.....	70
<b>IV.</b>	<b>Összefoglalás, konklúziók</b> .....	<b>73</b>
<b>V.</b>	<b>Az új eredmények összefoglalása és klinikai jelentősége</b> .....	<b>76</b>
<b>VI.</b>	<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>78</b>
<b>VII.</b>	<b>Saját közlemények, absztraktok, kongresszusi résztvételek</b> ... <b>90</b>	
	<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>94</b>

## A rövidítések jegyzéke

ADP:	adenozin-difoszfát
AMP:	adenozin-monofoszfát
ANP:	pitvari nátriuretikus protein
ARDS:	felhóttkori respiratorikus distress szindróma
ATP:	adenozin-trifoszfát
AXC:	aorta leszorítás
CABG:	„coronaria artéria bypass graft”, coronaria revascularisatiós műtét
CGMP:	ciklikus guanozin-monofoszfát
CBF:	coronaria-áramlás
CI:	szívindex
CK:	creatin-kináz
CK-MB:	creatin-kináz MB-izoenzim
CO:	keringési perctérfogat
CP:	kreatin-foszfát
ECK:	extracorporalis keringés

EF:	ejekciós frakció
2,3-DPG:	2,3-difoszfoglicerát
FDF:	fruktóz-1,6-difoszfát
GC:	guanilát-cikláz
GIK:	glükóz-inzulin-kálium
GTN:	gliceril-trinitrát
HPLC:	nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia
5-HT:	5-hidroxi-triptamin
IBMX:	izobutil-metilxantináz
ISZB:	ischaemiás szívbetegség
KH:	Krebs-Henseleit-bikarbonát puffer
L-NAME:	N(G)-nitro-L-arginin-metilészter
LV:	bal kamra
LVEF:	bal kamrai ejekciós frakció
LVSWI:	bal kamrai löketmunka-index
MIDCAB:	„minimally invasive direct vision coronary artery bypass surgery”
NADH <sub>2</sub> :	nikotinamid-adenin-dinukleotid

NMR:	magmágneses rezonancia
NO:	nitrogén-monoxid
NOS:	nitrogén-monoxid synthetase
NYHA:	New York Heart Association
PFK:	piruvát-foszfofruktokináz
PVRI:	pulmonalis vascularis rezisztencia-index
PWP:	pulmonalis éknyomás
RIA:	radioimmunoassay
SNP:	nitroprusszid-Na
SWI:	lőketmunka-index
UTP:	uridin-trifoszfát

## I. Bevezetés

Az ischaemiás szívbetegség (ISZB) és ennek következményeként fellépő szövődmények, halálózások a statisztikák vezető helyét foglalják el hazánkban és a fejlett országokban. A jelenlegi terápiás beavatkozások célja, a szív felborult energia szükséglet és ellátás egyensúlyának visszaállítása, illetve ezen eltérés csökkentése. A reperfüzió - energia ellátás - javítása érdekében elvégzett coronaria artéria bypass graft (CABG) operáció során, azonban szintén számolni kell az ischaemiás-reperfüziós károsodások lehetőségével. A műtéti technika fejlesztése - a lehető legrövidebb extracorporalis keringési (ECK) és aorta lefogási (AXC) idő alkalmazása - és új módszerek (MIDCAB, octopus) bevezetése mellett (1), párhuzamosan történnek gyógyszeres beavatkozások a szív hypoxiás-reperfüziós károsodásának csökkentése érdekében. Ezt a célt szolgálják a szív energiaigényét csökkentő gyógyszerek, eljárások ( $\beta$ -adrenerg receptor blokkolók, hideg krisztalloid-vér cardioplegiás oldatok, szisztémás-lokális hypothermia), az energiaellátását fokozó glükóz-inzulin-kálium-infúzió és a szívizomsejtek károsodásában nagy szerepet játszó kalcium (2), valamint oxigén-szabadgyökök mennyiségét és keletkezését csökkentő szerek alkalmazása (3). Az előbbieken felsorolt módszerek bevezetése ellenére, a CABG műtétek során, az ischaemia hatására drámai változások játszódnak le a szívben. Oxigénhiányos környezetben a szív szöveteiben - normoxiás körülmények között - túlsúlyban lévő szabad zsírsav metabolizmus során történő energiaképzés, az anaerob glikolitikus folyamatok irányába terelődik. Az anaerob energiatermelés következtében a piruvát-lebomlás a laktát-keletkezés irányába tolódik el, szemben az aerob glikolízis folyamán keletkező acetyl-CoA termeléssel. A piruvát-laktát-shunt hatására nagyfokú szöveti laktát-felszaporodás, laktacidózis lép fel a sejtekben, melynek eredményeként blokkolódik egy - a glikolízis folyamatában kulcsfontosságú enzimnek - a piruvát-foszfofruktokináznak (PFK) a működése (4, 5), melynek következményeként tovább csökken a sejtek energiakészlete. Ezek a patológiás folyamatok nem képesek fenntartani a sejtek működéséhez szükséges nagy energiataralmú molekulák képzését, mely a sejtek reverzibilis, majd később irreverzibilis károsodásához vezetnek.



A szívet ért hypoxiás károsodásokat jelentősen befolyásolja, a helyreállított keringés során fellépő reperfüziós ártalmak mértéke is (6, 7). A hypoxia folyamán sérült szövet a reperfüzió során elszenvedett további reverzibilis, illetve irreverzibilis károsodások miatt, a funkcionális feladatait nem, vagy csak igen kis mértékben tudja ellátni (8). Az újonnan beültetett erek endothelfunkciójának zavara szintén hozzájárul a reperfüzió következtében fellépő, a mikrocirkuláció szintjén jelentkező „no-reflow” jelenség szövetkárosító hatásához (9), mivel éppen az addig is legnagyobb ischaemiás inzultusnak kitett területeket érinti, ezzel tovább növelve károsodásuk mértékét és kiterjedtségét.

A coronaria artéria bypass graft műtétre kerülő beteg már eredetileg is sérült szív szöveteknek - műtét alatti ischaemiás-reperfüziós - hypoxiás károsodást teljes mértékben kivédeni és elkerülni jelenleg még nem tudjuk. Azonban, az eddig megismert, és az újabb sebészi, konzervatív cardioprotektív eljárások, gyógyszerek alkalmazásával törekednünk kell a szív lehető legjobb „kondícióban” tartására az inzultusok idején, valamint az óhatatlanul fellépő ischaemiás-reperfüziós károsodások mértékének mennyiségi és minőségi csökkentésére.

## I/1. A szívműtétek során alkalmazott cardioprotekció történeti áttekintése

A CABG műtétek során történő vénás és/vagy artériás graftok felhelyezésekor alkalmazott cardioprotekciónak, két fontos cél elérésére kell törekedni. 1, Minél alkalmasabb körülmények megteremtése a sebész számára az éranasztomózisok elkészítésekor. 2, A szív védelme az óhatatlanul fellépő hypoxiás, ischaemiás ártalmaktól és a felszabaduló toxikus anyagcsere termékektől. Ezen kettős kívánalom minél magasabb szintű biztosítása és a célok, néha egymást hátrányosan befolyásoló hatásai közötti ésszerű kompromisszum megtalálása vezette és vezeti a kutatókat, az egyre tökéletesebb cardioprotektív eljárások és gyógyszerek kifejlesztése során.

A CABG műtétet követő optimális myocardialis funkció minél teljesebb regenerációját több tényező befolyásolja. Ezek közé tartozik a beteg preoperatív előkészítése, az alkalmazott anesztézia cardiovascularis hatása, a helyesen megválasztott sebési beavatkozás módja, a műtét és az extracorporális keringés alatti cardioprotekció és a posztoperatív intenzív terápia (10). Különösen nagy jelentőséggel bír az operáció folyamán fellépő ischaemiás-reperfúziós állapotokban alkalmazott cardioprotekció minősége, hatásossága (11).

Az 1950-es évek elején a szívhez áramló vér blokkolásával és az aorta-lefogás kombinált alkalmazásával érték el a szív vértelenségét, ami viszont nem biztosította a szív mozdulatlanságát is az anasztomózisok elkészítése közben. Az agy védelmére mérsékelt hypothermiát tartottak fenn (32 °C). Ez maximum 10 perces operálási időt tett lehetővé a sebészeknek. Az extracorporalis keringés bevezetésével, a nagyobb fokú hypothermia (15 °C) és ezzel kombinált aorta-lefogási technika alkalmazásával, már 1 órás szívmegállást és vértelen operálási területet lehetett biztosítani a sebészek számára (12).

Az 50-es évek végén, a 60-as évek elején Gerbode és Melrose az AXC-t követően 2,5%-os kálium-citrátot fecskendezett a coronariákba, így hozva létre asystoliát. Ebben az időszakban hasonló technikát alkalmazva, de különböző koncentrációjú káliumot, magnéziumot, neostigmint, acetilkolint, prokaint tartalmazó „koktélokat” használtak az elektív asystolia elérésére (13).

Waldhausen (14) által végzett vizsgálatokban azonban kiderült, hogy szoros összefüggés van a kálium-citrát indukálta elektív szívmegállítás és a posztoperatív szakban kialakult myocardialis necrosisok között (15). Ennek következményeként ez az eljárás a 60-as évek közepére kikerült a klinikai gyakorlatból.

A *70-es évek elején* a fent említett kudarok hatására a sebészek a műtétek során megpróbálták a fiziológiás állapotokhoz legjobban közelítő cardioprotektív módszereket alkalmazni. Így terjedtek el a normothermiás körülmények között adott, folyamatos coronaria-perfúziót fenntartó oldatok alkalmazása. Az elektív szívmegállítást a mesterségesen létrehozott kamrafibrillációs technika váltotta fel. Azonban ezek az eljárások sem voltak tökéletesek. Buckberg és Hottenrott (16) vizsgálatai továbbra is a subendocardialis régióban kialakuló necrosisokat mutattak ki, CABG műtétet követően (17).

A *70-es évek végétől* két eljárás kezdett tért hódítani. A sebészek egy része a normothermiás környezetben alkalmazott intermittáló, vagy részleges aorta-leszorítást alkalmazta, még mások ismét visszatértek az 50-es években kezdett hypothermia mellett használt elektív asystoliát alkalmazó technika módosított változatához (18). A módosítás legfőbb eleme a cardioplegiás oldat túlzottan magas kálium tartalmának csökkentése (15-30 mEq/l), a kálium-citrát kiváltása kálium-kloriddal. A cardioplegiás oldat ezen felül kis mennyiségű kalciumot (a reperfúzió okozta kalcium paradox kivédésére), albumint vagy mannitolt (a megfelelő ozmolalitás biztosítására), glükózt, inzulint (energiaképzés) és nitroglicerint (vasodilatátor-hatás) tartalmazott (19).

*Napjainkban* a legelterjedtebb cardioprotektív módszer a szisztémás és lokális hypothermiával (20) kombinált, modern cardioplegiás oldatok használata az AXC-t követően. Ennek a módszernek az alkalmazási módja sem egyértelműen eldöntött, ezért számtalan variáció létezik a cardioplegiás oldatok adagolási technikája szerint. Nem eldöntött, hogy a vér-, vagy kristalloid-cardioplegia használata előnyösebb-e. Az anterográd, vagy retrográd úton való alkalmazás, a hideg, vagy meleg oldat, a folyamatos vagy intermittáló adagolási mód, vagy esetleg ezek kombinációja a legmegfelelőbb és leghatásosabb eljárás a cardioprotekció mind tökéletesebb megvalósítása érdekében (21).

A számtalan lehetséges cardioprotekciós módszerek egyike sem tökéletes. Eredményességük és hatásosságuk nem egyértelműen megnyugtató, ezért az eddigiektől teljesen eltérő szemléletmódú eljárások kifejlesztése és alkalmazása irányába is történnek kutatások. Az ECK használatának szerepe a posztoperatív szakban fellépő myo- és endocardium károsodásokban még nem teljesen ismert és tisztázott, központi szerepe viszont vitathatatlan. Ezen megfontolásból egy új irányvonalat képvisel az extracorporális keringés alkalmazásának elkerülését célzó új sebési technikák bevezetési is (22, 23). Ezek közé tartoznak például, az előre meghatározott kritériumok alapján kiválasztott betegekben elvégzett, MIDCAB és octopus műtéti technikák alkalmazása (24, 25). Azonban ezen sebési eljárások sikeres alkalmazása esetén is szükséges a szív szöveteinek védelme, esetleges károsodásának maximális csökkentése.

A fent ismertetett történeti áttekintés is azt bizonyítja, hogy egyelőre nincs ideális megoldás és teljesen megbízható cardioprotektív eljárás, mely teljesen kivédné a szív ischaemia-reperfúzió okozta károsodását. Ezért nagyon fontos újabb eljárások, cardioprotektív és adjuváns szerek megismerése és alkalmazása. Ezek a kutatások szükségessé teszik a szívben fiziológiásan lezajló és a patológias körülmények hatására bekövetkező, megváltozott anyagcsere folyamatok és ezek összefüggéseinek ismeretét.

## 1/2. A szívizom anyagcseréjének sajátosságai normoxiás, hypoxiás és ischaemiás környezetben.

A szív többféle szubsztrátot képes felhasználni energiaképzése során. A telítetlen zsírsavak, glükóz, laktát, ketontestek - különösen az acetoacetát - és aminosavak, mind szerepet játszhatnak a myokardium nagyenergiájú molekuláinak - adenozin-trifoszfát (ATP), kreatin-foszfát (CP) - képzésében. Az energia biztosítás folyamata a jelenlévő szubsztrátok mennyiségétől, a folyamatban résztvevő enzimek szintjétől és az oxigén jelenlététől függ.

*Normoxiás* körülmények között a szív energiaképzésének 70%-át a nem észterifikált szabad zsírsavak elégetéséből fedezi. A folyamat során keletkező magas ATP-szint gátolja a PFK enzim működését, mely a glikolitikus folyamatok sebességének csökkenését eredményezi. A glikolízis energiatermelő hatása, csak 25-30%-ban járul hozzá a szív ATP, CP termeléséhez. Az aminosav, laktát és ketontest felhasználás elenyésző normoxiás környezetben. Magas laktátszinttel járó állapotokban - megerőltető izommunka, szépszis - viszont a laktát elsődleges szubsztrátként szerepel az energiaképzésben. Hasonló energiabi biztosító szerepet játszik a diabeteszes acidózisban a jól oxidálódó acetoacetát is (26).

Oxigénhiányos környezet felleptekor drasztikusan megváltozik a szív anyagcseréje. Éles különbséget kell tenni a hypoxiában és ischaemiában történő anyagcseré-folyamatok között (1. ábra).

*Hypoxia* során a vér oxigéntartalma alacsony, viszont a coronaria-keringés még megtartott. A szabad zsírsavakból történő ATP- és CP-képzés drasztikusan lecsökken (27). Ezen csökkenés következtében felszaporodó adenozin-monofoszfát (AMP), adenozin-difoszfát (ADP) és foszfát-szint emelkedés a PFK enzim stimulálásán keresztül serkentőleg hat a glükózból történő energiatermelésre, így a szabad zsírsav katabolizmussal szemben az anaerob glikolitikus folyamatok fokozódása figyelhető meg. Ezt a jelenséget Pasteur-hatásnak nevezzük. Hypoxiában a fő és elsődleges szubsztrát a glükóz lesz. Ennek érdekében és eredményeként a glikogén lebomlása és a sejtek glükózfelvétele is közel tízszeresére nő.



Ugyanakkor ez az anaerob glikolízis az oxigénhiány miatt, már nem képes olyan jó hatásfokkal működni, mint az aerob folyamatok, így az ATP-képzés nagymértékben csökken, mintegy 5-7%-a lesz a jól oxigenizált szívizom energiaképzésének. Míg aerob körülmények között egy glükózmolekula elégetése során 36 ATP-molekula képződik, addig anaerob körülmények között csak 2 ATP keletkezik (28).

*Ischaemiában* a coronaria-keringés gátoltsága miatt nem csak a sejtekhez jutó szubsztrát és oxigénellátás csökken, hanem zavart szenved az anaerob metabolizmus során keletkezett toxikus anyagok elszállítása is (29). Ennek következményeként az ATP-, CP-szint csökkenése mellett, a laktát, hidrogénion, nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH<sub>2</sub>) és egyéb toxikus metabolitok felszaporodása is megfigyelhető. Ezen molekulák felszaporodása gátolja a glikolízis folyamatában kulcsszerepet betöltő PFK enzim működését (30), mely a sejtek energiaképzésének további károsodásához, majd irreverzibilis sejtpusztuláshoz vezet (31).



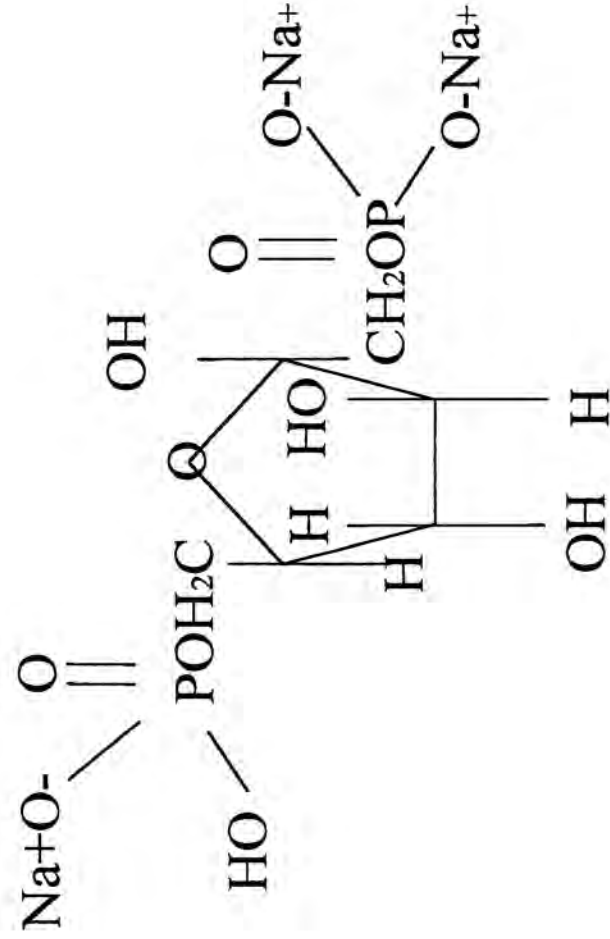
### I/3. Az ischaemia-reperfúzió hatása a szív purin- és pirimidin-metabolizmusára

Ischaemia és az ezt követő reperfúzió során a hypoxiára rendkívül érzékenyen reagáló szívszövetekben drasztikus metabolikus változások zajlanak le. A hypoxiás környezetbe kerülő myocardium- és endothelsejtekben rövid időn belül megindul a nagy energia tartalmú molekulák (ATP, UTP, CP) lebomlása, mely nukleotid degradációs termékek (ADP, AMP, adenozin, hipoxantin, inozin, uridin stb.) megjelenéséhez, felszaporodásához vezetnek intracellulárisan (32). Ezt a tényt az is alátámasztja, hogy normoxiás környezetben, a sejtekben az AMP-nél 5000-szer nagyobb mennyiségben megtalálható ATP mennyisége hypoxia hatására rohamosan csökkeni kezd (33), eközben az AMP és a nukleotid-metabolitok mennyisége többszörösére emelkedik (Deussen és mtsai 1988, Smolenski és mtsai 1991, - 34, 35). Ezek a metabolitok képesek áthatolni a sejtmembránokon és közvetlenül - a mikrocirkuláción keresztül - a sinus coronariusba jutnak (Parker és mtsai 1976). A fennálló hypoxia időtartalmával és kiterjedtségével egyenes arányban mind több és több nukleotid degradációs termék szaporodik fel a sejtekben és így a szív mikrocirkuláris rendszerében is (36). A hypoxia megszűnte után, oxigén jelenlétében az épen maradt sejtekben a lebomláshoz hasonló gyorsasággal megindul ismét az ATP újraképzése, és a degradációs termékek mennyiségi csökkenése. Elemezve a sinus coronariusban megjelenő purin-, pirimidin-metabolitok mennyiségi, minőségi összetételét és ezek változásának dinamikáját, fontos felvilágosítást nyerhetünk a sejteket ért hypoxiás inzultus következtében kialakuló károsodások és a meginduló regenerációs folyamatok mértékéről, kinetikájáról (37).



#### 1/4. A fruktóz-1,6-difoszfát (FDF) cytoprotektív hatásának elméleti háttere

Az FDF egy, a glikolitikus folyamatokban szerepet játszó intermedier hexóz, mely az emberi szervezetben egyébként is megtalálható természetes anyag. Szerkezeti képlete: trinátrium-fruktóz-1,6-difoszfát-oktahidrárt,  $C_6H_{11}O_{12}P_2Na_3 \cdot 8 H_2O$  (2. ábra).

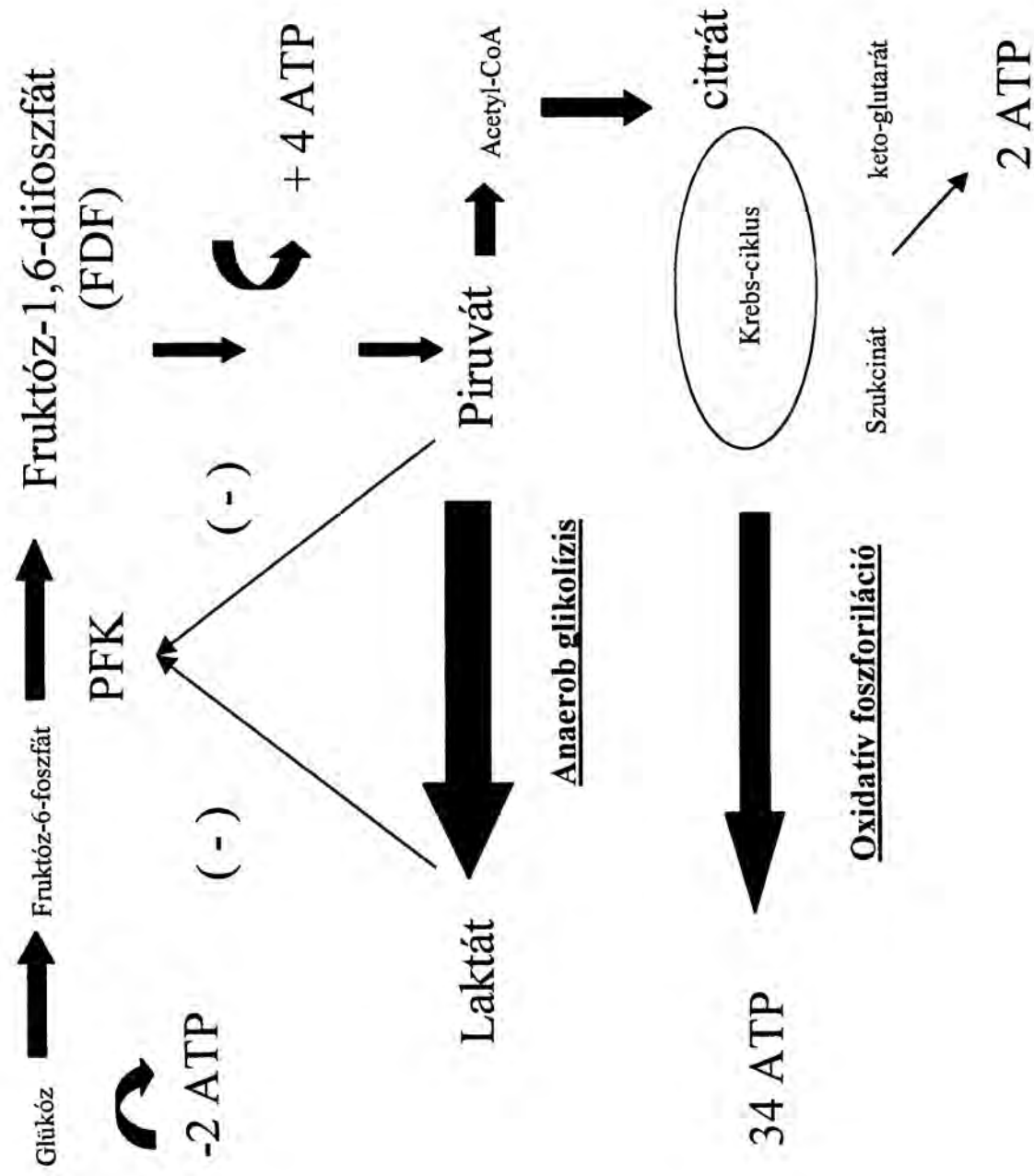


tri-nátrium-fruktóz-1,6-difoszfát oktahidrárt

2. ábra: Az FDF szerkezeti képlete

Az FDF jellemző tulajdonsága, hogy a glikolízisben szereplő kulcsfontosságú PFK enzimet megkerülve, be tud lépni az energiatermelő folyamatokba és ischaemiás környezetben képes a glikolízis reaktiválására (38, 39), ezzel biztosítva többletenergát a hypoxiás környezetbe került sejtek számára (3. ábra). Egyetlen FDF molekula, anaerob környezetben történő elégetésekor 4 ATP molekula keletkezik, míg a glükóz anaerob lebomlásából csak 2 ATP molekula származik. További előnyei a glükózzal szemben, hogy az anaerob glikolízisben betöltött szerepe inzulintól független és mivel a laktacidózis miatt gátolt PFK enzimreakció után lép be a glikolízis folyamatába, hatásosságát az ischaemia súlyossága és a laktát szöveti felszaporodása nem befolyásolja (40).

Az FDF rendelkezik továbbá egyéb olyan hatásokkal is, melyek szerepet játszhatnak az ischaemia-reperfúzió következtében fellépő microvascularis károsodások csökkentésében (41, 42). Az irodalmi adatok szerint hypoxiás környezetben csökkenti a sejtek kalciumfelvételét, emeli a szarkoplazmatikus retikulumba történő ATP-igényes kalcium-szekvesztrációt, így csökkentve a megnövekedett intracelluláris kalciumszint okozta sejtkárosodást (43, 44). Gátolja a szabadgyök képződést a polymorf magvú neutrophil leukocyta sejtekben (45), gyengíti a neutrophil granulocyták endothelelhez való kitapadását (46) és gátolja a hízósejtekből való hisztamin felszabadulást (47).



3. ábra: Az aerob és anaerob glikolízis folyamata.

Az elméleti feltevésekkel szemben, miszerint egy kívülről bevitt, difoszforilált cukor molekula nem képes áthatolni a sejtmembránokon, az elvégzett kísérletekkel ennek ellenkezőjét bizonyították.

1. Exogén adott,  $^{14}\text{C}$ -vel jelzett FDF  $\text{CO}_2$  és laktát keletkezésével járó metabolizmusa zajlott le normál patkány myocardium sejtekben - Tavazzi, 1992 (48).
2. Előzőleg hypoxiás és normoxiás környezetben,  $^{13}\text{C}$ -vel jelzett FDF (2,1 mM) kezelt humán arteria carotis szegmentekben  $^{13}\text{C}$ -laktát volt kimutatható  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroszkópiával - Hardin, 1994 (49).
3. Exogén adott FDF kimutatása humán glia-sejtekből - Gregory, 1989 (50).
4. Előzőleg hypoxiás és normoxiás környezetben exogén adott,  $\text{P}^{31}$ -el jelzett FDF (350 mg/kg) kimutatása izolált veséből állatkísérletes modellekben,  $\text{P}^{31}$ -NMR-spektroszkópiával - Shapiro, 1987 (51).

Az előzetes állatkísérletek és humán klinikai vizsgálatok az FDF további jellegzetességeit tárták fel.

Állatkísérletekben az ischaemiás myocardiumban növelte az ATP- és CP-mennyiséget (52). Vörösvértestekben emelte a 2,3-DPG- és ATP-szintet, javította a vvt-k funkcionális működését, csökkentette a vér viszkozitását (53). Gátolta a szuperoxidok felszabadulását a polymorf magvú neutrophil leukocytákban (45). Gyengítette az amfotericin indukálta lipid-peroxidációt (54). Reperfúzióban csökkentette a leukocytá kitapadást az endotel sejtekhez (46).

Humán klinikai vizsgálatokban az acut myocardialis infarctusos betegekben csökkentette az ST-segmen- elevációt (55, 56), a ritmuszavarok előfordulását, az infarctus nagyságának kiterjedését (57), emelte a szívindex (CI) és a bal kamrai löketmunka-index (LVSWI) mértékét. ISZB-ben szenvedő betegeknel echokardiográfiával igazolták a szív kontraktilitás, CI, löketmunka-index (SWI) növekedését (58). NYHA II-III klasszifikációba tartozó betegekben, szignifikánsan emelte a bal kamra ejekciós frakcióját (LVEF, 59, 60). ARDS-ben szenvedő, FDF-vel kezelt betegekben szignifikánsan csökkent az arteria pulmonalis éknyomás (PWP), a pulmonalis vascularis rezisztencia-index (PVRJ) és a mortalitási ráta (61).

## 1/5. Vizsgálataink célkitűzései

Ischaemiás körülmények hatására, a szívben fellepő, megváltozott anyagcsere folyamatok során, az anaerob glikolízis – elsősorban a PFK enzim gátlása következtében - 5-7%-os határfokban működik. Ennek hatására a sejtek rendelkezésére álló ATP- és CP- szint drasztikus csökkenése figyelhető meg. Ismerve az FDF glikolízisben elfoglalt helyét és az irodalomból megismert hatásait, logikailag megalapozottnak látszott klinikai alkalmazása az ischaemiás környezetnek kitett szívre kifejtett cardioprotektív hatásának megfigyelése céljából.

A *klinikai vizsgálataink* elsődleges célja a CABG műtéten átesett, különböző adagolással és dózisban FDF-t kapott betegek felépülésének és cardiovascularis státuszának nyomon követése volt, mellyel az FDF feltételezett cardioprotektív hatásosságát kívántuk összehasonlítani, az 5%-os dextrózt kapott kontrollcsoporttal.

Az FDF-ről eddig megjelent tanulmányok, az FDF hypoxiás körülmények között, a sejt energiatermelő folyamatában betöltött reaktíváló szerepét hangsúlyozták és helyezték előtérbe, a hatásmechanizmus magyarázataként. Ezen megállapítás ellenőrzése céljából, a klinikai vizsgálatokba bevont betegek egy csoportjánál a sinus coronariusából és arteria radialisából nyert vérmintákban lévő *nukleotid degradációs termékek* mennyiségének és kinetikai változásának *meghatározását* végeztük el. Az eredmények kiértékeléséből választ vártunk az FDF-nek a szív szöveteiben lezajló ATP-, UTP-képzésre kifejtett hatására vonatkozólag.

A klinikai vizsgálat eredményeinek elemzéséből kiderült, hogy kombinációban - intravénásan és cardioplegiás oldatban - adva az FDF-nek kifejezett kedvező hatása van az 5%-os dextrózzal összehasonlítva. Ezzel szemben viszont a csak intravénásan, vagy csak cardioplegiában alkalmazott FDF nem mutatott egyértelmű előnyös hatásokat.

További meglepő eredmény volt, hogy abban a klinikai csoportban, ahol az FDF pozitív hatása szignifikánsan jelentkezett, kedvező eredményeket különösen a hemodinamikai paraméterek mutattak a 6-12-18 órás időintervallumokban.



Feltételeztük, hogy a klinikai vizsgálatok során tapasztalt kedvező hemodinamikai hatásokat az FDF két egymástól független úton váltotta ki. Az egyik a már ismert gyorshatású, extra ATP-t biztosító metabolikus út, a másik a vasculatúrán jelentkező, hosszabb időt igénybe vevő, eddig nem ismert regulációs út. Ezen utóbbi hipotézis vizsgálata érdekében állítottuk fel az *in vitro* *humán érgyűrű modellünket*, melyben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az FDF szerepet játszik-e a direkt vasoreguláció folyamatában, és ha igen akkor milyen kapcsolat áll fenn a vasoregulációban központi helyet elfoglaló NO-cGMP rendszer, az endothelsejtek és az FDF között.

Az érgyűrű kísérletekkel párhuzamosan, az FDF klinikumban talált vasoregulációban betöltött szerepének megismerése után (62), vizsgáltuk az FDF coronaria endothelsejtekre és ezek funkciójára kifejtett közvetlen hatását is. Mivel a *humán in vivo* mérések elvégzése komoly nehézségekkel és a CABG operációra kerülő betegre nézve fokozott kockázattal járt volna, ezért *in vitro állatkísérletes modellt* állítottunk fel, ezen vizsgálatok elvégzése céljából.

A *humán érfiziológiai* és *állatkísérletes vizsgálataink* elvégzésével az volt a *célunk*, hogy magyarázatot találjunk a következő felmerülő problémákra:

1. A klinikai vizsgálatok során az FDF miért nem mutatott olyan egyértelmű kedvező előnyöket az 5%-os dextrózzal szemben, melyek az eddig ismert irodalmi adatokra alapozva várhatóak lettek volna?
2. Van-e az FDF-nek egy eddig még nem ismert hatásmechanizmusa, amelyet a klinikai vizsgálatok felállításánál nem vettünk figyelembe?
3. Szükséges-e a klinikai vizsgálatok sémájának megváltoztatása?

A dolgozat a fent említett vizsgálatok részletes leírását és ezek eredményeinek kiértékelését mutatja be. A kísérleteket a londoni Royal Brompton & Harefield NHS Trust Hospital Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézetében, az Imperial College of Science, Heart Science Center, London, Gyógyszertani és Vascularis Biológiai Intézetében, a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kísérletes Sebészeti Intézetében, a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézetében és a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrumában végeztük.

## II. Beteganyag, kísérletes modellek és módszerek

### II/1. FDF hatásának vizsgálata szívsebészeti betegeken

#### II/1.1. Betegcsoportok

Vizsgálataink a helyi Etikai Bizottság (Hillingdon Health Authority, Yiewsley, Middlesex, London, UK) jóváhagyásával, a Helsinkai deklarációk betartásával, a Medicines Control Agency (UK) és a Food and Drugs Administration (USA) engedélyével, a Royal Brompton & Harefield Hospitalban (Middlesex, London, UK) történt. A vizsgálatot kettős vak, placebo-kontrollált, 1:1 randomizált formában végeztük. Placeboként 5%-os dextróz oldatot alkalmaztunk.

#### *Beválasztási kritériumok:*

- elektív CABG műtét
- a bal kamra ejekciós frakciója (LVEF) > 45%
- legalább két operábilis coronaria-laesio
- a műtét során tervezett St. Thomas Hospital krisztalloid cardioplegia alkalmazása (összetétele: magnézium klorid, kálium klorid, procain hidroklorid, nátrium edta, nátrium hidroxid, nátrium klorid).

#### *Kizárási kritériumok:*

- preoperative alkalmazott inotrop-terápia
- akut, instabil állapot, vagy reoperáció
- szimultán végrehajtott billentyűműtét
- inzulin-dependens diabetes mellitus
- az anamnézisben szereplő súlyos vesebetegség
- fruktóztolerancia, vagy ennek esetleges gyanúja.

A vizsgálat V betegcsoportot ölelt fel, ezen belül az V. csoport további két alcsoportra (V/A, V/B) oszlott. A vizsgálatokba bevont betegek összlétszáma 120 fő (1. táblázat).

*I csoport:* betegszám: 20.

125 mg/ttkg FDF (10 beteg), vagy 5% dextróz (10 beteg) intravénás adása 30 perc alatt, közvetlenül az extracorporális keringés elindítása előtt.

*II csoport:* betegszám: 20.

250 mg/ttkg FDF (10 beteg), vagy 5% dextróz (10 beteg) intravénás adása 30 perc alatt, közvetlenül az extracorporális keringés elindítása előtt.

*III csoport:* betegszám: 20.

2,5 mM FDF-t (10 beteg), vagy 5% dextróz-t (1,4 g/l) tartalmazó (10 beteg), anterograde adott, lehűtött (4-10 °C) St. Thomas krisztalloid cardioplegia alkalmazása.

*IV csoport:* betegszám: 30.

250 mg/ttkg FDF (15 beteg), vagy 5% dextróz (15 beteg) intravénás adása 30 perc alatt, közvetlenül az ECK elindítása előtt, majd 2,5 mM FDF-t vagy 5% dextróz-t tartalmazó, anterograde adott, lehűtött (4-10 °C) St. Thomas krisztalloid cardioplegia alkalmazása.

*V/A csoport:* betegszám: 12.

250 mg/ttkg FDF (9 beteg), vagy 5% dextróz (9 beteg) intravénás adása 30 perc alatt, közvetlenül az ECK előtt, majd további két alkalommal (2 és 6 órával az ECK befejezése után) újabb 250 mg/ttkg FDF, vagy 5% dextróz infundálása 30 perc alatt.

*V/B csoport:* betegszám: 18.

Az V/A csoporttal megegyező protokoll, csak a 2. és 3. alkalommal adott FDF vagy 5% dextróz dózisait csökkentettük 125 mg/ttkg-ra.



Csoport	FDF	Betegszám	5% dextróz	Betegszám
<b>I.</b>	125 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt	10	125 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt	10
<b>II.</b>	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt	10	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt	10
<b>III.</b>	2,5 mM (1,4 g/l) cardioplegiás oldatban	10	2,5 mM (1,4 g/l) cardioplegiás oldatban	10
<b>IV.</b>	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt + 2,5 mM (1,4 g/l) cardioplegiás oldatban	15	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt + 2,5 mM (1,4 g/l) cardioplegiás oldatban	15
<b>V/A.</b>	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt + 2 x 250 mg/ttkg iv. 30 perc alatt, 2 és 6 órával az ECK után	6	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt + 2 x 250 mg/ttkg iv. 30 perc alatt, 2 és 6 órával az ECK után	6
<b>V/B.</b>	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt + 2 x 125 mg/ttkg iv. 30 perc alatt, 2 és 6 órával az ECK után	9	250 mg/ttkg iv. 30 perccel az ECK előtt + 2 x 125 mg/ttkg iv. 30 perc alatt, 2 és 6 órával az ECK után	9

1. táblázat

A vizsgálatba bevont betegek standardizált anesztéziában és azonos myocardium-protectív eljárásban részesültek. A vizsgált összes csoportban az ISZB jellegzetességéből adódóan, a férfiak dominanciája érvényesült. Az ECK (aktív: 91,47 ± 10 perc, placebo: 93,53 ± 9 perc), az AXC - idő (aktív: 54,60 ± 6 perc, placebo: 49,46 ± 7 perc) és az életkorátlag (aktív: 56,8 ± 4 év, placebo: 60,6 ± 6 év) szignifikáns statisztikai különbséget nem mutatott a placebo és az FDF-csoport között (átlag ± SD).

#### *Standardizált anesztézia :*

- Premedikáció: temazepam 20 mg po., morfin 10 mg im., promethazin 12,5 mg im., 40% oxigén maszkon keresztül a premedikációt követően.
- Indukció: fentanyl 8-10 µg/ttkg, etomidat 15-20 mg, pancuronium 1 mg/ttkg
- Az anesztézia fenntartása az ECK előtt isofluran/nitrogénoxidul/oxigén megfelelő koncentrációjú adagolásával történt.
- A CPB során az anesztéziát isofluran/propofol-infúzió (3 mg/ttkg/óra) használatával tartottuk fent.
- A „felmelegítés” megkezdésekor 2,5-5,0 mg bólus midazolamot, 2-4 mg pancuroniumot és 2 g MgSO<sub>4</sub>-t adtunk.
- Vasodilatatorként gliceril-trinitrátot alkalmaztunk.
- Rutin eljárásként nem indítottunk inotrop-támogatást az ECK befejezését követően, de ha szükségessé vált első lépésként dopamint, majd ennek eredménytelensége esetén második szerként, adrenalin-infúziót használtunk.

#### *Myocardium-protectív eljárások:*

- Hypothermia: szisztémásan (28-32 °C), lokálisan (10 °C).
- Cardioplegia: előre lehűtött (4-10 °C), krisztalloid St. Thomas, anterograd adagolva.
- FDF vagy 5% dextróz (placebo).

## II/1.2. A funkcionális és laboratóriumi paraméterek monitorozása

Az operációt megelőzően 6 órával, kételvezetéses *Holter-EKG*-monitort helyeztünk fel a műtétet követő 72 óráig. A *Holter-EKG* elemzésekor a posztoperatív, szignifikáns ST eltérések ( $> 1$  mm depresszió,  $> 2$  mm eleváció 0,06 ms a J ponttól mérve, több mint 60 s-ig), ritmuszavarok, blokkok és az esetleg újonnan kialakuló infarctus előfordulási gyakoriságát hasonlítottuk össze az FDF-t kapott és a placebo-csoport között.

A bealtató helyiségben, még az anesztetikumok adása előtt, az arteria radialisból vért vettünk *laboranalízise* (ionok, CK, CK-MB, vese-májfunkció, quantitatív és kvalitatív vérkép, vérérg, vércukor, vizelet és üledék vizsgálat) és ezen értékeket használtuk alapértékként. A laborparaméterek ellenőrzésére 24, 48, majd 72 óra múlva került ismét sor.

A CK, CK-MB vizsgálatra küldött vérek levételének időpontjai:

- alapérték (az indukciót megelőzően)
- az AXC felengedésekor azonnal
- majd ezt követően 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 óra múlva.

Az indukciót követően a jobb oldali vena jugularis internán keresztül, 4 lumenű Swan-Ganz-katétert vezetünk be, a *hemodinamikai mérések* elvégzése céljából. A cardiac output (CO) meghatározására termodilúciós módszert használtunk, három egymást követő mérés átlagát vettük figyelembe. Erre a célra hideg ( $4^{\circ}\text{C}$ ), 10 ml bólusban adott fiziológias sóoldatot alkalmaztunk. A mérések elvégzése közben a gépilélegeztetést megszakítottuk.

A *haemodinamikai mérések* időpontjai:

- közvetlen az indukciót követően a Swan-Ganz katéter bevezetése után, még a bőrmetszés megtörténte előtt, ez az eredmény szolgált alapértékként
- az aorta kanulálása előtt közvetlenül
- az ECK-t követően 1, 2, 4, 6, 12, 18 órában.

További adatként vettük figyelembe az ECK-t követő *inotrop* szerek alkalmazásának szükségessége és mennyisége.

Az FDF alkalmazása során esetleg jelentkező acidózis *monitorozására* vérgázanalízis szolgált az ECK-t követően minden 30. percben az első posztoperatív napon, majd ezt követően minden nap, a posztoperatív 5. napig.

## II/1.3. A szív nukleotid metabolizmusának vizsgálata

### II/1.3.1. Anyag és módszer

Vizsgálatunk a helyi Etikai Bizottság (Hillingdon Health Authority, Yiewsley, Middlesex, London, UK) jóváhagyásával, a Helsinkai deklarátumok betartásával, a Medicines Control Agency (UK) és a Food and Drugs Administration (USA) engedélyével, a Royal Brompton & Harefield Hospitalban (Middlesex, London, UK) történt. 26 beteg CABG műtete során a szív-tüdő extracorporalis pumpa artériás szarából és a sinus coronariusból vettünk 1 ml vért - a műtét folyamán előre behelyezett katéter segítségével - különböző időintervallumokban.

A műanyag csövekbe levett vérmintákat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os folyékony nitrogénbe tettük és ebben tároltuk.

A betegeket 2 csoportba soroltuk az FDF alkalmazási módja szerint.

1. 8 beteg az extracorporalis keringés elindítása előtt, egy órán belül,  $250\text{ mg/ttkg}$  FDF-t kapott intravénásan 30 perc alatt, még a kontrollcsoportba tartozó 8 beteg ugyanilyen dózisban és időintervallum alatt 5% dextróz kezelésben részesült.
2. 5 betegnél a műtét során  $2,5\text{ mM FDF-t}$  ( $1,4\text{ g/l}$ ) tartalmazó, anterograd adott, lehűtött ( $4-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) St. Thomas krisztalloid cardioplegiát alkalmaztunk, még a további 5 kontrollbeteg 5% dextrózt ( $1,4\text{ g/l}$ ) tartalmazó cardioplegiás kezelésben részesült.

A mintavételek időpontjai:

- közvetlenül a sinus coronarius katéter behelyezése után, még az AXC előtt (alapérték)
- az ACX felengedését követően azonnal (0 perc), majd ezt követően 1, 5, 10, 30 perc múlva.



A kiválasztott betegek azonos anesztéziában, myocardium-protektiv eljárásokban (lokális és generalizált hypothermia, 4 °C hőmérsékletű St. Thomas - anterograd alkalmazott - cardioplegia) részesültek.

A folyékony nitrogénből kivett vérmintákhoz - a nagy molekulású fehérjék elválasztása érdekében - 1 ml 1,3 M perklórsavat adtunk, folyamatos felolvasztás és rázókeverés közben. Ezt követően a csöveket szárazjégbe tettük, majd előre 0 °C-ra lehűtött centrifugával 11000 g fordulaton 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót átpipettáztuk és 0,3 ml 2 M-os kálium-hidroxiddal neutralizáltuk. Ezt a lépést újabb centrifugálás követte (11000 g, 5 perc, 0 °C). Az így kapott második felülúszót a Smolenski (32) által leírt, módosított „high performance liquid chromatographias” technikával (HPLC) analizáltuk.

Az HPLC során Merck-Hitachi LiChrograph 6200-as pumpát és Merck-Hitachi LiChrograph L-4000 variábilis UV detektort használtunk. Az analizáló oszlop ODS Hypersillel, az injektor és az analitikus oszlop között elhelyezkedő „védő” oszlop Spherisorb ODS2-vel volt feltöltve. Az egyik pufferrendszerünk (puffer A) összetevője 150 mM-os kálium-dihidrogén-orthofoszfát-oldat volt, mely 150 mM kálium-kloridot tartalmazott. A szükséges pH 6,0-t megfelelő mennyiségű kálium-hidroxid hozzáadásával biztosítottuk. A másik puffer rendszer (puffer B) az előző „puffer A” rendszer 15 %-os acetonitril-oldatát tartalmazta. A puffer B rendszer lineáris koncentráció - változásait előre elkészített komputer program vezérelte. A re-ekvilibrációs idő 5 perc, az áramlási ráta 0,9 ml/perc, az analizáló oszlop konstans hőmérséklete 20 °C volt. Az abszorpciós analízis 254 nm-n történt.

## II/2. Az FDF coronariákra kifejtett direkt hatásának vizsgálata in vitro patkányszív-modelleken

### II/2.1. Anyag és módszer

Kísérleteinket a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kísérletes Sebészeti Intézetében és a londoni Royal Brompton & Harefield Hospitalban a „Home Office Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedure) Act 1986, London” szabályainak és iránymutatásainak betartásával végeztük. Vizsgálatainkban Langendorff által leírt, izolált, patkányszívmodellt használtunk (63). Erre a célra felnőtt, 300–450 g súlyú, hímnemű Sprague-Dawley patkányokat alkalmaztunk. Az ischaemiás kondíció kiváltására a szívpreparátumokat 4 órán keresztül, 4 °C-os St. Thomas krisztalloid cardioplegiával áramoltattuk át.

Az FDF-t kétféle formában alkalmaztuk, mely egyben a csoportbeosztásnak is megfelelt.

1. Az FDF-t az ischaemiát megelőzően, normál (37 °C) hőmérsékleten, 250 mg/ttkg összdózisban, intravénásan adtuk 15 percig a patkány elaltatása után. Ezt követően a Langedorff átáramoltató folyadékhoz adva - és így 2,5 mM végső FDF koncentrációt elérve - alkalmaztuk. Kontrollként, hasonló adagolási sémában 5%-os dextrózoldatot használtunk. A vizsgálatba bevont patkányok száma 20 volt (10 FDF, 10 kontroll).
2. Ischaemiás, hypothermiás (4 °C) körülmények között, St. Thomas cardioplegiás oldathoz adott - 2,5 mM végső koncentrációjú - FDF-t alkalmaztunk. Kontrollként, hasonló adagolási sémában 5%-os dextrózoldatot használtunk. A vizsgálatba bevont patkányok száma 16 volt (8 FDF, 8 kontroll).

A patkányok altatását követően, a vena femoralist megkanuláltuk az intravénás FDF adása céljából. 15 perc elteltével 200 NE heparint adtunk intravénásan. 2 perc elteltével a szívet eltávolítottuk és lehűtöttük, majd az aorta kanulálását követően folyamatosan Krebs-Henseleit bikarbonát-pufferral (Krebs & Henseleit, 1932) perfundáltuk. A perfúziós folyadékot - melynek összetétele: NaCl 118,5, NaHCO<sub>3</sub> 25,0, KCl 4,8, MgSO<sub>4</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,4, glükóz 11,0 mmol/l - folyamatosan 95% O<sub>2</sub> és 5% CO<sub>2</sub> gázzal áramoltattuk át a megfelelő pH 7,4 és oxigenizáció fenntartása érdekében. A KH-folyadék hőmérséklete 37 °C, a hidrosztatikus nyomása 100 vízcmm volt. A közvetlen coronaria-áramlás mérésére, elektromágneses áramlásmérő szondát helyeztünk be proximálisan az aortától (ECM2, Skalar, Delft, Hollandia), mely kompatibilis áramlásmérőhöz kapcsolódott (MDL 1401, Skalar, Delft, Hollandia).

Vizsgálatainkban a provokált ischaemiát követő coronaria-áramlás tendenciáját, és a csúcsáramlás nagyságát regisztráltuk. Az ischaemiát követő coronaria endothel-funkció minőségére az 5-hidroxi-triptamin (5-HT) - endothelfüggő vasodilatátor - által kiváltott coronaria-áramlás-változás mértékéből következtettünk (64). Az ischaemiát követő coronaria-simaizomsejt funkció megítélésére a glicerin-trinitrát (GTN) - endotheltől független vasodilatátor - coronaria-áramlást befolyásoló hatásából nyertünk információkat (Mankad és mtsai 1991, Amrani és mtsai 1992).

A kísérlet befejező lépéseként, ismervé az NO vasoregulációban betöltött szerepét, a coronariákon átáramló folyadék nitrit/nitrát mennyiségének meghatározását végeztük el, melyből közvetett módon a coronaria-vasodilatáció mértékére kaptunk felvilágosítást.



### IV/2.1.1. A kísérletek leírása

Az első coronaria-áramlásérték regisztrálása 15 perces stabilizálódási idő után történt. Ezt követően a KH-oldat perfundálását átváltottuk  $10^{-5}$  M-os 5-HT tartalmazó oldatra. A 5-HT oldat hatására elért csúcsáramlás értékét regisztráltuk, majd visszakapcsolva a perfúziót az eredeti KH-oldatra a coronariákat átmostuk. Újabb 10 perc elteltével váltottunk a 15 mg/l GTN-t tartalmazó oldat infundálására, majd regisztráltuk a kialakuló áramlás és csúcsáramlás értékeket. Ezek után ismételt KH-oldattal kimostuk a GTN-t tartalmazó folyadékot. Az áramlás stabilizálódása után a szívet hideg ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) St. Thomas cardioplegiás oldattal kezeltük és az így elért cardioplegiás állapotot 4 órán keresztül tartottuk fent.

Az ischaemiás periódus lejártával a cardioplegiás oldatot  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os KH-oldattal mostuk ki, minimum 15 percen keresztül. Ezt követően a postschaemiás alapáramlás értékeinek regisztrálása után, az előbbieken már leírt, preischaemiás mérőszorozatok ismételtük meg 5-HT, GTN, KH váltakozó alkalmazásával. Az artéria pulmonalisokból visszanyert folyadékot különböző időintervallumokban (pre- és postschaemiás alapérték, postschaemiás hyperaemiás fázis) csövekbe gyűjtöttük, majd gyorsfagyasztást követően  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, a későbbiekben elvégzett kemilumineszcenciás, indirekt NO-tartalom meghatározása céljából (6.5).

A kemilumineszcencia során, az artéria pulmonalisokból visszanyert folyadékokban lévő nitrit/nitrát mennyiség savas környezetben létrejövő, kémiai redukcióját követően keletkezett NO mennyiség mérését végeztük el (66). Erre a célra egy nagy szenzitivitású kemilumineszcenciás nitrogén monoxid analízátort használtunk (Sievers model 270, CO, USA). A mérési tartomány érzékenysége  $10^{-1000}$  pmol volt. Kontrollként ismert koncentrációjú nátrium-nitrit hígítási sorozatát alkalmaztuk. A mérések elkezdése előtt a rendszert, a szenzitivitását növelő  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  hőmérsékletre felmelegítettük. A mintákat 30 perces szobahőmérsékleten történt felolvasztást követően,  $100\text{ }\mu\text{l}$  mennyiségben injektáltuk a redukáló folyadékba, amelyen keresztül - a keletkezett NO gáz stabilan tartása céljából - folyamatos nitrogén átáramoltatást alkalmaztunk.

A redukáló folyadék 1 mmol/l HCL-ban oldott, 100 mmol/l koncentrációjú vanádium kloridot (redukáló ágens) tartalmazott. A keletkezett gázt 1 mol/l NaOH-t tartalmazó folyadékon áramoltattuk át, az analizátor működését veszélyeztető savas közeg eltávolítása céljából. A folyamat befejező lépéseként, az analizáló rendszer által biztosított ózón hatására a NO-ból aktivált állapotú N<sub>2</sub>O keletkezett, mely az ismételt alapállapotba kerülés során a kemilumineszcenciás detektor rendszer által érzékelt fotont bocsátott ki.

### II/3. Izolt vena saphena érgyűrűk reakcióinak vizsgálata in vitro modellkísérletekben

#### II/3.1. Anyag és módszer

Kísérleteinket a Imperial College of Science, Heart Science Center, London, Gyógyszertani és Vascularis Biológiai Intézetében, a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézetében és a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrumában végeztük.

Az Etikai Bizottság (Hillingdon Health Authority, Yiewsley, Middlesex, London, UK) által engedélyezett és jóváhagyott kísérleteinkben, CABG műtétek során kipreparált, 5-8 cm hosszúságú vena saphena darabokból készített érgyűrűket vizsgáltunk. A hat vizsgálatssorozatunkban összesen 74 beteg vena saphenájából nyertünk érgyűrűket.

A kísérletekben azon betegek érgyűrűit használtuk, akik közel azonos preoperatív gyógyszerelésben, anesztéziában részesültek és nem voltak bevonva az FDF klinikai vizsgálatokba. Kizáró okok voltak az anamnézisben szereplő diabetes mellitus, a coronaria-betegség kivül más egyéb fennálló érbetegség, súlyosfokú hipertónia, obesitas. A nő és férfi arány közel azonos volt és az életkorbeli különbségek sem voltak számottevőek. A mintavétel során fontos kritérium volt, hogy nem disztendált vénákat kapjunk, ezzel csökkentve a sebési preparálás során elkerülhetetlenül létrejövő endotel-sejtkárosodást.

Az 5-8 cm hosszúságú érdarabokat mikroszkóp alatt megtisztítottuk a felesleges zsírtól és az elhalt szövettörmelékektől. Következő lépésként kb. 4 mm szélességű érgyűrűket készítettünk, melyeket oxigenizált, módosított Krebs-oldatot tartalmazó 24 rekeszkből álló edényekbe helyeztük és 37 °C-on 15 percig preinkubáltuk. Kísérleteink során, a már ismert NO-cGMP értónust szabályzó rendszert alkalmaztuk pozitív (NO-t tartalmazó nitroprusszid-nátrium) és negatív (NO-szintézist gátló L-nitro-arginin-metil-észter) kontrollként (67).

Ezért a maximális cGMP-akkumuláció felbecsülése céljából pozitív kontrollként a szöveteket  $10^{-6}$  M-os végső koncentrációjú nitroprusszid-nátriummal (SNP) kezeltük 15 percig. Negatív kontrollként  $10^{-4}$  M-os koncentrációjú L-nitroarginin-metil-észterrel (L-NAME) való 30 perces előkezelés szolgált. A kísérleteket duplikáva végeztük és minden kísérletet legalább hat alkalommal ismételtünk meg, a reprodukálhatóság megállapítása végett.

A vizsgálatok utolsó lépéseként 20 percig 1 mM 3-isobutil-1-metilxanthin (IBMX) foszfodiészteráz bénítót használtunk, a termelődött cGMP gyors lebomlásának megakadályozására. Az inkubációs idők lejártakor az érgyűrűkhöz 200  $\mu$ l, 0,1 N-os HCl-t adtunk a biokémiai folyamatok leállítására és az intracelluláris cGMP mennyiség extrahálása céljából (68).

A kísérleteink befejező lépéseként nyert sósavas extraktumokból, nyúl polyclonalis cGMP antitestet használva, radioimmunoassay (RIA) vizsgálatot végeztünk, az érgyűrűkből felszabaduló cGMP mennyiség meghatározására (69, 70). Az érgyűrűkben talált cGMP mennyiségeket a szövetek nedves súlyára korrigálva hasonlítottuk össze (pmol/g). Az így kapott eredményekből közvetetten információt nyerhetünk az erekben létrejövő vasodilatatio mértékéről.



### II/3. 1.1. A kísérletek leírása

A kísérletek első lépésében a különböző koncentrációban és inkubációs ideig alkalmazott FDF hatását vizsgáltuk.

1. Az érpreparátumokat emelkedő koncentrációjú FDF-fel (1,25, 2,5, 5,0 mM) kezeltük, majd minden egyes koncentrációnál elvégeztük az időgörbe meghatározását is (15 perc, 2, 4, 6, 12 óra). Kontrollként az azonos körülmények között inkubált, FDF-kezelésben nem részesült érgyűrűket használtuk.

A kísérletek folytatásaként az FDF által, érgyűrűkben kiváltott cGMP-válasz és az L-arginin-NO-cGMP rendszer között kerestük a kapcsolatot, mivel az FDF okozta cGMP-szintemelkedés okát - foszfodiészteráz gátlás, NO, ANP indukció - nem tudtuk. Másik kérdésünk a vasoreguláció mechanizmusában kulcsszerepet játszó endothelsejtek és az FDF által tapasztalt hatás kapcsolatára, összefüggéseinek feltárására koncentrált.

2. Minden egyes vena saphena érdarabot, két egyenlő nagyságú részre osztottuk. Az egyik részt a hagyományos módon megtisztítottuk, majd érgyűrűket készítettünk. A véna másik felének endothel-rétegét a preparálás előtt mechanikus hatásoknak kitéve szétroncsoltuk, majd ezt követően ebből is 4 mm szélességű érgyűrűket készítettünk. Az endothel-réteg károsításának sikerességét a kísérletek során két endothelfüggő, az erekben bizonyítottan cGMP-t emelő illetve csökkentő hatást kiváltó szer alkalmazásával ellenőriztük. Nevezetesen pozitív kontrollként bradikinin  $10^{-3}$  M-s végső koncentrációjú oldatát, negatív kontrollként a már alkalmazott L-NAME 1 mM végső koncentrációjú oldatát használtuk. Amennyiben a bradikinin kiváltotta cGMP-emelkedés nem következett be és L-NAME hatására szignifikáns cGMP-szintcsökkenés nem volt detektálható a kontroll érgyűrűk cGMP tartalmához képest, akkor az endothel-réteg mechanikus roncsolását sikeresnek fogadtuk el. Az érgyűrűk „működőképességének” ellenőrzésére, továbbra is az endothel-rétegtől függetlenül ható, cGMP-emelkedést kiváltó SNP-t használtuk. Az 1 mM koncentrációjú L-arginint is bevontuk a vizsgálandó szerek közé, ismerve az L-argininnek az NO-cGMP-vasodilatatio mechanizmusában betöltött kulcsszerepét.

3. A vizsgálatokat a továbbiakban parallel, endothel-réteget tartalmazó és endothel-réteget nem tartalmazó érgyűrűkön végeztük. Kontrollként az azonos körülmények között inkubált, FDF kezelésben nem részesült érgyűrűket (endothel, endothel nélküli) használtuk. Megismételtük az FDF kiváltotta cGMP-emelkedés dózis- és időgörbe vizsgálatát, továbbá elemeztük az FDF+L-arginin, kontroll+L-arginin, FDF+L-NAME kombinációk cGMP változásra gyakorolt hatását mind endotheltől megfosztott, mind endothellel rendelkező érpreparátumokon.

A következő kísérlet sorozatunk első részében az FDF molekulát alkotó komponensek hatását vizsgáltuk az érgyűrűk cGMP-szint változására. A vizsgálatok további fázisában a glikolízisben résztvevő két intermedier által kiváltott esetleges vasodilatatív hatást követtük nyomon, majd az azonos helyzetű foszfát csoportot, de fruktózt nem tartalmazó, és a különböző helyzetű foszfát csoportot tartalmazó fruktóz hatását vizsgáltuk. A vizsgálatok befejező lépéseként az FDF-NO-cGMP kölcsönhatásban esetleg szerepet játszó proteinszintézis szerepét kerestük. Vizsgálatainkban endothellel rendelkező érgyűrűket használtunk. Az inkubációs idő egységesen 6 óra volt. A kontroll, L-NAME és 2,5 mM FDF kezelés minden kísérletünkben szerepelt.

4. Első kísérletünkben az FDF-t felépítő molekulák érgyűrűkre kifejített cGMP emelő hatását hasonlítottuk össze a kontroll erekben spontán meglévő és az FDF által kiváltott cGMP mennyiséggel. A kísérletek során *fruktóz* és *foszfát* 2,5 mM-os végső koncentrációjú oldatát használtuk.

5. Második kísérlet sorozatunkban a glikolitikus folyamatokban résztvevő *glükóz-6-foszfát* és *fruktóz-6-foszfát* (2,5 mM végső koncentráció) cGMP-szintre kifejített hatását hasonlítottuk össze, az FDF által érpreparátumokban kiváltott cGMP válasszal. Ezt követően a molekuláris felépítésben az FDF-hez hasonló, azonos elhelyezkedésű két foszfátcsoporthoz, de a fruktóz helyett glükózt tartalmazó *glükóz-1,6-difoszfátot*, majd a különböző helyzetben, de szintén két foszfátcsoporthoz tartozó *fruktóz-2,6-difoszfátot* alkalmaztuk 2,5 mM koncentrációban.

6. Befejező vizsgálat sorozatunkban a transzkripciót gátló *aktinomicin-D* 10  $\mu\text{M}$ -os és a transzlációt blokkoló *ciklohexamid* 100  $\mu\text{M}$ -os végső koncentrációjú oldatát alkalmaztuk. A preparátumok kezelése a következő volt: csak FDF-fel, vagy aktinomicin-D-vel, vagy ciklohexamiddal kezelt érgyűrűk. Ílymódon a szerek önmagukban okozta cGMP-szintváltozás nagyságának megállapítását vizsgáltuk. A ciklohexamid és az aktinomicin-D-nek, az FDF cGMP emelő hatására kifejtett befolyását, az FDF+ciklohexamid, FDF+aktinomicin-D kombinációk alkalmazásával vizsgáltuk.

#### III/4. Az adatok statisztikai feldolgozása

Az adataink statisztikai feldolgozása során, a UNISTAT®, Version for Windows (UNISTAT Ltd, London, UK) programot használtuk. Az adatok valószínűségi normalitásának meghatározására a Shapiro-Wilk W-tesztet alkalmaztuk. Ha a  $p > 0,05$  akkor parametrikus tesztet, egy vagy kétmintás t-próbát alkalmaztunk a szignifikanciaszint megállapítására. Az egymástól független FDF és placebo klinikai és állatkísérletes csoportok összehasonlításakor kétmintás t-próbát, a saját kontrollt használó HPLC és érfiziológias adatoknál egymintás t-próbát végeztünk. Az adatok leíró jellemzésére átlag  $\pm$  középérték középhibáját (SEM: standard error of mean) értékeket használtunk. A vizsgálatok során kapott eredmények közötti különbségeket szignifikánsnak fogadtuk el, ha  $p < 0,05$  volt.

Amennyiben az adataink a Shapiro-Wilk W-teszt elemzése során nem feleltek meg a normalitási p értéknek ( $p < 0,05$ ), akkor a nem parametrikus tesztek közül a Mann Whiney-U, vagy a Wilcoxon Paired Signed Rank tesztek alkalmaztuk, attól függően, hogy a vizsgált csoport a saját maga kontrolljaként szerepelt (Mann Whiney-U teszt), vagy más kontrollcsoportja volt (Wilcoxon Paired Signed Rank teszt). Az eredmények között a különbséget szignifikánsnak fogadtuk el, ha a  $p < 0,05$ -nak találtuk.



### III. Eredmények

#### III/1. Klinikai mérési eredmények

##### III/1.1. A funkcionális és laboratóriumi vizsgálatok eredményei

Az I, II, V/A, V/B csoport (intravénásan adott) eredményeinek értékelésekor a CK-MB szint ugyan alacsonyabb volt az ECK-t követő első 18 órában, és a hemodinamikai adatok is kedvezőbb eredményeket mutattak az első 12 órában az FDF-t kapott betegeknél, de a statisztikai elemzések során nem találtunk szignifikáns különbségeket.

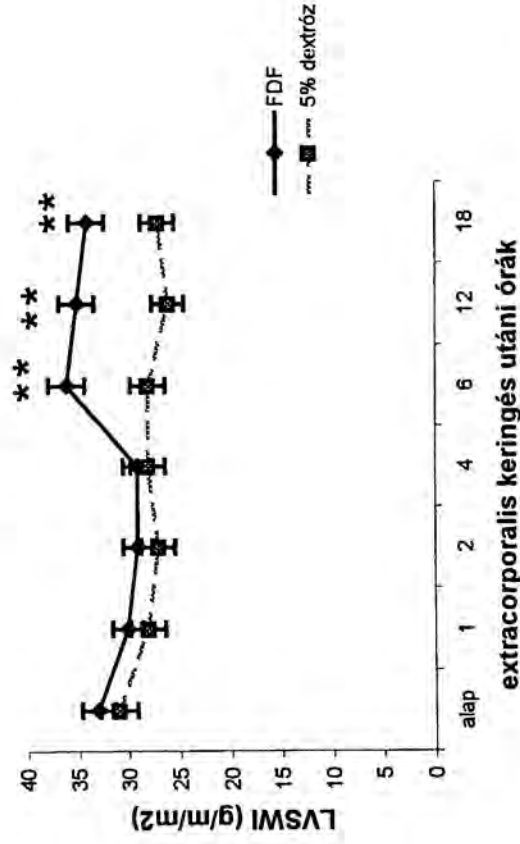
A III. csoportnál (cardioplegiában adott) semmi különbséget nem találtunk az FDF-t és a placebót kapott betegek eredményei között.

A IV. csoport (kombináltan: intravénásan + cardioplegiában adott) eredményeinek kiértékelésekor szignifikáns eltéréseket találtunk a következő adatokban:

A hemodinamikai mérések szignifikánsan jobb eredményeket mutattak az FDF-fel kezelt betegeknél a következő paraméterekben és időpontokban:

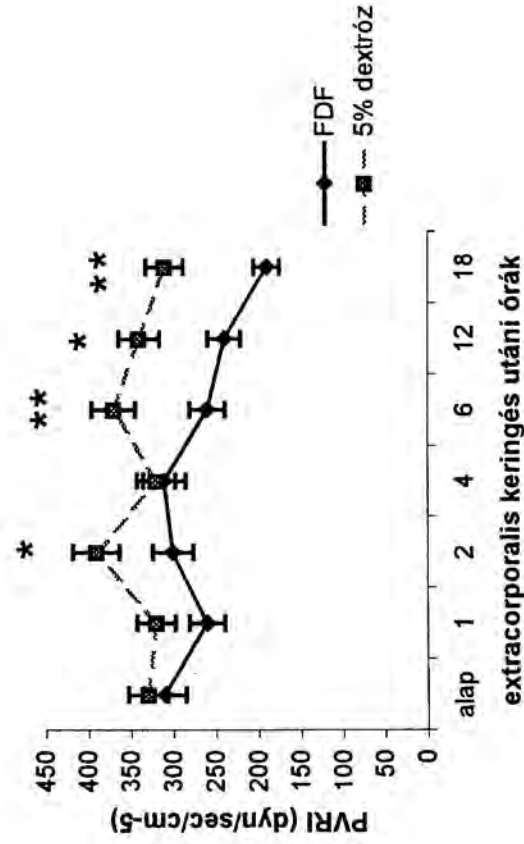
- a bal kamrai löketmunka-index (LVSWI) a 6. ( $p = 0,001$ ), 12. ( $p = 0,005$ ) és a 18. ( $P < 0,01$ ) órában (4. ábra)
- a szívindex (CI) a 6. és 12. posztoperatív órában ( $p = 0,024$ )
- a pulmonális vascularis rezisztencia-index (PVRI) az ECK követően 2. ( $p = 0,032$ ), a 6. ( $p = 0,002$ ), 12. ( $p < 0,05$ ) és a 18. ( $p = 0,006$ ) órában (5. ábra).

### LVSWI változás



4. ábra: A bal kamrai löketmunka-index (LVSWI g/m/m<sup>2</sup>) változása az extracorporalis keringést követő órákban. A 6., 12., 18. órákban az FDF-t kapott betegekben a LVSWI értékek szignifikánsan (\*\* p < 0,01) magasabbak voltak, mint a kontrollcsoport tagjainál (átlagok ± SD, FDF-csoport: n = 15, 5% dextrán-csoport: n = 15).

### PVRI változás



5. ábra: A pulmonalis vascularis rezisztencia-index (PVRI dyn/sec/cm<sup>5</sup>) változása az extracorporalis keringést követő órákban. A 2., 6., 12., 18. órákban az FDF-t kapott betegekben a PVRI értékek szignifikánsan (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01) alacsonyabb értékeket mutattak, mint a kontrollcsoport tagjainál (átlagok ± SD, FDF-csoport: n = 15, 5% dextrán-csoport: n = 15).

A CK-MB értékek az AXC felengedését követő 2. ( $p = 0,026$ ), 4. ( $p = 0,017$ ), és a 6. ( $p < 0,05$ ), órában szignifikánsan alacsonyabbak voltak az FDF-csoport tagjainál (6. ábra).

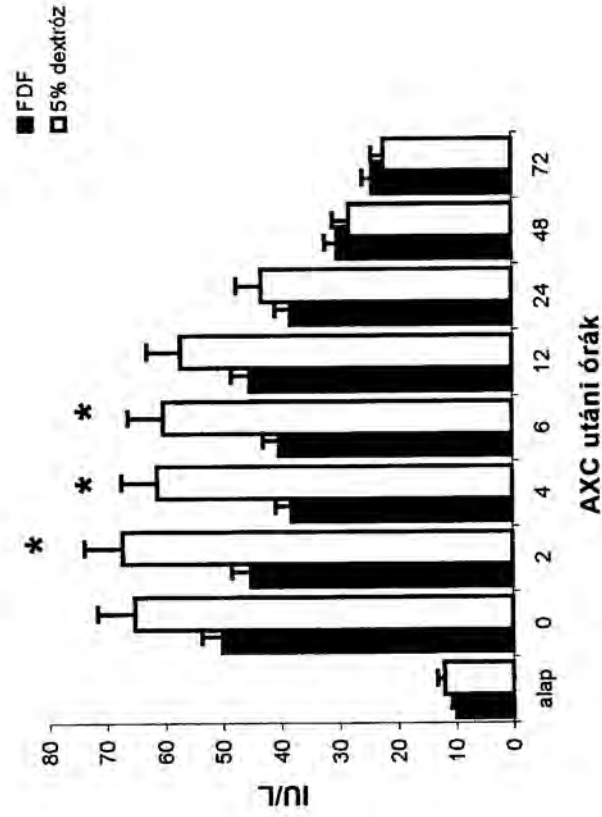
A *Holter-EKG* kiértékelése során az FDF-t kapott betegek körében 6% volt a posztoperatív pitvarfibrilláció előfordulása és újonnan jelentkező infarktus, intracardialis ingerületvezetési blokk nem alakult ki. Ezzel szemben a placebo-t kapott betegek körében 33% volt a posztoperatív pitvarfibrilláció előfordulásának aránya és 5 betegnél alakult ki új subendocardialis infarktus a korai posztoperatív szakban.

*Inotrop-támogatás igénye:* Az ECK megszüntetésekor és a korai posztoperatív szakban 3 FDF-t kapott betegnél indítottunk dopamin-infúziót ( $>3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{perc}$ ), míg ezzel szemben a kontrollcsoport tagjainál 5 alkalommal, és ebből 3 esetben a dopamin mellett adrenalin-infúzió adására is kényszerültünk, a folyadék és egyéb gyógyszeres terápiára nem reagáló vérnyomásesés miatt.

*Szövődmények, mellékhatások:* Az V/A csoport kivételével egyik csoportban sem fordult elő az FDF, vagy az 5%-os dextróz következményeként kialakult szövődmény, kóros eltérés a labor- és vérgázparaméterekben.

Az V/A csoportnál mellékhatásként metabolikus acidózis jelentkezett. Ez az eltérés klinikai következményeket nem vont maga után, és kis mennyiségű  $\text{NaHCO}_3$  adására rendeződött. Ezen laboreltérés jelentkezése miatt kényszerültünk az V. csoportban alkalmazott FDF mennyiségének megváltoztatására.

### CK-MB változás



6. ábra: A CK-MB mennyiség változása a szérumban az aorta leszorítás (AXC) felengedését követően. A 2., 4., 6. órákban a CK-MB-szint szignifikánsan alacsonyabb volt (\*  $P < 0,05$ ) az FDF-t kapott betegek szérumban, a kontrollcsoport eredményeihez viszonyítva (átlagok  $\pm$  SD, FDF-csoport:  $n = 15$ , 5% dextróz-csoport:  $n = 15$ ).

### III/1.2. A szív nukleotid anyagcsere vizsgálatának eredményei

A kapott eredmények kiértékelésénél a sinus coronariusban és az arteria radialisokban megjelenő metabolitok különbségét hasonlítottuk össze, minden egyes beteg saját alapértékével (az ACX előtt levett vérminták), mivel ez ad felvilágosítást a szívből felszabaduló degradációs termékekről.

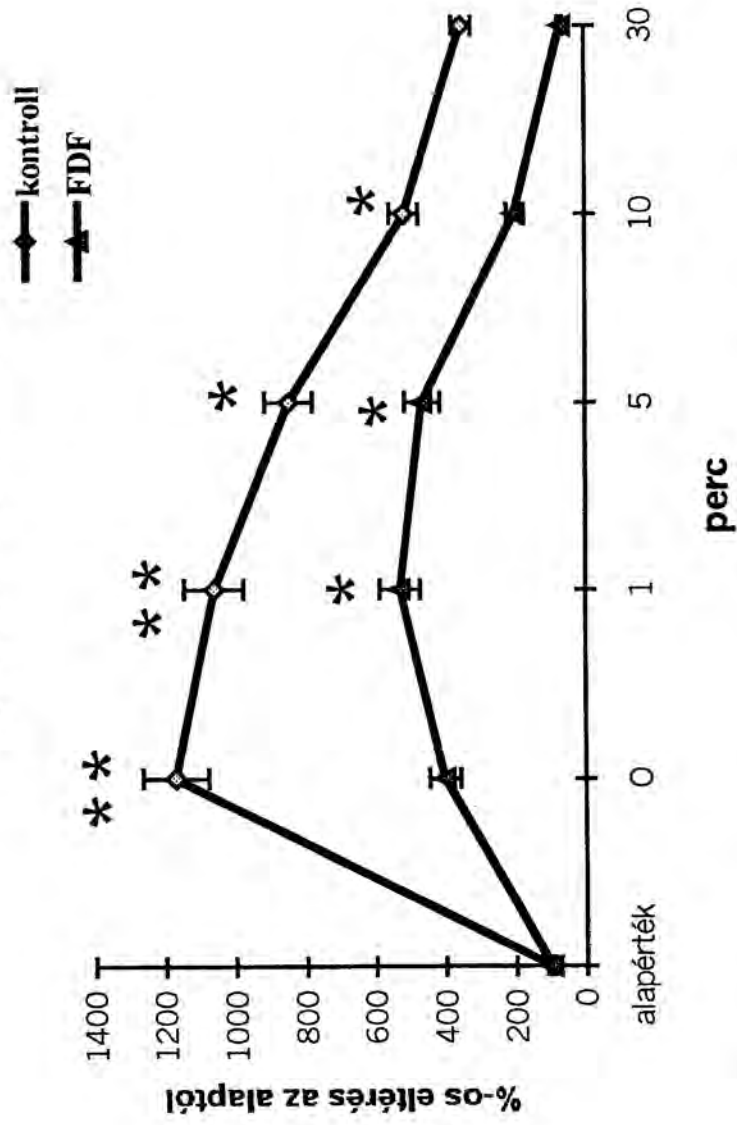
1. csoport (intravénásan adott FDF vagy 5% dextróz):

- az FDF kezelésben részesült betegek mintáiban az alapértékekhez viszonyítva, az AXC felengedését követő 1. és 5. percben volt szignifikáns hipoxantin- és inozin-felszaporodás megfigyelhető ( $p < 0,05$ ). Ezzel szemben, a kontrolcsoportnál ezen szignifikáns emelkedés az ACX-t követően azonnal (0 perc), majd az 1. ( $p < 0,01$ ), 5. és 10. ( $p < 0,05$ ) percekben jelentkezett. A 30. percben vett vérmintákban már nem találtunk egyik csoportban sem szignifikáns metabolitemelkedést az alapértékhez képest (7. ábra). Ezzel teljes mértékben megegyező eredményeket kaptunk a hipoxantin- és inozin-felszabaduláskor elért csúcsertékek összehasonlító elemzése során is. Az előbb leírt időpontokban a kontrolcsoport tagjainál ezen csúcsertékek szignifikánsan magasabbak voltak ( $p < 0,05$ ), mint az FDF-t kapott betegeknél (71).

- elemezve a UTP lebomlása során keletkezett uridin-mennyiség szintjét, hasonló eredményeket kaptunk. A kontrolcsoportnál szignifikáns uridin-szint emelkedést találtunk az AXC-t követő 1. 5. percben ( $p < 0,05$ ). Ezzel szemben az FDF-csoportban egyetlen mintavételi időpontban sem volt szignifikáns változás megállapítható (8. ábra).



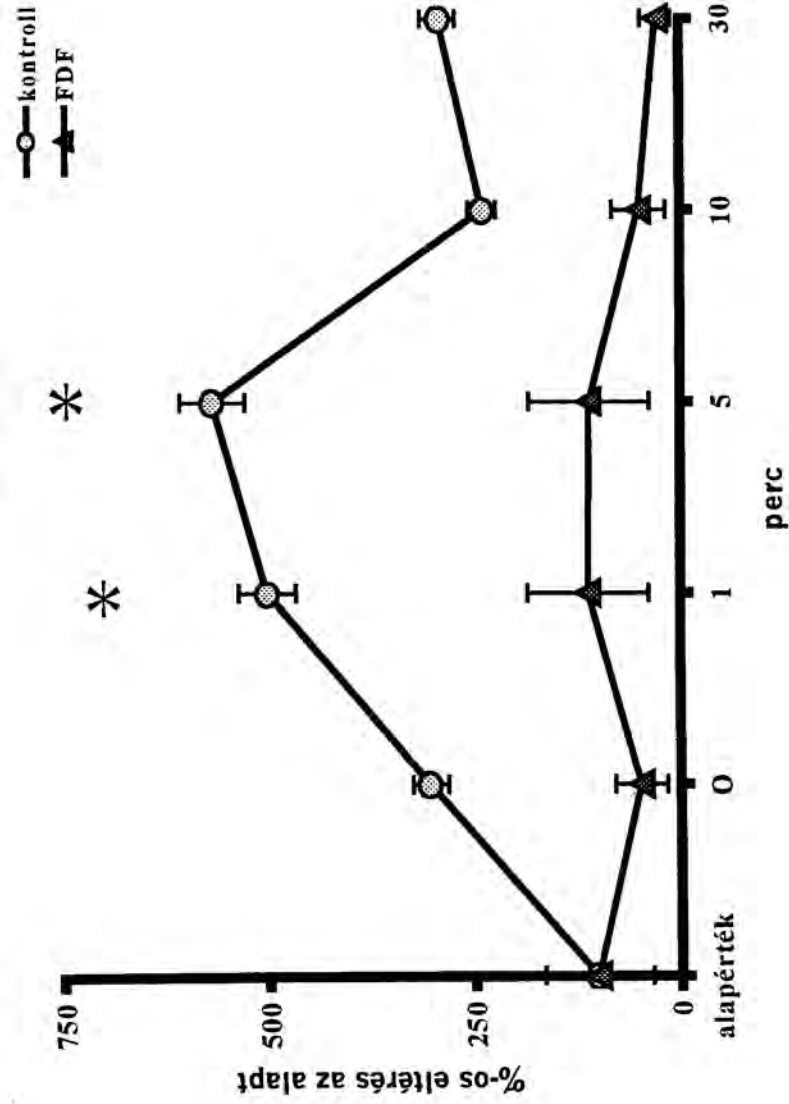
## Hipoxantin-változás



7. ábra: A szívizom- és endothelsejtekben (sinus coronarius minusz aorta) megjelenő purin degradációs termék mennyiségi változása az alapértékhez (100%) viszonyítva, az aorta leszorítás felengedését követő percekben (átlagok  $\pm$  SEM, FDF-csoport: n = 8, kontrollcsoport: n = 8).

\* p < 0,05, \*\* p < 0,01

## Uridin-változás



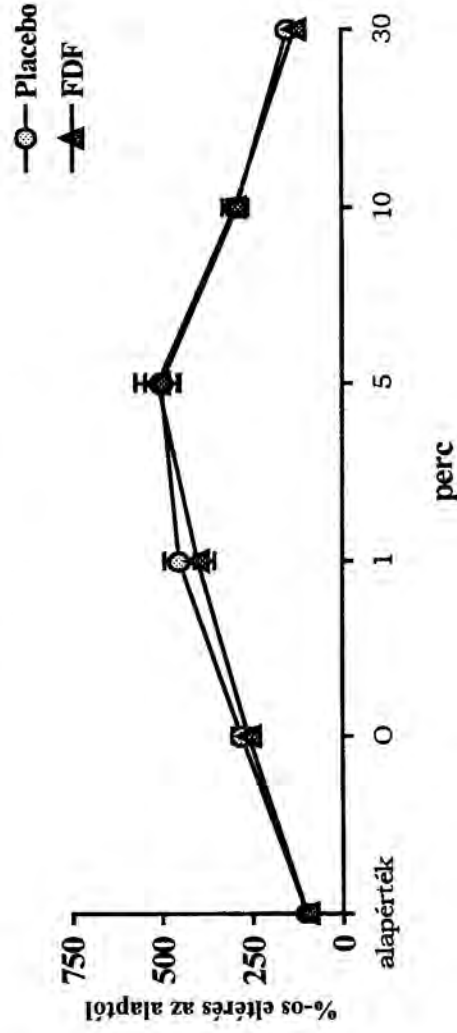
8. ábra: A szívizom- és endothelesejtekben (sinus coronarius minusz aorta) megjelenő pirimidin degradációs termék mennyiségi változása az alapértékhez (100%) viszonyítva, az aorta leszorítás felengedését követő percekben (átlagok  $\pm$  SEM, FDF-csoport:  $n = 8$ , kontrollcsoport:  $n = 8$ ).

\*  $p < 0,05$

2. csoport (cardioplegiában adott FDF vagy 5% dextróz):

- az eredmények kiértékelésénél nem találtunk szignifikáns különbséget sem a purin, sem a pirimidin degradációs termékek minőségi és mennyiségi változásában az FDF kezelésben részesült és a kontroll, 5%-os dextrózt kapott betegek vérmintáinak elemzése során. A nukleotid degradációs termékek változásának kinetikájában és az elért csúcsertékek tekintetében sem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a kapott eredményekben (9. ábra).

### Uridin-változás



9. ábra: A szívizom- és endothele sejtekben (sinus coronarius minusz aorta) megjelenő pirimidin degradációs termék mennyiségi változása az alapértékhez (100%) viszonyítva, az aorta leszorítás felengedését követő percekben. Szignifikáns eltérés a kapott eredmények között nem volt (átlagok  $\pm$  SEM, FDF-csoport: n = 5, kontrollcsoport: n = 5).

### III/1.3. Megbeszélés

A bevezetőben felsorolt kedvező alapkatatási és állatkísérleti eredmények birtokában, az FDF klinikai kipróbálása és vizsgálata már több, mint egy évtizede zajlik. Ezzel kapcsolatban az irodalom igen biztató eredményekről számolt be krónikus, stabil anginában (72), ISZB-ben (73) alkalmazott FDF adást követően. Akut myocardialis infarctusban az intravénás FDF használata csökkentette az ST-eleváció mértékét, a postinfarctusos ritmuszavarok kialakulását (55), az infarctus kiterjedését (57). Hasonló kedvező eredményeket írtak le ARDS-ben szenvedő betegeknél történt FDF intravénás adagolásakor (61). Ezen kedvező eredmények ismeretében feltételeztük, hogy hasonló előnyös tulajdonságai vannak az FDF-nek a coronaria revascularisatiós műtétek alkalmazásakor is.

A kapott eredményekből kiderült, hogy csak a cardioplegiás oldatban alkalmazott FDF nem mutatott cytoprotektív hatást az 5%-os dextrózzal szemben. Bár klinikai eltérés mutatkozott - ami nem felelt meg a statisztikai szignifikancia kritériumának - mégis hasonló állapítható meg, az FDF-t csak intravénásan kapott csoport eredményeinek kiértékelése során is a placebo-csoporthoz viszonyítva. Eddig a cardioplegiában alkalmazott adásmóddal nem voltak tapasztalatok, így nem volt meglepő a talált hatástalanság. Viszont az eddigi ismeretekkel ellentétben, az intravénás adagolási mód sem volt egyértelműen hatásos.

Ezzel szemben, több mérési és vizsgálati paraméter tekintetében szignifikáns különbség volt található a kombináltan - intravénásan és cardioplegiában - alkalmazott FDF-fel kezelt és a hasonló módon, de 5%-os dextrózt kapott betegcsoportok eredményeiben.

Az FDF kezelésben részesült betegeknél talált kedvező eredmények, az eddigi megfigyelésekkel megegyezően a cardiopulmonális hemodinamikai paraméterek (LVSWI, CI, PVRJ) vonatkozásában voltak a legszembetűnőbbek. A funkcionális paraméterek és a posztoperatív felépülés során észlelt különbségek, a szív kedvezőbb coronaria-keringésével hozhatók összefüggésbe, melyet a coronaria endothelsejtek funkcionális képessége határoz meg.

Az FDF kezelt csoport CK-MB értékeinél talált szignifikánsan kedvezőbb eredmények, az FDF cardiomyoprotektív hatásának érvényesülését feltételezi.

A tüdő vasculaturát és a szív funkcionális működését jellemző értékek kedvező eredményei, szemben az eddigi ismeretekkel nem a közvetlen FDF alkalmazás közben jelentkeztek, hanem a posztoperatív szak 6. 12. és 18. órájában elvégzett mérésekkor.

Az FDF-ről eddig közölt tanulmányok, az FDF hypoxiás körülmények között, a sejt energiatermelő folyamatában betöltött reaktíváló szerepét hangsúlyozták és helyezték előtérbe a hatásmechanizmus magyarázataként. Ismerve az FDF rövid plazmafelezési idejét, ami 15 perc (80 perc eltelével az FDF eléri a normál szintjét a plazmában - Lazzarino és mtsai 1984), és az eddig feltételezett extra energiaképzés (ATP-szintézis) elfogadott elméletét - mely folyamatok szintén gyorsan lejátszódó biokémiai események -, nem találtunk elfogadható magyarázatot az általunk mért „késleltetett” megjelenő, kedvező hemodinamikai eredményekre. Természetesen a plusz energiát kapott, és ennek következtében az ischaemiás-reperfúziós károsodásokat kedvezőbb „kondícióban” átélt szövetek megfelelő működőképességének lehetnek és vannak is hosszú távú előnyös következményei, de ez önmagában nem ad magyarázatot a fent említett megfigyelésre.

Ezt a feltételezésünket és a klinikumban talált eredményeket támasztotta alá a kétféle adagolási módban FDF-t kapott betegek szív nukleotid metabolizmusának vizsgálata HPLC-vel is.

Az eredmények elemzésekor, az előzetesen - szív és szív-tüdő transzplantáció során - kórházunkban elvégzett hasonló vizsgálatokra alapozva, a hipoxantin-, inosin-, uridin-metabolitok dinamikájának változására helyeztük a fő hangsúlyt (74). Ezen metabolitok változási kinetikája a legnagyobb mérvű és a legérzékenyebben reagáló folyamat, egy ischaemiás, reperfüziós eseményt követő hypoxiás károsodás nagyságának megítélése szempontjából (75).

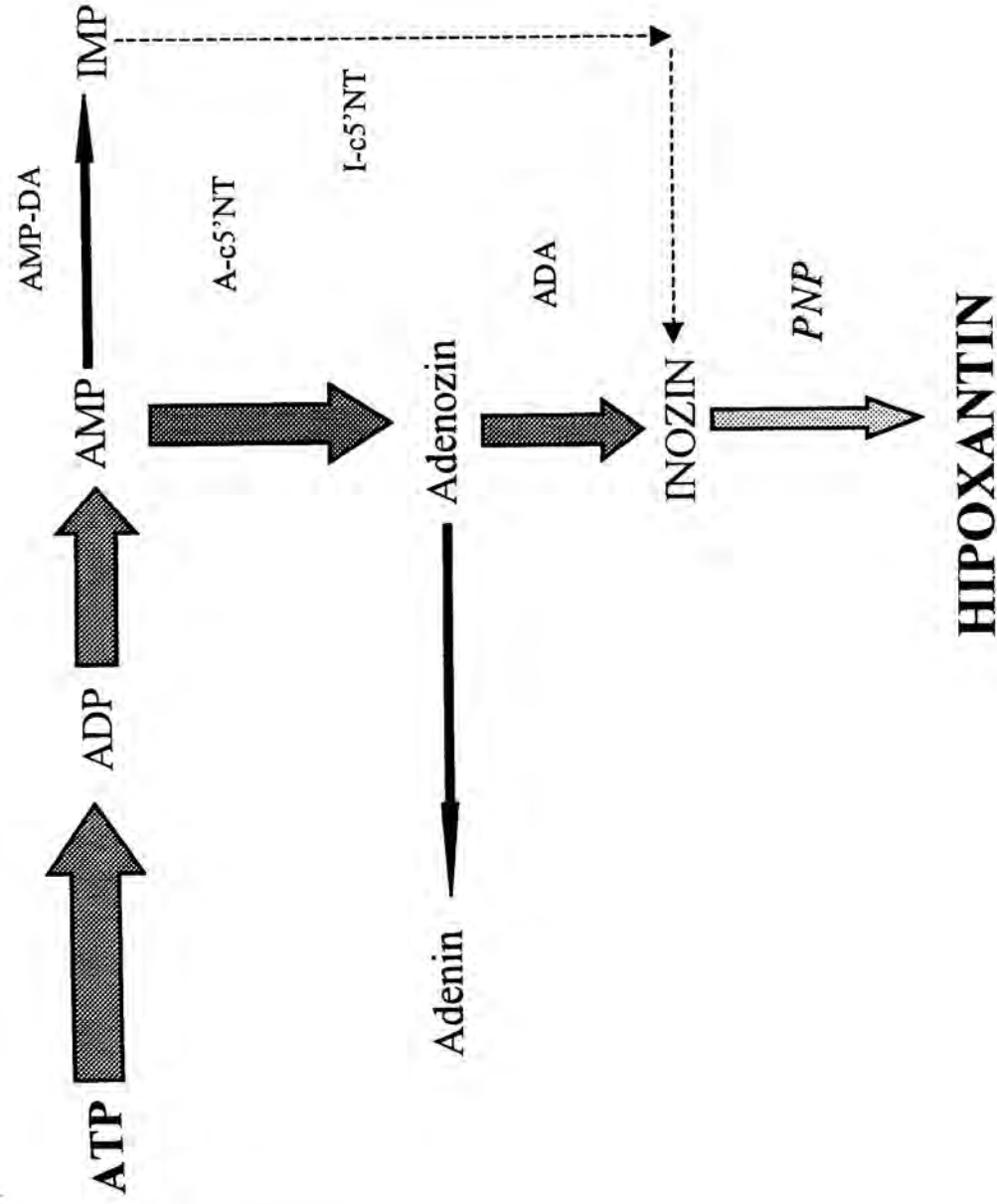
Az előzetes állatkísérleti modellek azt mutatták, hogy különösen a felszabaduló purin- és pirimidin-metabolitok elért csúcspontjainak nagysága ad felvilágosítást a hypoxia következtében kialakuló sejtkárosodás mértékéről (Cargnoni és mtsai 1992).



Az 1. csoportban kapott eredményekből látható, hogy hogy mind az ATP, mind az UTP nagy energia tartalmú molekulák - hypoxia okozta - lebomlása során keletkezett degradációs termékek  *mennyisége*  kevesebb az FDF-fel kezelt betegek mintáiban, mint az 5%-os dextrózt kapott csoport vérében. Ugyanez a különbség volt megfigyelhető a  *csúcsértékek*  vonatkozásában is. A metabolikus események  *kinetikáját*  elemezve megállapíthatjuk, hogy a regenerációs folyamatok előbb indultak meg az FDF-t kapott betegek körében, mivel a 10. percben kapott vérminták purin, pirimidin degradációs termék tartalma az FDF-csoportban nem volt szignifikánsan nagyobb a kiindulási értékhez képest, szemben a kontrollcsoport eredményével.

Az adatok további elemzése lehetőséget ad a protekcióban résztvevő sejttípusok azonosítására. Humán szívizomsejtekben - a purin-nukleozid-foszfórilázhiány következtében - hypoxia hatására fokozódó purin-katabolizmus végterméke az inozin (76, 77), ezzel szemben a szív endothelsejtjeiben ez a katabolizmus az előbb említett enzim jelenléte miatt tovább folytatódik és a teljes lebontás eredménye a hipoxantin lesz (78, 79). Ezért a hipoxantin - mint az endothelben specifikusan megjelenő, purin katabolikus folyamatok végterméke - szintjének vizsgálata pontos felvilágosítást ad, az endothel hypoxiás károsodásának mértékéről (10. ábra). Elemezve a vérmintákban megjelenő lebomlási termékek - endothel-specifikus - hipoxantin és - szívizomsejt-specifikus - inozin %-os arányát (98% - 2%) megállapíthatjuk, hogy az endothelsejtek nagyrésze nem károsodott, funkcionálisan tökéletesen működött, ami az FDF endothelsejteken kiváltott cytoprotektív hatását bizonyítja.

A 2. csoportnál kapott eredmények azt mutatták, hogy a csak cardioplegiás oldatban alkalmazott FDF nem vált ki kedvező hatást a nukleotid anyagcsere vonatkozásában az 5%-os dextrózzal összehasonlítva, szemben az intravénás alkalmazási stratégiánál tapasztalt eredményekkel.



10. ábra: A humán endothelsejtekben lezajló purin-lebomlás menete.

Rövidítések: PNP: purin-nukleozid-foszforiláz (endothelfüggő), AMP-DA: AMP-desamináz, A-c5'NT: AMP-specifikus cytosol 5'-nukleotidáz, ADA: adenosin-deamináz, I-c5'NT: IMP-specifikus cytosol 5'-nukleotidáz, MTAP: 5'-deoxi-5'-metilthioadenozin-foszforiláz, IMP: inozitol-monofoszfát.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a nukleotid degradációs termékek kinetikájának és mennyiségi változásának vizsgálata az HPLC technika alkalmazásával egyértelműen bizonyította, hogy a cardioplegiában alkalmazott FDF nem mutat előnyös tulajdonságokat az 5%-os dextrózhoz képest, még intravenásan alkalmazva igen. Azonban ez a hatás nem mutatkozott meg egyértelmű pozitív, statisztikailag is szignifikáns klinikai jelekben. Feltételezzük, hogy az alkalmazott HPLC technika nagyfokú érzékenysége miatt mért eltérések, még nem elég számottevőek ahhoz, hogy a klinikumban is megjelenő, egyértelmű, statisztikailag szignifikáns eredményekben nyilvánuljanak meg.

A klinikai vizsgálatok során, a kombináltan alkalmazott FDF kiváltotta, a késői posztoperatív szakban megjelenő kedvező hemodinamikai és laboratóriumi mérési eredmények pedig nem magyarázhatók csak a feltételezett plusz energiát biztosító hatásmechanizmussal.

### III/2. Az FDF coronariákra kifejtett direkt hatásának eredményei, in vitro patkányszív-modelleken

#### III/2.1. Eredmények

1. Az ischaemiás állapot kialakulása előtt FDF vagy 5% dextróz kezelésben részesült csoport coronaria-áramlásértékeinek összehasonlításakor a következő eredményeket találtuk (2. táblázat):
  - A preischaemiás alapértékekhez (A) viszonyított, közvetlen a reperfüziós szakban bekövetkezett spontán hyperaemiás válasz az FDF-kezelt csoportban nagyobb volt ( $14,6 \pm 0,8$ -ról  $23,0 \pm 0,7$  ml/percre), mint a kontrollcsoportban ( $14,9 \pm 0,8$ -ról  $20,9 \pm 1,6$  ml/percre).
  - A postischaemiás szakban mért alapáramlás mértéke mindkét csoportban csökkent a preischaemiás alapértékekhez viszonyítva, de ennek mértéke az FDF-csoportnál kisebb volt (FDF-csoport  $< 20\%$ , placebo-csoport  $> 25\%$  minden mérésnél).
  - Az ischaemiát követő 5-HT-re a kontrollcsoport 70%-a kezdeti vasoconstrictióval reagált, még hasonló reakció az FDF-t kapott csoport 20%-nál fordult elő.
  - Az ischaemiát követő 5-HT-re adott vasodilatációs válasz mindkét csoportban szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) csökkent a preischaemiás válaszreakcióhoz képest. Az FDF  $35,1 \pm 5,1\%$ -os, még a kontrollcsoport  $28,2 \pm 13,0\%$ -os áramlásemelkedést mutatott a postischaemiás alapáramláshoz képest (D). A preischaemiás válaszreakció vizsgálatokor az FDF-csoportban  $65,6 \pm 12,2\%$ -os, még a kontrollcsoportban  $53,3 \pm 5,7\%$ -os emelkedés volt regisztrálható a preischaemiás alapáramláshoz képest (B).

- Az ischaemiát követő GTN-re adott vasodilatációs válasz mindkét csoportban szignifikánsan csökkent a preischaemiás válaszreakcióhoz képest ( $p < 0,01$ ). Az FDF  $26,0 \pm 5,4\%$ -os, még a kontrollcsoport  $15,3 \pm 8,5\%$ -os áramlásemelkedést mutatott a postischaemiás alapáramláshoz képest (D). A preischaemiás válaszreakció vizsgálatok az FDF-csoportban  $63,6 \pm 9,8\%$ -os, még a kontrollcsoportban  $49,9 \pm 6,5\%$ -os emelkedés volt regisztrálható a preischaemiás alapáramláshoz képest (B).
- Az ischaemiát követően adott vasodilatátorokra kiváltott válaszreakció nagyobb mértékben és gyorsabb ütemben tért vissza az FDF-kezelte csoportban, mindkét vasodilatátor vonatkozásában (11. ábra).
- Az FDF-csoportban 5-HT-re bekövetkezett, kiváltott vasodilatatio visszatérésének nagysága  $67,0 \pm 3,6\%$ , még a kontrollcsoportban  $31,7 \pm 2,4\%$  (E) a preischaemiás vizsgálatok során kiváltott vasodilatációs válaszreakcióhoz viszonyítva (100 %).
- A GTN-re adott kiváltott vasodilatatio visszatérésének nagysága az FDF-csoportban  $48,5 \pm 3,1\%$ , még a kontrollcsoportban  $13,5 \pm 0,8\%$  (E) a preischaemiás vizsgálatok során kiváltott vasodilatációs válaszreakcióhoz viszonyítva (100 %).



CBF	Alapáramlás		S-HT		GTN
	Kontroll	FDF	Kontroll	FDF	
Csoport					
A (ml/perc)	14.9 ± 0.8	14.6 ± 0.8	22.5 ± 1.1	23.0 ± 1.0	22.2 ± 1.2 23.5 ± 1.0
B (%) ↑			53.3 ± 5.7	65.6 ± 12.2	49.9 ± 6.5 63.6 ± 9.8
C (ml/perc)	12.9 ± 1.1	13.3 ± 0.8	16.2 ± 1.8	17.9 ± 1.1	14.5 ± 1.1 16.7 ± 1.1
D (%) ↑			28.2 ± 13.0	35.1 ± 5.1	15.3 ± 8.5 26.0 ± 5.4
E (%)	40.9 ± 9.9	61.1 ± 10.0	31.7 ± 2.4	67.0 ± 3.6	13.5 ± 0.8 48.5 ± 3.1

2. táblázat

**CBF:** coronaria-áramlás

**A:** preischaemiás alapáramlás

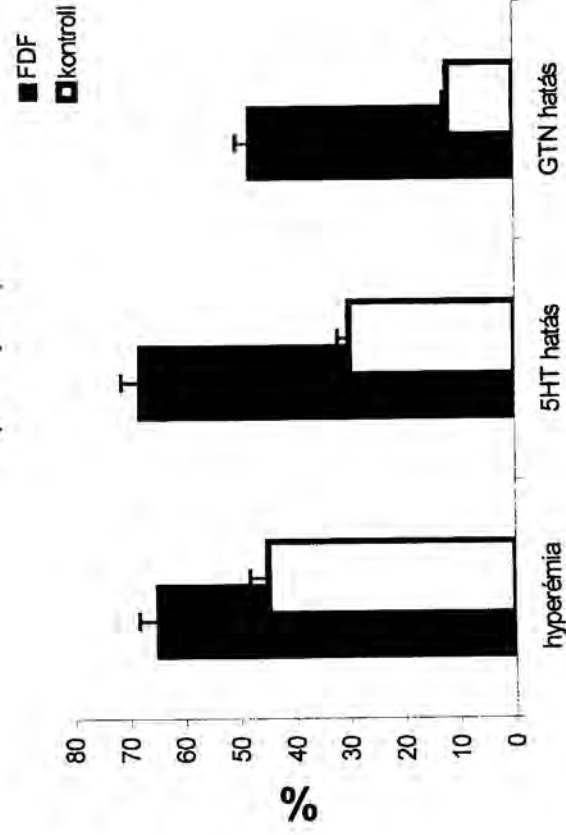
**B:** a coronaria-áramlás emelkedése a preischaemiás alapáramláshoz képest

**C:** postschaemiás alapáramlás

**D:** a coronaria-áramlás emelkedése a postschaemiás alapáramláshoz képest

**E:** a kiváltott vasodilatációs válasz visszatérésének mértéke a preischaemiás válaszhoz képest, melyet 100 %-nak veszünk.

### Postischaemiás coronaria-áramlás (I csoport)



11. ábra: Az ischaemiát követő spontán és kiváltott (5HT, GTN) coronaria-áramlás mértékének visszatérése a 100%-nak vett preischaemiás válaszreakcióhoz képest. A két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik mérésorozatban sem (átlagok  $\pm$  SEM, FDF-csoport:  $n = 10$ , kontrollcsoport:  $n = 10$ ).

2. Az *ischaemiás állapot* közben FDF vagy 5% dextróz kezelésben részesült csoport coronaria-áramlásértékeinek összehasonlításakor a következő eredményeket találtuk (3. táblázat):

- A preischaemiás alapértékekhez %-ban viszonyított, közvetlen a reperfüziós szakban bekövetkezett spontán hyperaemiás válasz mértékében nem volt szignifikáns különbség az FDF és a kontrollcsoport értékei között (E).

FDF:  $40,0 \pm 10,9\%$ , kontroll:  $38,3 \pm 3,3\%$  ( $p = 0,654$ ).

- A postischaemiás szakban mért áramlás mértéke (C) mindkét csoportban csökkent a preischaemiás alapértékekehez (A) viszonyítva. A kontrollcsoportba bevont patkányok 33,3%-ában, még az FDF-csoportban lévők 12,5%-ában ez a csökkenés nagyobb volt mint 25%.

- Az ischaemiát követő 5-HT-re a kontrollcsoportnak 55,5%-a kezdeti vasoconstriktióval reagált, még hasonló reakció az FDF-t kapott csoportnál 37,5%-nál fordult elő.

- Az ischaemiát követő 5-HT-re adott vasodilatációs válasz mindkét csoportban szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) csökkent a preischaemiás válaszreakcióhoz képest. Az FDF  $39,6 \pm 5,2\%$ -os, még a kontrollcsoport  $41,5 \pm 6,1\%$ -os áramlásemelkedést mutatott a postischaemiás áramláshoz képest (D). A preischaemiás válaszreakció vizsgálatok az FDF-csoportban  $74,8 \pm 5,9\%$ -os, még a kontrollcsoportban  $56,6 \pm 5,1\%$ -os emelkedés volt regisztrálható a preischaemiás áramláshoz képest (B).

- Az ischaemiát követő GTN-re adott vasodilatációs válasz mindkét csoportban szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) csökkent a preischaemiás válaszreakcióhoz képest. Az FDF  $49,8 \pm 5,3\%$ -os, még a kontrollcsoport  $49,3 \pm 6,5\%$ -os áramlásemelkedést mutatott a postischaemiás áramláshoz képest (D). A preischaemiás válaszreakció vizsgálatok az FDF-csoportban  $78,9 \pm 5,6\%$ -os, még a kontrollcsoportban  $62,9 \pm 4,6\%$ -os emelkedés volt regisztrálható a preischaemiás áramláshoz képest (B).

- Az ischaemiát követően alkalmazott vasodilatátorokra adott válaszreakció visszatérésének mértékében és ütemében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között (12. ábra).
- Az FDF-csoportban 5-HT-re bekövetkezett, kiváltott vasodilatatio visszatérésének nagysága  $35,6 \pm 7,6\%$ , még a kontrollcsoportban  $38,2 \pm 3,1\%$  (E) a preischaemiás vizsgálatok során kiváltott vasodilatatioos válaszreakcióhoz viszonyítva (100 %).
- A GTN-re adott kiváltott vasodilatatio visszatérésének nagysága az FDF-csoportban  $38,2 \pm 9,1\%$ , még a kontrollcsoportban  $36,4 \pm 2,1\%$  (E) a preischaemiás vizsgálatok során kiváltott vasodilatatioos válaszreakcióhoz viszonyítva (100 %).

A Langendorff-modelleken átáramoltatott folyadék *nitrit/nitrát* tartalmának meghatározása során a következő eredményeket kaptuk (a mért eredményeket a coronaria-áramlás mértékére, és a Langendorff szívpreparátum szárazanyag súlyára korrigáltuk):

- Az preischaemiás periódusban intravénásan FDF-t kapott patkányok (1. csoport) coronariáinak nitrit/nitrát tartalma  $46,0 \pm 7,39$  pmol/g/percre emelkedett a postschaemiás fázisban az alap - preischaemiás -  $22.38 \pm 4.28$  pmol/g/min.nitrit/nitrát szinthez képest.
- A postschaemiás hyperaemiás fázisban a coronariák nitrit/nitrát tartalma az FDF csoportban  $246,5 \pm 36\%$ -os, még a kontrollcsoportban  $119,7 \pm 53\%$ -os emelkedést mutatott a preischaemiás alapértékhez viszonyítva.
- Az FDF-csoport 10%-ban, még a kontrollcsoport 44,4%-ban volt nem szignifikáns nitrit/nitrát mennyiség csökkenés a postschaemiás fázisban.
- Az ischaemiás periódusban FDF vagy 5% dextrózt kapott patkányok (2.csoport) coronariáinak nitrit/nitrát tartalma között nem volt szignifikáns eltérés egyik postschaemiát követő fázisban sem.

CBF	Alapáramlás		5-HT		GTN
	Kontroll	FDF	Kontroll	FDF	
Csoport					
A (ml/perc)	13.9 ± 2.1	12.9 ± 2.0	21.3 ± 2.2	22.0 ± 2.1	22.2 ± 2.1
B (%)↑			56.6 ± 5.1	74.8 ± 5.9	62.9 ± 4.6
C (ml/perc)	12.4 ± 2.5	11.8 ± 2.0	16.3 ± 2.3	16.0 ± 2.0	17.0 ± 2.2
D (%)↑			41.5 ± 6.1	39.6 ± 5.2	49.3 ± 6.5
E (%)	38.0 ± 3.3	40.0 ± 10.9	38.2 ± 3.1	35.6 ± 7.6	36.4 ± 2.1
					49.8 ± 5.3
					78.9 ± 5.6
					17.2 ± 5.0
					38.2 ± 9.1

3. táblázat

**CBF:** coronaria-áramlás

**A:** preischaemiás alapáramlás

**B:** a coronaria-áramlás emelkedése a preischaemiás alapáramláshoz képest

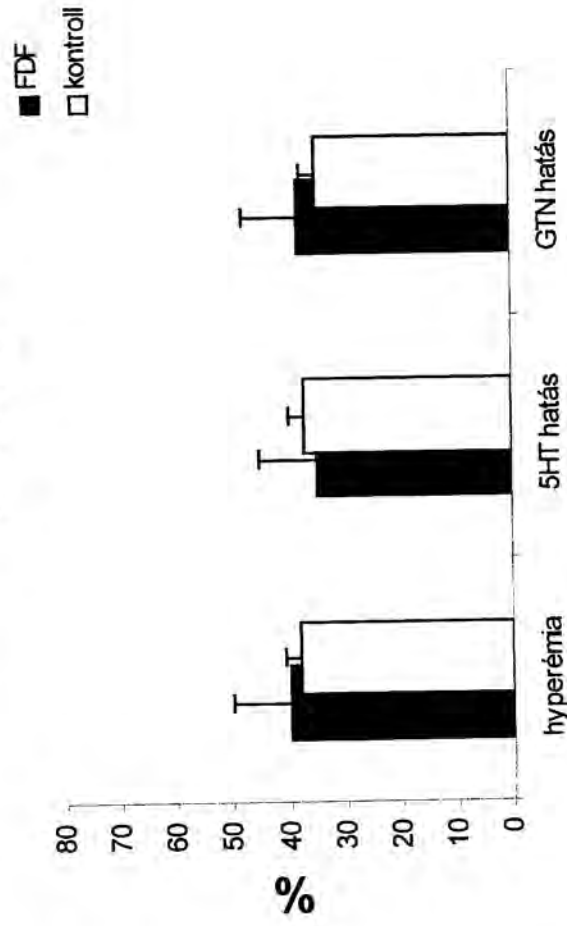
**C:** postischaemiás alapáramlás

**D:** a coronaria-áramlás emelkedése a postischaemiás alapáramláshoz képest

**E:** a kiváltott vasodilatációs válasz visszatérésének mértéke a preischaemiás válaszhoz képest, melyet 100%-nak veszünk.



### Postischaemiás coronaria-áramlás (II csoport)



12. ábra: Az ischaemiát követő spontán és kiváltott (5HT, GTN) coronaria-áramlás mértékének visszatérése a 100%-nak vett preischaemiás válaszreakcióhoz képest. A két csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik mérésorozatban sem (átlagok  $\pm$  SEM, FDF-csoport:  $n = 8$ , kontrollcsoport:  $n = 8$ ).

### III/2.2. Megbeszélés

Vizsgálatainkban in vitro Langendorff-modelleket alkalmaztunk. Az FDF-fel foglalkozó irodalmi adatok alapján a Langendorff-modellt főleg az FDF szivizom-anyagcsere változására kifejített hatásának vizsgálatára használták (41, 51, 80). Az FDF-nek közvetlen a coronaria-vasculatúrára kifejített befolyásáról eddig még nem sok adat áll rendelkezésünkre. Bár ismerve a modell hiányosságait (funkcionálisan nem dolgozó, in vitro szívpreparátum) és alkalmazásának korlátait (kb. egy órás vizsgálati időtartam), mégis hasznos felvilágosítást nyerhetünk az FDF közvetlen coronaria-keringésre gyakorolt hatásáról. A vizsgálatok során alkalmazott endothen dependens 5-HT használatával pedig a coronaria-endothelsejtek postschaemiás funkciójára való közvetlen FDF-hatást lehet nyomon követni.

A coronaria-endothelsejtek meghatározó szerepet játszanak a coronariák vasoregulációjában (81). Az endothelsejteket ért ischaemiás-reperfúziós inzultusok hatására bekövetkezett morfológiai és funkcionális változások, a coronariák postschaemiás működésének romlásában nyilvánulnak meg. Ez kísérletesen a vasodilatátorokra adott csökkent válaszreakcióban illetve inverz, vasoconstrictiós hatás kiváltásában figyelhető meg (82). Ezért a coronariában mért spontán és provokált áramlászváltozások, fontos információkkal szolgálnak az endothelsejtek funkcionális - és így közvetett módon morfológiai - kapacitásának megítélésére (Quillen és mtsai 1990).

Az eredmények kiértékelése során azt találtuk, hogy az első (intravénásan adott) kezelési sémát - mely az I, II-s klinikai csoportnak felel meg - alkalmazó Langendorff-modellekben, az FDF mutat bizonyos coronaria-endothel és simaizomsejt védő és regenerálódást elősegítő tulajdonságokat. Ezeket a tulajdonságokat az ischaemiás inzultust követően, a coronariák funkcionális működésének - az 5% dextrózzal kezelt modellekhez viszonyított összehasonlító - vizsgálatával bizonyítottuk.

A mérési eredmények ismeretében a következő megállapítások vonhatók le:

**a,** Az ischaemiát követő alapáramlás mértéke a preischaemiás alapáramláshoz viszonyítva kisebb mértékben csökkent az FDF-fel kezeltéknél, mint a kontrollcsoportnál.

**b,** A közvetlen postischaemiás fázisban vasodilatatorokra adott inverz vasokonstrictio nagyobb arányban jelent meg az FDF-t nem kapott csoportban.

**c,** A postischaemiában fellépő kompenzáló hyperaemia nagyobb volt az FDF-fel kezelt csoportban.

**d,** A vasodilatátorokra adott válaszkészség visszatéréseinek ideje és nagysága kedvezőbb volt az FDF-kezelésben részesült csoportban.

Ezek a következtetések mind egy kevésbé károsodott, így funkcionálisan jobban működő coronariarendszernek a következményei, melyek véleményünk szerint az FDF cardioprotektív és különösen coronaria-endothelsejt-védő hatásával magyarázhatóak. Azonban az első csoportban megfigyelt, klinikailag számottevő különbségek, hasonlóan a klinikai vizsgálatokban megfigyeltekhez, nem minden esetben feleltek meg a statisztikai szignifikancia kritériumának.

A második (cardioplegiában adott) kezelési sémát - mely az elvégzett III-s klinikai csoportnak felel meg - alkalmazó Langendorff-modellekben, nem voltak regisztrálhatók kedvező eredmények az FDF-t kapott csoportban az kontrollcsoporttal összehasonlítva.

A coronariákon átáramoltatott folyadékok nitrit/nitrát tartalmának meghatározása megegyező tendenciát mutatott, a coronaria-áramlás mért eredményeivel.

*Összefoglalva* megállapíthatjuk, hogy az in vitro állatkísérletes modellel végzett méréseink alátámasztják a klinikumban és a nukleotid metabolitok vizsgálatai során szerzett tapasztalatainkat. A hideg cardioplegiás oldatban alkalmazott FDF nem mutatott a cardiomyoprotekciónak betudható kedvező tulajdonságokat az 5%-os dextrózzal szemben. Ezzel ellentétben az intravénás formában alkalmazott FDF adagolási formánál megfigyelhető volt minimális kedvező hatás a funkcionális mérési paraméterek tekintetében.

### III/3. Izolt vena saphena érgyűrűkön mért, FDF kiváltotta cGMP-szintváltozás eredményei

#### III/3.1. Eredmények

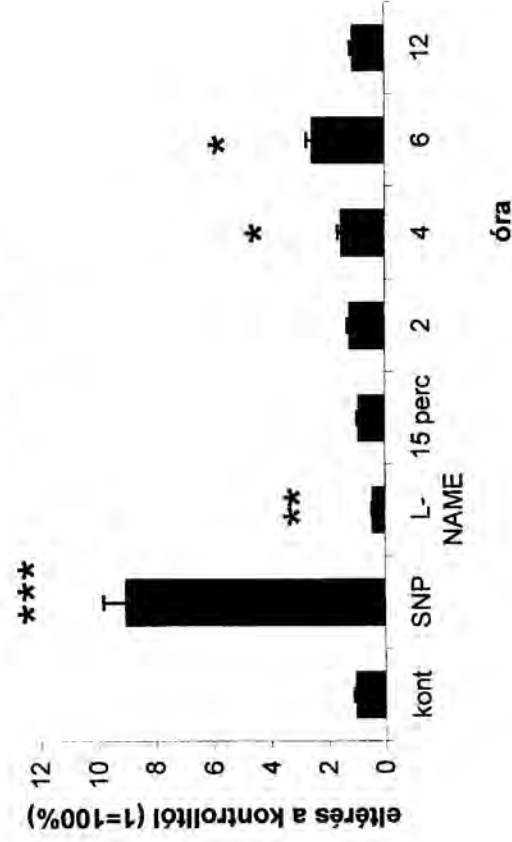
1. A koncentráció és időgörbe meghatározása során, 17 beteg vena saphenájából készített érgyűrűk szignifikáns ( $p < 0,001$ ), legalább 8-10-szeres cGMP-szintemelkedéssel reagáltak SNP jelenlétére, és szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) csökkent értékeket mutattak L-NAME alkalmazása során (összes betegszám: 19).

FDF által kiváltott szignifikáns cGMP-szintemelkedést találtunk a 4 és 6 óras inkubálási idő alkalmazásakor ( $p < 0,05$ ), még a 15 perces és a 2, 12 óras inkubálás során nem volt megfigyelhető szignifikáns cGMP-szintváltozás a kontroll érgyűrűkben mért szinthez képest (13. ábra).

Mind a három különböző FDF-koncentráció adása mellett megfigyelhető volt a 4. és 6. órákba ez az emelkedés, de a szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) legnagyobb cGMP-szintváltozást a 2,5 mM, végső koncentrációjú FDF alkalmazása váltott ki (14. ábra).

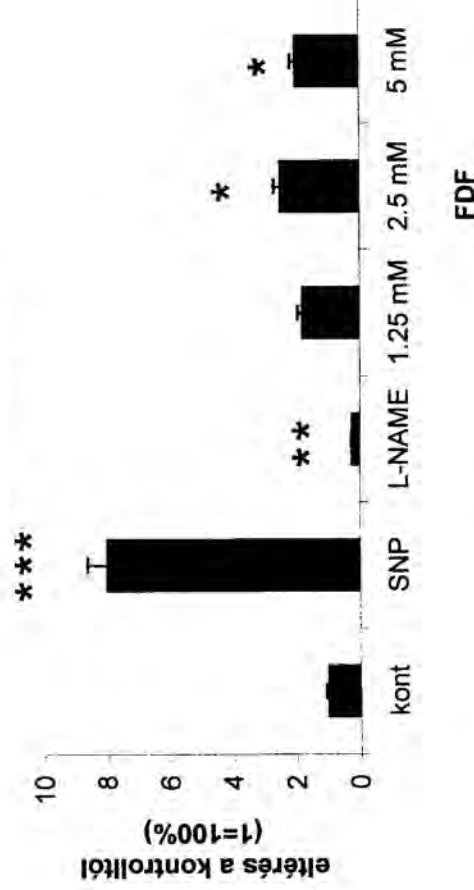
2 beteg vena saphenájából készített érgyűrűk nem reagáltak sem SNP sem L-NAME adására, ezért ezek eredményeit nem vettük figyelembe. Ezekben az érgyűrűkben az SNP hatására várt, nem endothelfüggő szignifikáns cGMP-szint emelkedés nem következett be, amely a vena darab simaizomsejt-rétegének károsodására, és ebből adódóan funkcionális működésének bizonytalanságára utal (83).

### A cGMP változása



13. ábra: A humán érgyűrűkben - azonos, 2,5 mM koncentrációjú - FDF által kiváltott cGMP-szintváltozás a kontrollhoz képest, különböző időpontokban. SNP = pozitív, L-NAME = negatív kontroll (átlagok  $\pm$  SEM, n = 18). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001

### A cGMP változása



14. ábra: A humán érgyűrűkben - különböző koncentrációjú - FDF által kiváltott cGMP-szintváltozás a kontrollhoz képest. Az inkubációs idő 6 óra volt. SNP = pozitív, L-NAME = negatív kontroll (átlagok  $\pm$  SEM, n = 12). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001



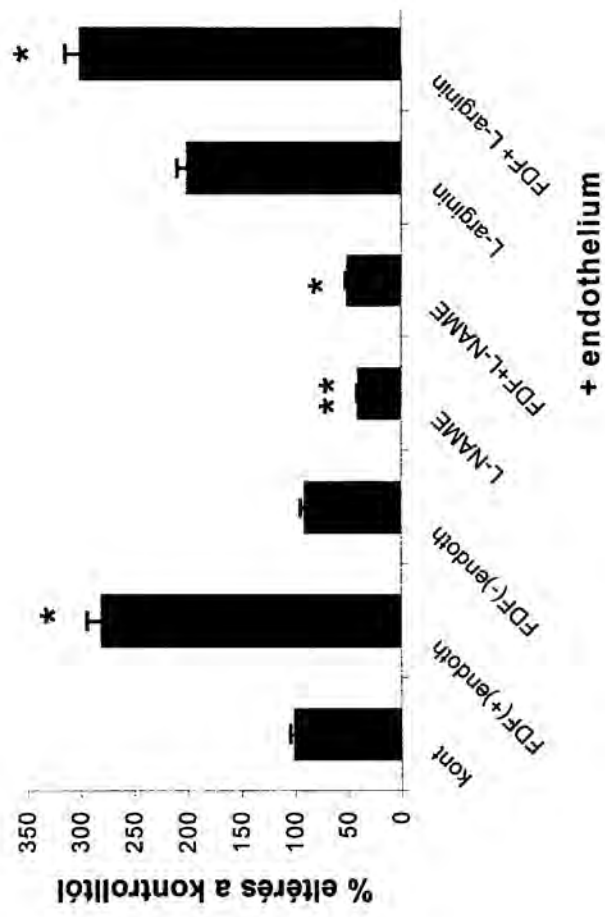
2-3. Az FDF, endothel-sejtek és az NO-cGMP rendszer kapcsolatának vizsgálata során, a következő eredményeket találtuk (összes betegszám: 25).

Az *intakt endothelréteggel* rendelkező érpreparátumokban az SNP szignifikáns cGMP emelkedést váltott ki (19,7-szeres,  $p = 0,0003$ ). Ugyancsak szignifikáns, de kisebb mértékű emelkedést okozott az FDF is (2,74-szeres,  $p < 0,05$ , 6 órás inkubációs idő, 2,5 mM koncentráció). Az L-NAME több mint 50%-os cGMP redukciót okozott ( $p < 0,01$ ). Az önmagában alkalmazott bradikinin és L-arginin szintén cGMP-szintemelkedést eredményezett az érgyűrűkben, de a statisztikai elemzések során ez nem érte el a szignifikancia kritériumát. Az FDF + L-arginin kombináció azonban szignifikáns cGMP-emelkedést okozott a kontroll érgyűrűkben spontán meglévő cGMP-szintjéhez képest ( $p < 0,05$ ). Az FDF + L-NAME kombináció alkalmazásakor viszont a mért cGMP-szint nem emelkedett, sőt szignifikánsan csökkent a kontroll értékekhez képest, ami az FDF cGMP-szintemelő hatásának elvesztését bizonyítja (15. ábra).

Az *elpusztult* illetve *károsodott endothelréteggel* rendelkező érpreparátumokban az SNP szintén szignifikáns (15,5-szeres,  $p = 0,004$ ) cGMP-emelkedést váltott ki, ezzel bizonyítva az erek megmaradt aktivitását és simaizomrétegének intaktágát. A bradikinin és L-NAME alkalmazása nem váltott ki cGMP emelkedést, illetve csökkenést (nem szignifikáns 136%-os emelkedés, illetve 91,2% csökkenés a kontrollhoz képest). Ez azt mutatta, hogy az erek endothelrétege elpusztult, vagy legalábbis olyan mértékben károsodott, hogy a funkcionális feladatainak elvégzésére nem volt képes. Ugyancsak nem okozott szignifikáns változást az FDF, illetve az FDF + L-arginin kombináció sem az érpreparátumokban. Azonban összehasonlítva az endothellel rendelkező érgyűrűkben az FDF, FDF + L-arginin által kiváltott cGMP-szintváltozást az endotheljétől megfosztott erekben találtakkal, szignifikánsan magasabb értékeket kaptunk az előbbieknél ( $p < 0,01$ ).

3 beteg vena-saphena érgyűrűi nem reagáltak sem SNP sem L-NAME adására, ezért ezek eredményeit nem vettük figyelembe. Ezekben az érgyűrűkben az SNP és L-NAME hatására várt, szignifikáns cGMP-szint változás nem következett be, amely a vena darab simaizom- és endothelsejt-rétegének károsodására, és ebből adódóan funkcionális működésének bizonytalanságára utal.

## Endothelium-dependens cGMP-változás



15. ábra: A humán érgyűrűkben FDF által kiváltott cGMP szint %-os változása a kontroll, endothellel rendelkező érgyűrűkből kimutatott alap cGMP mennyiségéhez képest (átlagok  $\pm$  SEM,  $n = 14$ ).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

**4-5-6.** Az FDF felépítésében résztvevő molekulák, valamint egyes a glikolízis folyamatában szereplő molekulák, és az FDF hatásmechanizmusában esetleg szerepet játszó fehérjeszintézis szerepének vizsgálatok a következő eredményeket kaptuk (összes betegszám: 30).

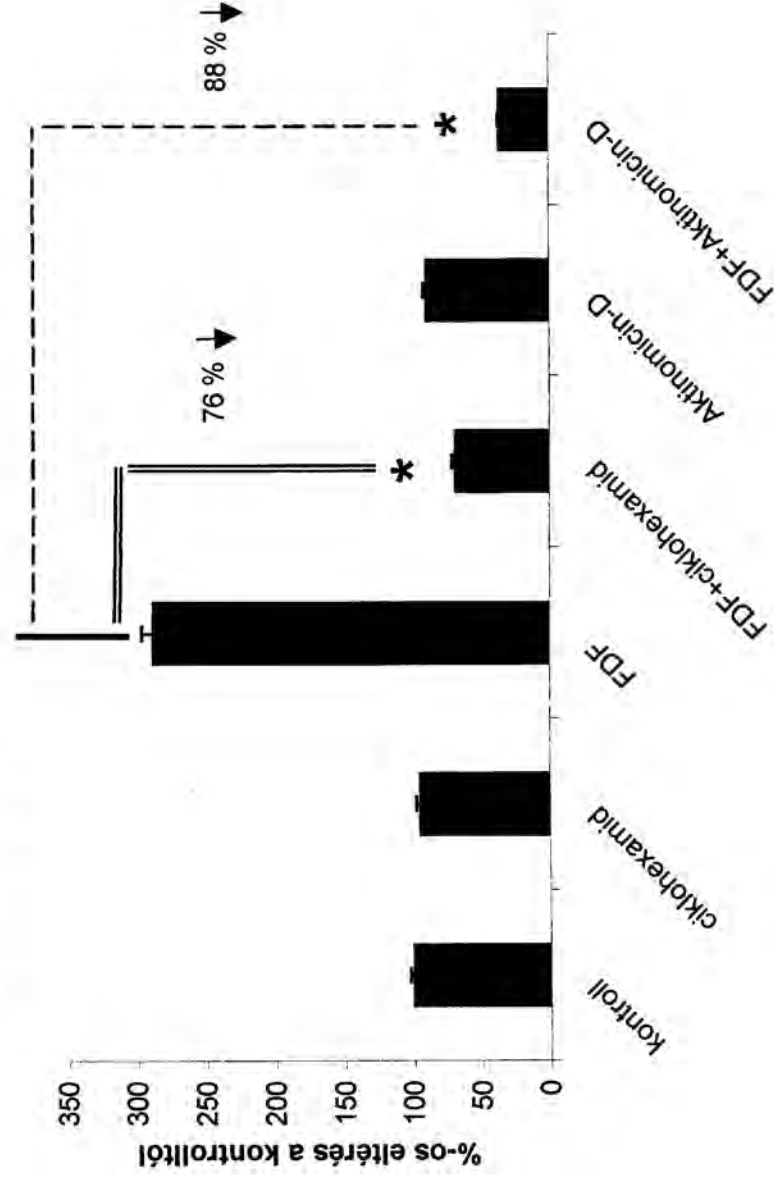
A *fruktóz*, és *foszfat* 2,5 mM-os végső koncentrációban nem okozott az FDF-hez hasonló cGMP szint emelkedést a humán érgyűrű preparátumokban, a kontrollértékhez képest.

A glikolízisben résztvevő *glükóz-6-foszfat* és *fruktóz-6-foszfat* nem váltott ki szignifikáns cGMP-emelkedést, és ugyanez volt megfigyelhető a *glükóz-1,6-difoszfat* alkalmazása során is. Ezzel szemben viszont a *fruktóz-2,6-difoszfat* az FDF-hez hasonló cGMP-szintemelkedést okozott (285%-os emelkedés a kontrollhoz képest,  $p < 0,05$ ).

Önmagában alkalmazott *aktinomicin-D* és *ciklohexamid* nem okozott szignifikáns cGMP-változást a kontrollhoz képest, míg az FDF ismételt szignifikáns cGMP-szintemelkedést váltott ki (288%-os,  $p < 0,05$ ). Ez a hatás blokkolható volt mind ciklohexamid paralell adásával (69,9% a kontrollhoz képest), ugyanakkor az aktinomicin-D még markánsabb, szignifikáns (35,9% a kontrollhoz képest,  $p < 0,05$ ) cGMP blokkolást váltott ki (16. ábra).

Az adatok értékelése során, 6 beteg véna saphénájából készült érgyűrűkkel végzett kísérletet ki kellett zárni a további összehasonlító vizsgálatokból. Ezekben az érgyűrűkben az L-NAME hatása várt endothelfüggő szignifikáns cGMP-szint csökkenés nem következett be, mely az endothel-réteg károsodására és ebből adódóan funkcionális működésének bizonytalanságára utal

### Fehérjeszintézis-dependens cGMP-szintváltozás



16. ábra: A transzkripció (aktinomicin-D) és a transláció (ciklohexamid) okozta gátló hatás vizsgálata, az FDF által - humán érgyűrűkben - kiváltott cGMP szint változása. A nyílak, a cGMP mennyiség %-os csökkenését mutatják, az FDF kiváltotta 100%-os szinthez képest. A \*  $p < 0,05$  jelölt értékeknel az eltérés szignifikáns volt, az FDF-fel kezelt érgyűrűkben lévő cGMP-szinthez képest (átlagok  $\pm$  SEM,  $n = 18$ ).

### III/3.2. Megbeszélés

Az FDF-fel végzett előzetes klinikai vizsgálataink azt mutatták (84), hogy a fruktóz-1,6-difoszfátot kapott betegek posztoperatív mért hemodinamikai értékei szignifikánsan jobb eredményeket mutattak, mint a kontroll - 5% dextrózt kapott - betegeké. Ezek a megfigyelések arra engedtek következtetni, hogy az FDF-nek direkte az erekre ható, vasodilatációt okozó hatása lehet. A modellkísérletek megtervezésénél arra törekedtünk, hogy a lehető legközelebbi kapcsolat álljon fent a klinikai körülményekkel, ezért humán vena saphena érdarabokat használtunk in vitro vizsgálataink során (85, 86).

Az eddigi irodalmi adatokból már ismert, hogy a vasodilatatio folyamatában a cGMP, mint szekunder messenger szerepet játszik (87, 88). Az erekben kialakuló cGMP-szintemelkedés két lehetséges úton jöhet létre. Egyrésztől, ha a foszfodiészteráz enzim gátlásával csökkentjük a cGMP gyors lebomlását, másrésztől ha a guanilat-cikláz (GC) enzim működésének fokozásával emeljük a cGMP-termelés sebességét. A mai ismereteink szerint a sejtekben két fajta GC enzim található. Az egyik a membránhoz kötött GC forma, mely a pitvari natriuretikus fehérje (ANP) szabályozása alatt áll, a másik a NOS-arginin-NO rendszer által szabályozott szolubilis GC típus (89, 90). Kísérleteink során a vasodilatációban kulcsszerepet játszó NO-cGMP rendszert használtuk negatív és pozitív kontrollként, miközben az FDF-fel való kapcsolatát is vizsgáltuk.

A kísérletek első fázisában láttuk, hogy az FDF szignifikáns cGMP-szintemelkedést okozott humán in vitro vena saphena érgyűrű preparátumokban. Az érgyűrűkben FDF által kiváltott maximális cGMP-emelkedés az inkubációt követő 6. órában érte el a csúcspontját. A leghatásosabb koncentráció a humán terápiában is alkalmazott 2,5 mM-os koncentráció volt. A kísérletek előre haladtával kiderült, hogy az FDF hatásossága intakt, funkcionáló endothelréteghez kötött. Ennek hiányában az FDF elveszti az erekre ható cGMP-szintemelő hatását. Az a kísérletes bizonyíték, hogy az FDF cGMP-szintemelő képességét az L-arginin fokozta, illetve az L-NAME blokkolta bizonyítja, az L-arginin-NO-cGMP rendszer részvételét az FDF in vitro humán érgyűrűkre kifejített vasodilatatív hatásában.



Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy az eddig ismert - anaerob glikolizist reaktíváló - FDF hatásmechanizmuson kívül, vagy amellett, egy FDF- NO-cGMP-vasoregulációs út is szerepet játszik az FDF terápiában tapasztalt kedvező hatásaiban. Ez a felismerés magyarázatként szolgálhat a klinikai vizsgálatok során talált „késleltetett” hemodinamikai hatásokra, amire a gyorsan változó metabolikus hatásmechanizmus elképzelés önmagában nem adhat feleletet. Az igaz, hogy a klinikai hatásosság kifejlődéséhez szükséges időintervallum jóval hosszabb, mint amit az érgyűrűkön végzett kísérleteinkben láttunk. Erre magyarázattal szolgálhat, hogy az érgyűrűkísérletek in vitro, a természetes környezetétől megfosztott véna darabokon történtek, szemben a komplex, in vivo a szervezetben lejátszódó folyamatokkal. Így az FDF kifejtette hatás eléréséhez - azonos koncentráció mellett - különböző hosszúságú időre van szükség.

További kérdések voltak, hogy az FDF molekula egésze, vagy mely komponense felelős az NO-rendszer aktiválásáért? A vasculatúrára kifejlesztett hatás az FDF specifikuma-e, vagy a glikolízis folyamatában résztvevő más intermedierek is képesek hasonló, cGMP-emelő válasz kiváltására?

A vizsgálatokból kiderült, hogy a glikolízisben a PFK-enzim előtt szerepet játszó intermedierek, a glükózt tartalmazó glükóz-1,6-difoszfáthoz hasonlóan nem okoztak cGMP-szintváltást az érgyűrűkben. Az FDF molekula felépítésében résztvevő komponensek önmagukban alkalmazva szintén nem eredményeztek cGMP-változást ami azt bizonyítja, hogy a hatás kiváltásához a fruktóz és foszfát csoportok egyöntetű jelenléte szükséges. Viszont a foszfát csoport elhelyezkedése a molekulán belül, nem befolyásolja az FDF érrendszeren kiváltott vasodilatatív hatását. Ezt a fruktóz-2,6-difoszfáttal végzett kísérleteink bizonyították.

Megismerve az FDF-NO-vasodilatatio rendszer kapcsolatát, kíváncsiak voltunk, hogy szerepe van-e a - glikolitikus folyamatoknál hosszabb időt igénybe vevő biokémiai folyamatnak - a proteinszintézisnek az FDF-indukálta, és 6 óra múlva megjelenő maximális cGMP-emelkedés kiváltásában. A proteinszintézis különböző szintjén ható aktinomicin-D és ciklohexamid alkalmazásakor azt találtuk, hogy az FDF-NO-cGMP-folyamat gátlható mind a transzkripció, mind a transláció szintjén, ami azt bizonyította, hogy a folyamatban a proteinszintézisnek kulcsfontosságú szerepe van.

A fent említett glükóz-6-foszfát és fruktóz-6-foszfát glikolízisben résztvevő intermedierekkel és a proteinszintézist gátló anyagokkal végzett vizsgálatainkból azt a következtetést vontuk le, hogy az FDF-kiváltott NO-cGMP-rendszeren keresztül érvényesülő vasodilatatív hatás kialakulásában a transzkripció, transzláció folyamatoknak fontos szerepe van, ezzel szemben a gliolitikus folyamatok normál hatásfokú működése önmagában nem elegendő a vasodilatatív hatás kiváltásához.

*Összefoglalva* elmondhatjuk, hogy az FDF-nek van egy eddig még nem ismert, a vasculatúrán megjelenő, endothelfüggő, az NO-cGMP-rendszeren keresztül ható, a proteinszintézis szintjén gátolható vasodilatatót kiváltó hatásmechanizmusa is, az eddig megismert metabolikus, extraenergiát termelő hatásmechanizmus mellett.

#### IV. Összefoglalás, konklúziók

Az ischaemiás állapotok okozta sejtkárosodások az érintett szervek, szervrendszerek funkcionális károsodásához, majd működőképtelenségéhez vezetnek. A terápiás beavatkozások célja az ischaemia mielőbbi megszüntetése és a szervek funkciójának lehető legteljesebb mértékű visszaállítása. A közvetlen postschaemiás, reperfüziós szakban azonban újabb inzultus éri az amúgy is károsodott szöveteket, ami további funkcióromlásban mutatkozik meg. Ezt a kettős károsító hatást jelenleg elkerülni nem tudjuk. A felmerülő probléma megoldására háromféle megközelítési mód kínálkozik.

1. Az ischaemia mielőbbi megszüntetése.
2. A reperfüziós károsító tényezők hatásának kivédése.
3. Az inzultusnak kitett szövetek védelme.

Az ISZB-ben szenvedő betegeknél, az ischaemiás állapot megszüntetése céljából elvégzett coronaria revascularisatiós műtétekkor jelentkező ischaemiás-reperfüziós károsodásoknak kitett szövetek védelme érdekében, a szervezetben természetes formában is megtalálható fruktóz-1,6-difoszfátot alkalmaztuk klinikai vizsgálatainkban. Az irodalomból már korábban megismert, az FDF ischaemiás körülmények között kifejtett, a sejtek számára extraenergiát biztosító hatásmechanizmusát elfogadva kezdtük meg humán kísérleteinket (91).

Az in vitro vizsgálataink első lépésében, a sinus coronariusból nyert vér - HPLC technikát alkalmazó (92) - nukleotid metabolizmusának elemzésével felvilágosítást nyertünk, a szívben zajló energiaképzés folyamatáról (93). Ezen vizsgálat elvégzésével egyben információt kaptunk, a kialakuló ischaemiás-reperfüziós károsodás okozta szivanyagsere mechanizmusának változásáról is (94).

Az klinikai eredmények értékelésénél azt találtuk, hogy az FDF csak kombinált adagolási formában - ischaemia előtt intravénásan + cardioplegiás oldathoz adva - mutatott szignifikáns előnyös hatásokat a kontrollként használt 5%-os dextrózzal szemben. Önmagában a cardioplegiás oldatban alkalmazva semmilyen, míg intravénásan alkalmazva kismérvű kedvező klinikai hatást figyeltünk meg.

Ezt a megállapítást a nukleotid metabolitok vizsgálatával kapott eredményeink is alátámasztották.

A humán mérésekben regisztrált kedvező hatások, elsősorban a hemodinamikai paraméterek tekintetében voltak számottevőek, melyek az irodalmi adatokkal szemben inkább későbbi, a 6.-12.-18. posztoperatív órákban jelentkeztek. Ez a megfigyelés önmagában nem magyarázható az eddig megismert, extraenergiát biztosító elmélettel önmagában. Ezen felmerülő kérdés megválaszolása és az FDF közvetlen a cardiopulmonális vasculatúrán megjelenő direkt hatásának vizsgálata céljából határoztuk el és terveztük meg in vitro humán érgyűrű és állatkísérletes modelljeinket.

A kísérletek eredményei azt bizonyították, hogy az FDF-nek az ismert extra energiát biztosító hatásmechanizmusa mellett van egy további, az érrendszerre kifejtett L-arginin-NO-cGMP-vonalon keresztül ható, endothelfüggő hatása is, mely a proteinszintézis gátlásával blokkolható. Továbbá megállapítottuk, hogy az FDF hatása kifejezetten az endothelsejtek védelmén keresztül érvényesül, vagy ép endothel-funkciót feltételez. Ezt az állítást, a coronaria-áramlás Langendorff-kísérletek postischaemiás fázisában mért 5-HT-re adott válasz, valamint az HPLC vizsgálatok során talált hipoxantin-mennyiség változásának kinetikája bizonyították. Természetesen nem vethetjük el a már eddig ismert metabolikus úton érvényesülő hatásmechanizmus szerepét sem, mivel az HPLC technikával történt nukleotid metabolikus folyamatok vizsgálata, előnyös hatásokat tárt fel a preischaemiás periódusban intravénán adott FDF alkalmazása során.

Véleményünk szerint, a metabolikus és az NO-rendszeren keresztül, vasodilatatót kiváltó két hatásmechanizmus együtt játszik szerepet az FDF klinikumban tapasztalt hatásaiban. A korai pozitív hatásokért elsősorban a metabolikus út, míg a későbbi előnyökért inkább a vasoregulációs hatás lehet felelős. A kettő együtt, de különböző arányban érvényesül a posztoperatív idő előrehaladtával. Ezen elképzelésünk magyarázatot adhat egyrészt a humán klinikai vizsgálatokban észlelt eredményekre, másrészt „eredménytelenségekre” is.



A fent említett vizsgálataink alapján a következő *konklúziókat* vonhatjuk le.

1. ***A hideg cardioplegiában alkalmazott FDF hatástalan,*** egyrészt, mert a glikolitikus enzimek működése az alacsony hőmérséklet miatt lelassult, vagy gátolt, így a metabolikus út nem érvényesült, vagy legfeljebb kis mértékben. Másrészt, a vasoregulációs hatás - hosszabb időt igénybe vevő - érvényesüléséhez nem volt elegendő időtartam.
2. ***Rövid idővel, 30 perccel az ischaemiás inzultus előtt alkalmazott intravénás FDF-adagolás kismértékben hatásos,*** mert a metabolikus út ugyan már kezd érvényre jutni, de ez önmagában még nem elegendő a maximális, klinikailag is megjelenő teljes hatásfok eléréséhez, mert az eltelt idő rövidsége miatt a vasoregulációs hatás még nem jelentkezett teljes mértékben.
3. ***A kombinált alkalmazási mód azért volt hatásos,*** mert összeadódtak a két hatásmechanizmus kezdeti majd későbbi hatásai, melyek már szignifikáns, pozitív klinikai eredményekben is megmutatkoztak.

Ezen kettős hatásmechanizmus mellett természetesen nem zárhatók ki egyéb, eddig már megismert és meg nem ismert FDF hatások érvényesülése sem (95, 96). A jövőben tervezett vizsgálataink szempontjából kiemelkedő fontossággal bír, a szív szövettanilag elkülönített részeire, receptorokon keresztül ható egyéb cukormolekulák hatásának felismerése és vizsgálata (Bárdosi és mtsai 1990), amely a legnagyobb valószínűséggel részben szintén szerepet játszhat az FDF kiváltotta cardioprotektív hatásmechanizmus magyarázataként (97). Ennek a kérdésnek a megválaszolására további in vitro kísérletek elvégzése adhatnak majd feleletet.



## V. Az új eredmények összefoglalása és klinikai jelentősége

**Klinikai vizsgálataink** arra hívták fel a figyelmet, hogy a várakozással ellentétben csak a kombinált, intravénás-cardioplegiás alkalmazási mód mellett volt az FDF-nek egyértelmű, a klinikumban is megjelenő előnyös hatása a kontrollként használt 5%-os dextrózzal szemben. Ezen kedvező hatások elsősorban a hemodinamikai eredmények tekintetében voltak szembetűnőek és a posztoperatív szak 6.-12.-18. órájában jelentkeztek.

A klinikai vizsgálatok során a sinus coronariusból és arteria radialisból nyert vérminták **HPLC**-vel történt elemzése azt bizonyította, hogy a csak cardioplegiában alkalmazott FDF adás nem okoz a metabolikus anyagcsere szintjén jelentkező kedvező hatásokat a kontrollként alkalmazott 5%-os dextrózhhoz képest. Ezzel szemben az intravénásan adagolt FDF, szignifikáns előnyöket mutatott a nukleotid metabolizmus terén.

Az *in vitro állatkísérletes* modelljeinkből kapott eredmények igazolták az intravénásan adott FDF-nek a közvetlen coronaria-keringsére kifejtett kedvező hatását, melyet a coronariák endothelsejjeinek védelmén keresztül váltott ki, összhangban az HPLC vizsgálatok eredményeivel. Ugyanez a kedvező hatás nem volt megfigyelhető az FDF-t tartalmazó hideg cardioplegiás oldat alkalmazása során.

Az *in vitro humán érgyűrűkőn* végzett kísérleteink az FDF-nek egy új, eddig még nem ismert a vasculatúrán jelentkező regulációs, vasodilatatív hatását tárták fel. Ezen hatásmechanizmus egy endothelfüggő regulációs folyamat, amely az L-arginin-NO-cGMP rendszeren keresztül hat, proteinszintézis gátlókkal blokkolható és a teljes hatásának kialakulása minimum 4-6 órát vesz igénybe. Az FDF maximális hatásfokának eléréséhez mind a fruktóz-, mind a foszfát-csoport jelenléte szükséges, de a foszfát FDF-molekulán belül elfoglalt helye a hatását nem befolyásolja. Az aerob glikolízisben szerepet játszó egyéb molekulák nem mutattak az NO-cGMP rendszeren keresztül érvényesülő vasodilatatív hatást, ami azt bizonyítja, hogy az újonnan megismert, FDF-re jellemző vasoregulációs hatásmechanizmusban a glikolízis folyamatának nincs elsőrangú szerepe.

Összegezve elmondhatjuk, hogy megismerve az FDF hatásmechanizmusának egy újabb tulajdonságát, és felhasználva az in vitro vizsgálatokban szerzett ismereteket, vissza kell térni ismételt klinikai vizsgálatok megtervezéséhez. Így pontosabb választ kaphatunk az FDF klinikai alkalmazási módja és dozírózása tekintetében.

A klinikai vizsgálatokkal megegyezően mind az in vitro állatkísérletes, mind a HPLC eredmények a cardioplegiában alkalmazott FDF hatéталanságát bizonyították. Ennek ismeretében inkább a preoperatív, majd az aorta leszorítást követő reperfüziós szakban alkalmazott intravénás adagolási módot tartjuk hasznosabbnak, szemben a bizonytalan és nem egyértelműen hatásos hideg cardioplegiában alkalmazott eljárási móddal.

Véleményünk szerint a további klinikai vizsgálatoknak a következő változtatásokra és kérdésekre kell koncentrálniuk.

1. Vizsgálati eredményeink alapján bebizonyosodott, hogy az FDF hatásának kialakulásához minimum 4-6 óra szükséges. Ezért az FDF intravénás adását 4-6 órával az extracorporalis keringés elindítása előtt kell elkezdeni.
2. Az FDF intravénás adásának folytatása az aorta leszorítás felengedését követően, az ATP képzésre kifejtett pozitív hatás folyamatos fenntartása érdekében.
3. Az FDF hideg cardioplegiában történő alkalmazásának elhagyása.
4. Az FDF-NO-rendszer között talált kapcsolatban kulcsszerepet játszó FDF-L-arginin szinergizmus klinikai kihasználása.
5. Az FDF hatékonyságának összevetése a szintén cardioprotekcióra használt glükóz-inzulin-kálium-oldattal, a placeboként használt 5%-os dextróz helyett.

Ezen vizsgálatokból szerezhető új eredmények és az in vitro elvégzendő kísérletek segítségével további fontos információkat nyerhetünk az FDF ischaemiás reperfüziós körülmények között kifejtett cardioprotektív hatásáról. Így a klinikai alkalmazása során elérhető az FDF által kiváltott maximális cytoprotektív hatás, amely hozzájárulhat a bevezetőben ismertetett, évtizedek óta tartó erőfeszítések sikeréhez a cardioprotekció területén.

## VI. Irodalomjegyzék

1. Janssen EWL et al.: CABG without CPB using the octopus method: results in the first 100 patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998, **116**: 60-70.
2. Nayler WG, Panagiotopoulos S, Elz JS, Daly MJ.: Calcium-mediated damage during post-ischemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1988, **20 ( suppl.II. )**: 41-54.
3. Nayler WG, Ferrari R, Williams A.: Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic reperfused myocardium. *Am. J. Cardiol.* 1980, **46**: 242-248.
4. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG.: Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovascular Res.* 1997, **33**: 243-257.
5. Neely JR.: Metabolic disturbances after coronary occlusion. *Hosp. Prac.* 1989, **24**: 81-96.
6. Forman MB, Puett DW, Virmani R.: Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1989, **13**: 450-459.
7. Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G III, Lefer AM.: Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *Circulation.* 1990, **82**: 1402-12.
8. Maxwell SRJ, Lip GYH.: Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestation and therapeutic options. *Int. J. Cardiology.* 1997, **58**: 95-117.

9. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB, Reimer KA.: The "no-reflow" phenomena after temporary coronary occlusion in the dog. *J. Clin. Invest.* 1974, **54**: 1496-1508.
10. Beyersdorf F, Buckberg GD.: Myocardial protection in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1993, **5(2)**: 151-161.
11. Kirkin JW, Digerness SB, Fontan FM.: Controlled aortic root reperfusion in cardiac surgery. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1993, **5(2)**: 134-140.
12. Drew CE, Anderson IM.: Profound hypothermia in cardiac surgery: Report of three cases. *Lancet.* 1959, **1**: 748-750.
13. Gerbode F, Melrose D.: The use of potassium arrest in open cardiac surgery. *Am. J. Surg.* 1958, **96**: 221-227.
14. Waldhausen JA, Braunwald NS, Bloodwell RD.: Left ventricular function following elective cardiac arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1960, **39**: 799-807.
15. McFarland JA, Thomas LB, Gilbert JW.: Myocardial necrosis following elective cardiac arrest induced with potassium citrate. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1960, **40**: 200-208.
16. Buckberg GD, Hottenrott CE.: Ventricular fibrillation: Its effect on myocardial flow, distribution and performance. *Ann. Thorac. Surg.* 1975, **20**: 76-85.
17. Hottenrott CE, Towers B, Kurkji HJ.: The hazard of ventricular fibrillation in hypertrophied ventricles during cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1973, **66**: 742-753.
18. Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL.: Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1977, **73**: 87-109.



19. Hensley FA, Martin DE.: A Practical Approach to Cardiac Anesthesia. *Editorial: Megley N.* 1995, **2**: 565-578.
20. Rousou JA, Parker T, Engelman RM.: Phrenic nerve paresis associated with the use of iced slush and the cooling jacket for topical hypothermia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1985, **89**: 921-925.
21. Parlington MT, Acar C, Buckberg GD.: Studies of retrograde cardioplegia. II. Advantages of antegrade/retrograde cardioplegia to optimize distribution in jeopardized myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1989, **97**(4): 613-622.
22. Atkins CW.: Preservation of intraventricular septal function in patients having coronary artery bypass grafts without cardiopulmonary bypass. *Am. Heart* 1984, **107**: 304-309.
23. Buffolo E.: Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.* 1996, **61**: 63-66.
24. Janssen EWL.: Less invasive off-pump CABG using a suction device for immobilization: the octopus method. *Eur. J. Cardioth. Surg.* 1997, **12**: 406-412.
25. Spooner TH.: CABG on the beating heart with the octopus: a north american experience. *Ann. Thorac. Surg.* 1998, **66**: 1032-1035.
26. Bálint P.: Orvosi élettan. 1986, **1**: 346-352.
27. Kubler W, Spieckermann PG.: Regulation of glycolysis in the ischemic and anoxic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1969, **1**: 351-377.
28. Opie LH.: The Heart. *Grune & Strotton kiadásában New York.* 1984, 111-112.



29. Opie LH, Owen P.: Glycolysis in acute experimental myocardial infarction: pathways of metabolism and preliminary results. *Res. Adv. Card. Structure & Metab.* 1973, **2**: 567-579.
30. Mansour TE.: Studies on heart phosphofructokinase. Purification, inhibition and activation. *J. Biol. Chem.* 1963, **238**: 2285-2292.
31. Neely JR, Grotyohann LW.: Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ. Res.* 1984, **55**: 816-824.
32. Smolenski RT, Lachno DR, Ledingham SJM, Yacoub MH.: Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *Journal of Chromatography.* 1990, **527**: 414-420.
33. Bunger R, Soboll S.: Cytosolic adenylates and adenosine release in perfused working heart. Comparison of whole tissue with cytosolic non-aqueous fractionation analyses. *Eur. J. Biochem.* 1986, **159**: 203-213.
34. Deussen A, Borst M, Kroll K, Schrader J.: Formation of S-adenosylhomocystein in the heart. II: A sensitive index for regional myocardial underperfusion. *Circ. Res.* 1988, **63**: 250-261.
35. Smolenski RT, Schrader J, de Groot H, Deussen A.: Oxygen partial pressure and free intracellular adenosine of isolated cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 1991, **260**: C708-C714.
36. Geisbuhler T, Altschuld RA, Trewyn RW, Ansel AZ, Lamka K, Brierley GP.: Adenine nucleotide metabolism and compartmentalization in isolated adult rat heart cells. *Circ. Res.* 1984, **54**: 536-546.

37. Smolenski RT, Yacoub MH.: Liquid chromatographic evaluation of purine production in the donor human heart during transplantation. *Biomedical chromatography*. 1993, **7**: 189-195.
38. Hofmann E.: The significance of phosphofructokinase to the regulation of carbohydrate metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1976, **75**: 2-68.
39. El-Badry Am, Otani A, Mansour TE.: Studies on heart phosphofructokinase : role of fructose-1,6-diphosphate in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 1987, **248**: 557-563.
40. Hassinen IE, Nuutinen EM, Ito K, Nioka S, Lazzarino G, Giardina B, Chance B.: Mechanism of the effect of exogenous fructose-1,6-diphosphate on myocardial energy metabolism. *Circulation*. 1991, **83**: 584-593.
41. Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, Lazzarino G, Nutinen M, Starnes JW, Giardina B.: Oxygen radical injury and loss of high-energy compounds in anoxic and reperfused rat heart : prevention by exogenous fructose-1,6-biphosphate. *Free Rad. Res. Commun.* 1990, **10**: 167-176.
42. Markov AK, Finch CD, Hellem HK.: Prevention of superoxide generation and inhibition of oxigen burst in human and canine neutrophils with fructose-1,6-diphosphate (FDP). *Microcirculation: An Update*, edited by Tsuchiya M et al. New York: Elsevier, 1987, **vol.1**: 691-696.
43. Bickler PE, Kelleher JA.: Fructose-1,6-biphosphate stabilizes brain intracellular calcium during hypoxia in rats. *Stroke*. 1992, **23**: 1617-1622.
44. Rizzoli V, Battilana G, Galzigna L.: Fructose-1,6-diphosphate counteracts ethanol-stimulated calcium uptake in isolated BHK cells. *Molecular Cell Biochem. Func.* 1990, **8**: 39-47.
45. Schinetti ML, Lazzarino G.: Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose-1,6-diphosphate. *Biochem Pharmacol.* 1986, **35**: 1762-1764.

46. Akimitsu T, White JA, Carden DL, Gute DC, Korthuis RJ.: Fructose-1,6-biphosphate or adenosine attenuate leucocyte adherence in posts ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1995, **269**: H1743-1751.
47. Schinetti ML, Greco R, Lazzarino G, Bertelli A.: Inhibiting effect of fructose-1,6-diphosphate on rat mast cell histamine release. *Int. J. Tissue React.* 1983, **5**: 55-59.
48. Tavazzi B, Starnes JW, Lazzarino G, DiPierro D, Nuutinen EM, Giardina B.: Exogenous fructose-1,6-biphosphate is a metabolizable substrate for the isolated normoxic rat heart. *Basic. Res. Cardiol.* 1992, **87**:280-289.
49. Hardin CD, Roberts TM.: Metabolism of exogenously applied fructose-1,6-biphosphate in hypoxic vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1994, **267**: H2325-H2332.
50. Gregory GA, Yu ACH, Chan PH.: Fructose-1,6-biphosphate protects astrocytes from hypoxic damage. *Cereb. Blood Flow and Metab.* 1989, **9**: 29-34.
51. Shapiro JI, Schrier RW, Chan L.: Mechanism for the protective effect of fructose-1,6-diphosphate (FDP): a perfusion and in vivo P-31 Nuclear magnetic resonance (NMR) study (abstr.). *Proceedings of Xth International Congress of Nephrology, London.* 1987, **10**: 476.
52. Lazzarino G, Nuutinen ME, Tavazzi B, Cerroni L, Di Pierro D, Giardina B.: Preserving effect of fructose-1,6-diphosphate on high-energy phosphate compounds during anoxia and reperfusion in isolated Langendorff-perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1991, **23**: 13-23.
53. Benesch R, Benesch RE.: Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature.* 1969, **221**: 618-622.
54. Rao MR, Olinde KD, Markov AK.: Protection from amphotericin B-induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacology.* 1997, **95**: 217-220.

55. Marchionni N, Conti A, DeAlferi W, DiBari M, Ferrucci L, Lombardi A, Moschi G, Pini R, Vannucci A.: Hemodynamic and electrocardiographic effects of fructose-1,6-diphosphate in acute myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* 1985, **56**: 266-269.
56. Yi WS, Hong DR.: Effect of fructose-1,6-diphosphate on mortality in patients with acute myocardial infarction. *Abstract submitted to American College of Cardiology 41<sup>st</sup> Scientific Session.* 1992, 904-963.
57. Markov AK, Oglethorpe NC, Blake TM, Lehan PH, Hellem HK.: Hemodynamic, electrocardiographic and metabolic effects of fructose-1,6-diphosphate on acute myocardial ischemia. *Am.Heart.J.*1980, **100**: 639-646.
58. Grandi AM, Muggia C, Barzizza F, Venco A, Finardi G.: Improved left ventricular function after short-term treatment with fructose-1,6-diphosphate: echocardiographic study in chronic ischemic heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin. Therap.* 1988, **10**: 372-380.
59. Markov AK, Brumley MA, Figueroa A, Skelton TN, Lehan PH.: Hemodynamic effects of fructose-1,6-biphosphate in patients with normal and impaired left ventricular function. *Am. Heart J.* 1997, **133**: 541-549.
60. Munger MA, Botti RE, Grinblatt MA, Kasmer RJ.: Effect of intravenous fructose-1,6-biphosphate on myocardial contractility in patients with left ventricular dysfunction. *Pharmacotherapy.* 1994, **14**: 522-528.
61. Markov AK, Didlake RH.: Improvement of hemodynamics and pulmonary function following fructose-1,6-diphosphate administration in ARDS patients. *Microcirculation.* 1987, An update, **Volume 1**: 173-177.
62. B Riedel, E Hill, G Ellis, A.W. Fox, D. Royston.: Myocardial protection and performance preservation by fructose-1,6-diphosphate following cardiac surgery. *Anesthesiology.* 1997, **87**: A86. (Abstract).

63. Amrani M, Oshea J, Allen NJ, Harding SE, Jayakumar J, Pepper JR, Moncada S, Yacoub MH.: Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J. Physiol.* 1992, **456**: 681-687.
64. Mankad PS, Chester AH, Yacoub MH.: 5-Hydroxytryptamine mediates endothelial-dependent coronary vasodilatation in the isolated rat heart by the release of nitric oxide. *Cardiovascular Res.* 1990, **25**: 244-248.
65. Chester AH, Borland JAA, Buttery LDK, Mitchell JA, Hafizi S, Hoare GS, Polak JM, Yacoub MH.: Induction of nitric oxide synthase in human vascular smooth muscle: interaction between proinflammatory cytokines. *Cardiovascular Res.* 1998, **38**: 814-821.
66. Schmidt HHHW, Wilke P, Evers B, Böhme E.: Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovin brain cytosol. *Biochemical and Biophysical Research Comm.* 1989, **165**: 284-291.
67. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991, **109**: 22-36
68. Gál J, Marczin N, Schmidt I, Tekeres M.: Potentiation of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) synthesis by serum in cultured vascular smooth muscle cells (rat). *Monduzzi Editore International Proceedings Division*, 1995, **2**: 21-25.
69. Bundy R, Marczin N, Chester AH, Yacoub M.: Differential regulation of DNA synthesis by nitric oxide and hydroxyurea in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1999, **277**: H1799-H1807.
70. Brooker G, Harper JF, Terasaki WL, Moylan RD.: Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1979, **10**: 1-33.



71. Gál J, Riedel BJ, Smolenski T, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) prevents myocardial adenine nucleotide degradation in cardiac surgery. *Anesthesiology*. 1998, **89**: No 3A, (absztrakt).
72. Marchionni N, Mosci G, DiBari M, Ferruci L, Paoletti M, Salani B, Fattiuoli F.: Improved exercise tolerance by IV fructose-1,6-diphosphate in chronic stable angina pectoris. *J. Clin. Pharmacol.* 1988, **28**: 807-811.
73. Grandi AM, Muggia C, Barzizza F, Venco A, Finardi G.: Improved left ventricle function after short-term treatment with fructose-1,6-diphosphate: echocardiographic study in chronic ischemic heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin. Therap.* 1988, **10**: 372-380.
74. Smolenski RT, Lachno DR, Yacoub MH.: Adenine nucleotide catabolism in human myocardium during heart and heart-lung transplantation. *Eur. J. Cardiothoracic Surg.* 1992, **6**: 25-30.
75. Smolenski RT, Yacoub MH.: Nucleotide metabolism in human cardiomyocytes and endothelium - implications for protection of the heart during cardiac surgery. *In: Abd-Elfattah ASA, Wechsler AS ( eds ): Purines and myocardial protection. Norwell, MA, U.S.A. Kluwer Academic Publishers.* 1995, pp. 55-80.
76. Smolenski RT, Skladanowski AC, Perko M, Zydovo MM.: Adenylate degradation product release from the human myocardium during open heart surgery. *Clin. Chim. Acta.* 1989, **182**: 63-74.
77. Raatikainen MJP, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE.: Contribution of endothelium and cardiomyocytes to hypoxia-induced adenosine release. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1994, **26**: 1069-1080.
78. Andreoli SP.: Mechanisms of endothelial cell ATP depletion after oxidant injury. *Pediatr. Res.* 1989, **25**: 97-101.

79. Smolenski RT, Kochan Z, McDouall R, Page C, Seymour A-ML, Yacoub MH.: Endothelial nukleotide catabolism and adenosine production. *Cardiovascular Res.* 1994, **28**: 100-104.
80. Lazzarino G, Tavazzi B, Nuutinen M, Giardina B.: Protective effects of exogenously administered fructose-1,6-diphosphate from ischemia reperfusion damage induced on isolated rat heart. *Abstracts, Italian J. Biochem.* 1989, **38**: 251A-253A.
81. Burnett JC Jr.: Coronary endothelial function in health and disease. *Drugs.* 1997, **53**: 20-29.
82. Shepherd JT, Katusic ZS, Vedernikov Y.: Mechanism of coronary vasospasm: Role of endothelium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1991, **23**: 125-134.
83. Riedel B, Gál J, Hoare G, Marczin N, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) enhances human vascular cGMP production. *Anesthesiology.* 1998, **A601**, **89**: No 3A, (absztrakt).
84. Gál J, Riedel BJ, Bogár L, Tekeres M, D Royston.: Fruktóz-1,6-difoszfát alkalmazása coronaria bypass műtét közben. *Aneszt. és Intenzív Ter.* 1999, **2**: 78-86.
85. Thorin-Trescases N, Hamilton CA, Reid JL.: Inducible L-arginine/nitric oxide pathway in human internal mammary artery and saphenous vein. *Am. J. Physiol.* 1995, **37**: H1122-H1132.
86. Berrazueta JR, Salas E, Amado JA, Sanchez de Vega MJ, Poveda JJ.: Induction of nitric oxide synthase in human mammary arteries in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, **251**: 303-305.
87. Marczin N, Ryan US, Catravas JD.: Effects of oxidant stress on endothelium – derived relaxing factor – induced and nitrovasodilator – induced cGMP accumulation in vascular cells in culture. *Circ. Res.* 1992, **70**: 326-340.

88. Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM.: Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc. Acad. Sci. (USA)*, 1991, **88**: 2166-2170.
89. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S.: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 1989, **86**: 5159-5162.
90. Schmidt HHHW, Lohman SM, Walter U.: The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1993, **1178**: 153-175.
91. Jones JW, Gionis TA, Nichols RL, Webb W.: Myocardial preservation with fructose-1,6-diphosphate: energy without oxygen. *Surg. Forum*. 1980, **31**: 307-309.
92. Smolenski RT, Yacoub MH.: Liquid chromatographic evaluation of purine production in the donor human heart during transplantation. *Biomed. Chromatogr.* 1993, **7**: 189-195.
93. Smolenski RT, Suiitters A, Yacoub MH.: Adenine nukleotide catabolism and adenosine formation in isolated human cardiomyocytes. *J. Mol. Cell cardiol.* 1992, **24**: 91-96.
94. Smolenski RT, Skladanowski AC, Swierczynski J, Perko M, Narkiewicz M, Zydowo MM.: Changes of nukleotide content in human and rat heart during cardiac surgery and ischemia. *Acta Bioch. Polon.* 1993, **40**: 531-538.
95. Markwald R, Funderburg F.: Use of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine to study interaction between myocardial glycoconjugate secretion and endothelial activation in the early embryonic chick heart. *Dev. Biol.* 1983, **99**: 395-407.

96. De Waard A, Hickman S, Kornfeld S.: Isolation and properties of  $\beta$ -galactoside-binding lectins of calf heart and lung. *J. Biol. Chem.* 1976, **251**: 7581-7587.
97. Bardosi A, Bardosi L, Hendryx M, Wosgien B, Gabius HJ.: Spatial differences of endogenous lectin expression within the cellular organization of the human heart: a glycohistochemical, immunohistochemical, and glycochemical study. *The Am. J. of Anatomy.* 1990, **188**: 409-418.

## VII. Sajat közlemények, absztraktok, kongresszusi résztvételek

1. Gál J, Riedel BJ, Smith A, Royston D.: Myocardial preservation. *J. of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2000 május (megjelenés alatt).
2. Gál J, Riedel BJ, Bogár L, Tekeres M, Royston D.: Fruktóz-1,6-difoszfát alkalmazása coronaria bypass műtét közben. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*. 1999, 2: 78-86.
3. Gál J, Riedel BJ, Smolenski T, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) prevents myocardial adenine nucleotide degradation in cardiac surgery. *Anesthesiology*. 1998, A624, 89: No 3A, (absztrakt).
4. Marczin N, Gál J, Yacoub M.: Influence of breath-holding and one-lung ventilation on gas phase nitric oxide (NO) levels in patients undergoing cardio-thoracic surgery. *Anesthesiology*. 1998, A1394, 89: No 3A, (absztrakt).
5. Riedel B, Gál J, Hoare G, Marczin N, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) enhances human vascular cGMP production. *Anesthesiology*. 1998, A601, 89: No 3A, (absztrakt).
6. Marczin N, Riedel B, Gál J, Polak J, Yacoub M.: Exhaled nitric oxide during lung transplantation. *The Lancet*, 1997 december, 1681-1682.
7. Gál J, Marczin N, Schmidt I, Tekeres M.: Potentiation of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) synthesis by serum in cultured vascular smooth muscle cells (rat). *Monduzzi Editore International Proceedings Division*, 1995 november, 2: 21-25.



Elbírálás alatt:

1. Gál J, Riedel B, Róth E, Royston D.: Metabolic support by fructose-1,6-diphosphate prevents myocardial adenine nucleotide degradation in cardiac surgery. *J. of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*.
2. Riedel B, Gál J, Fox AW, Ellis G, Marangos PJ, Royston D.: Myocardial protection during coronary artery bypass graft surgery by fructose-1,6-diphosphate - a randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Circulation*.
3. Gál J, Riedel B, Róth E, Bogár L, Tekeres M, Royston D.: A fruktóz-1,6-difoszfát (FDF) hatása a szív purin és pirimidin katabolizmusára. *Orvosi Hetilap*.

## Kongresszusi résztvételek

1. 1994 május, *Balatonfüred*: Mühl D, Gál J, Sárosi I, Tekeres M.: Az öregkori myocardialis infarctus előfordulási gyakorisága és jellegzetessége Intézetünkben. (A Magyar Kardiológiai Társaság Tudományos ülése, **előadás**.)
2. 1995 október, *Athén*: Gál J, Schmidt I, Marczin N, Tekeres M.: Potentiation of lipopolysaccharide (LPS) - induced nitric oxide (NO) synthesis by serum in cultured vascular smooth muscle cells (rat). (A 8.Európai Intenzív Kongresszus, **poster**.)
3. 1996 május, *Siófok*: Gál J, Schmidt I, Marczin N, Tekeres M.: A Szeptikus shock biokémiai monitorizálásának egyik lehetséges módszere, cGMP radioimmunoassay használatával. (A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Nemzeti Kongresszusa, **előadás**.)
4. 1998 október, *Pécs*: Marczin N, Gál J, Riedel B, Yacoub M.: Influence of transient or prolonged lung ischemia and reperfusion on gas phase nitric oxide (NO), in man. (II. International symposium on myocardial cytoprotection, **előadás**, a szervező bizottság tagja.)
5. 1998 október, *Orlando, USA*: Gál J, Riedel B, Smolenski T, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) prevents myocardial adenine nukleotide degradation in cardiac surgery. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, **poster**.)
6. 1998 október, *Orlando, USA*: Riedel B, Gál J, Hoare G, Marczin N, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) enhances human vascular cGMP production. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, **előadás**.)
7. 1998 október, *Orlando, USA*: Marczin N, Gál J, Yacoub M.: Influence of breath-holding and one-lung ventilation on gas phase nitric oxide (NO) levels in patients undergoing cardio-thoracic surgery. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, **poster**.)

8. 1998 november, *Hévíz*: Gál J, Marczin N, Riedel B, Royston D.: A szepszismediált vasodilatatio mechanizmusának kísérletes vizsgálata. (A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív társaság Dél-Dunántuli Szekciójának tudományos ülése, előadás.)

9. 2000 április, *Bécs*, Ausztria: Riedel B, Hughes J, Gál J, Gray C, Amrani M, Royston D.: Coronary endothelial protection by fructose-1,6-diphosphate (FDP) in a rat Langendorff model. (8th Annual Meeting of the European Society of Anaesthesiologists, elfogadott előadás.)

#### Elbírálás alatt

1. 2000 május, *Siófok*: Gál J, Riedel B, Röth E, Tekeres M, Royston D.: A fruktóz-1,6-difoszfát vasculatúrára kifejtett hatásának in vitro kísérletes vizsgálata. (A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Nemzeti Kongresszusa.)

2. 2000 szeptember, *Pécs*: Gál J, Riedel B, Röth E, Royston D.: Coronary endothelial cytoprotection by fructose-1,6-diphosphate. (III. International symposium on myocardial cytoprotection.)

3. 2000 október, *San Francisco, USA*: Gál J, Riedel B, Schmidt I, Marczin N, Royston D.: Heparine induced endothelial dysfunction as quantified by cGMP radioimmunoassay. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists.)

## Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, nagyszüleimnek, feleségemnek Magdinak és a családom többi tagjának a segítségükért, türelmükért, bátorításukért és a nyugodt családi háttérért, amit az egyetemi évek, a hazai és külföldi orvosi pályafutásom alatt számomra biztosítottak.

Nagyon sok hálaival és köszönettel tartozom *Dr. Tekerés Miklós* professzor úrnak, *Dr. David Roystonnak* és *Dr. Marczin Nándornak* barátságukért, önzetlen támogatásukért és segítségükért, amit az egész eddig pályafutásom során nyújtottak nekem. Az ő jelenlétük és baráti iránymutatásuk nélkül nem tudtam volna eddigi eredményeimet elérni és céljaimat megvalósítani.

Külön köszönettel tartozom *Dr. Róth Erzsébet* professzor asszonynak a Ph.D. munkámban nyújtott támogatásáért, segítségéért, hasznos és nélkülözhetetlen tanácsaiért, kritikái megjegyzéseierért.

Az aneszteziológia és intenzív terápiával való megismerkedésem kezdeti lépéseinél nyújtott tanításukért, példamutatásukért és támogatásukért köszönettel és hálaival tartozom *Dr. Bogár Lajos*, *Dr. Bernhard Riedel*, és *Dr. Bárdosi László* barátainknak.

A betegcentrikus, lelkiismeretes orvosképp példamutató bemutatásáért és a klinikai orvoslás alapjainak megtanításáért szeretnék köszönetet mondani *Dr. Vágvölgyi Ferencnek* és a *Dr. Mencser András* főorvos úr vezette bajai Általános Sebészeti Osztály orvosainak és nővérgárdájának.

A Ph.D. munkám során nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért és a laboratóriumi technikák megtanításáért köszönettel tartozom *Ginette Hoarenek*, *Ruth Bundynak* és *Gillian Ellisnek*.

Végül, de nem utolsósorban köszönetet mondok a londoni Royal Brompton & Harefield Hospital aneszteziológus, sebész, kutató gárdájának és a PTE ÁOK Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézet, a Kísérletes Sebészeti Intézet és II. Belgyógyászati Klinika és Nefrológiaia Centrum orvosainak és asszisztenseinek a Ph.D. munkám elvégzéséhez nyújtott segítségükért.