

Ciklofoszfamid monoterápia mellékhatásainak, következményeinek vizsgálata állatkísérletes modellen DSC segítségével

PhD értekezés

Dr. Farkas Péter István

PTE KK Radiológiai Klinika

Doktori iskola:	Interdiszciplináris Orvostudományok (D93)
Doktori iskola vezetője:	Prof. Dr. Sümegi Balázs
Doktori program:	Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130)
Doktori Program vezetője:	Prof. Dr. Nyitrai Miklós
Témacím:	A biológiai makromolekulák termikus analízissel történő vizsgálata
Témavezető:	Prof. Dr. Lőrinczy Dénes DSc

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Biofizika Intézet

2017

Tartalomjegyzék

Rövidítés jegyzék	1
Bevezetés.....	2
Célkitűzések.....	3
Kutatásainkat indukáló problémafelvetés – esetismertetés.....	4
Ciklofoszfamid	6
Farmakodinámia, farmakokinetika.....	6
Alkalmazás.....	9
Mellékhatásai	10
Ciklofoszfamid vizsgálatunkban kiemelt szerepet kapó hatásai	11
Polineuropátia	11
Kardiomiopátia, kardiotoxicitás	12
Vérplazma alkotóelemire gyakorolt hatás	13
Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC).....	14
A DSC alapjai.....	14
A DSC működési elve	15
A DSC görbe értelmezése	17
Kísérleteink és eredményei	20
Kezdő vizsgálat	20
DSC mérések.....	21
Megbeszélés	25
Következtetés	25
Az új vizsgálatok kivitelezése.....	26
Ideg-izom komplex vizsgálata.....	28
Megbeszélés	33
Következtetés	34
Szívizom vizsgálata	34
Megbeszélés	37
Következtetés	37
Plazma és vörösvértest vizsgálata	38
Megbeszélés	42
Következtetés	42

Kísérletsorozatunk értékelése	43
Az értekezés összefoglalása	46
Célkitűzéseink teljesülése, az értekezés elért új eredményei	47
Köszönetnyilvánítás.....	48
Irodalomjegyzék	49
Közlemények és előadások jegyzéke.....	62
Az értekezés tárgykörébe tartozó közlemények.....	62
Értekezés tárgykörébe tartozó előadások:.....	62
Nem a disszertáció tárgykörébe tartozó poszter:	63
Nem a disszertáció tárgykörébe tartozó előadások:.....	63

Rövidítés jegyzék

ALL – akut limfoid leukémia

CLL – krónikus limfoid leukémia

CT – komputer tomográfia

ΔH_c – tömegre normált kalorimetriás entalpia

DNS – dezoxiribonukleinsav

DSC – Differential Scanning Calorimetry (differenciál pásztázó kalorimetria)

ENMG – elektroneuromiográfia

IgG – immunglobulin G

IgM – immunglobulin M

MESNA – nátrium 2-merkaptotán-szulfonát

MRI – mágneses rezonancia vizsgálat

NAD – nikotinamid-adenin-dinukleotid

SLE – szisztémás lupus erythematosus

T_m – denaturációs hőmérséklet maximum

vvt – vörösvértest

WHO – World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

Bevezetés

A XXI. században a fejlett országokban a kardiovaszkuláris megbetegedések után a rosszindulatú daganatok állnak a második helyen a halálokok között. A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint [1] Magyarországon is vezető halálökként szereplő szív- és érrendszeri megbetegedések az elhalálozás okaként 2000-ben 48,7 %-ban, 2012-ben 46,4 %-ban szerepeltek, vagyis minimális csökkenő tendenciát mutattak. Ezzel szemben a második leggyakoribb halálok, a rosszindulatú daganatos megbetegedések előfordulása 25,4 %-ról 28 %-ra emelkedett, vagyis enyhe emelkedő tendenciát mutat. Ennek hátterében elsősorban a kardiovaszkuláris megbetegedések területén tapasztalható intenzív egészségügyi fejlődés és a fokozatosan emelkedő várható élettartam áll. 2014-ben Magyarországon a férfiak születéskor várható élettartama 72,3 év, nők esetében 79,4 év, teljes lakosságra vonatkoztatva 76 év [2].

A fenti tendenciákból is adódóan egyre nagyobb hangsúly helyeződik a daganatos megbetegedések gyógyítására illetve kezelésére. A rosszindulatú térfoglaló folyamatok túlnyomó többségében elsődleges cél az elváltozás in toto műtéti eltávolítása, azonban ez sok esetben nem lehetséges, így kulcsszerep hárul daganattípustól függően a besugárzásnak illetve a kemoterápiának. Mindkét lehetőség veszélyeket és akár igen súlyos mellékhatások lehetőségét rejti magában.

A kemoterápia alkalmazása során – szakmámban a napi rutin során végrehajtott transzarteriális kemoembliáció vagy citosztatikus kezelések esetén – a dózis meghatározás kiforrott vagy sokszor csak alakulóban lévő nemzetközi ajánlások, standardok alapján történik, azonban betegre szabott individuális dózis beállítása nem lehetséges. Figyelembe véve, hogy a legtöbb gyógyszer, kemoterápiás szer farmakokinetikája részben genetikai alapon, részben a beteg szervezete aktuális általános állapotától függően befolyásolt, ugyanazon dózis alkalmazása eltérő hatással lehet különböző kezeltek esetén.

Intézetünkben, a PTE Radiológiai Klinikán az onkológiai kezelések során elsősorban epirubicin, farmorubicin, cisplatin és mitomycin C kerül alkalmazásra, melyeknek külön-külön is és együttes alkalmazásuk esetén is ismert neurotoxikus illetve kardiotoxikus hatásuk [3, 4,

5]. Vizsgálatunkhoz mégsem ezek a szerek közül választottunk, hanem a ciklofoszfamidot, melynek alapját az adja, hogy az onkoterápia mellett egyéb területeken több betegségcsoportban, elsősorban immunológiában is kiemelt szerepet játszik és széles körben, akár hosszantartó terápia részeként kerül alkalmazásra. Kisebb hangsúllyal, de alkalmazásra kerül többek között bőrgyógyászatban, pulmonológiában is [6, 7]. Ebből kifolyólag a mellékhatás profilja kiemeltebb szerepet kap és számos klinikai terület profitálhat kísérleteink eredményéből.

A ciklofoszfamid fontosságát jól mutatja, hogy az Egészségügyi világszervezet (WHO) által 2015 áprilisában kiadott legfontosabb gyógyszerek listáján is szerepel [8].

Célkitűzések

A dolgozat célja a DSC, mint esetleges klinikai diagnosztikai eszköz megítélése in vitro kísérleteinkre alapozva. Szeretnénk bizonyítani a módszer alkalmasságát a szisztémásan alkalmazott ciklofoszfamid terápia szövődményeinek előrejelzésében, várható mellékhatásainak beclésében.

Állatkísérleteinkben gyógyszeres kezelés hatásainak megítélésére humán dózissal ekvivalensen intraperitoneálisan alkalmazott ciklofoszfamid terápiát követően külön-külön vizsgálat alá vetettünk ideg-izom komplexet, szívizomzatot, vérplazmát és vvt szuszpenziót. Mindezek során szeretnénk megítélni:

- neuropátia, motilitási diszfunkció irányába mutató eltéréseket ideg-izom komplexen létrejövő módosulások által
- a szívizomzatban kialakuló változásokat, melyek szerepet játszhatnak kardiomiopátia kiváltásában
- a vér alakos elemein, vörösvérsejteken és vérplazmán detektálható eltéréseket, mely alapján lehetőség nyílhat indirekt úton történő gyógyszer szint monitorozásra és a tartós kezelés során létrejövő funkcionális módosulások beclésére.
- eredményeink alapján a dózis függvényében tapasztalt eltérések prediktív értékét a lehetséges következményeket illetően.

Kutatásainkat indukáló problémafelvetés – esetismertetés

Esetgazda: dr. Könczöl Franciska

Egy 40 éves, érdemben negatív egészségügyi anamnézissel rendelkező betegnél uterus mióma és jobb oldali ovarium ciszta került felismerésre, melyek műtéti eltávolítását gyermekvállalást elősegítő indikációval tervezték. Intraoperatív rosszindulatú jobb ovarium térfoglaló folyamat igazolódott (szöveti diagnózis: ovarium cisztadenokarcinóma), melynek folyamánként hisztrektómiára, adnexectómiára és csepleszreszekcióra került sor. Az onkológiai gondozásba vételt követően hat sorozat ciklofoszfamid + ciszplatin (Cyclophosphamid 1300 mg + Platidiam 130 mg) citosztatikus adjuváns kezelésben részesült. 6 hónappal későbbi kontroll vizsgálat során panaszként a bal láb zsibbadását jelezte. Későbbiekben panaszai perzisztáltak, majd mérsékelten progrediáltak, így 6 évvel a beavatkozást követően gerinc MR vizsgálatot végeztek, azonban panaszait magyarázó eltérés nem igazolódott. Ezt követően 1 hónappal az elektrofiziológiai vizsgálat szegmentális polineuropatiát igazolt. Neurológiai vizsgálata során Achilles-ín- és mély talpreflex kiesést, spinalis ataxiát, disztális taktilis hipesztéziát írtak le. Koponya CT vizsgálata érdemben negatív eredménnyel végződött. Az évenkénti ideggyógyászati ellenőrzések során változatlan panaszokat említett, és a kontroll elektrofiziológiai vizsgálat paraneopláziás eredetet vetett fel. 11 évvel az operációt követő koponya MRI vizsgálat kismértékű vaszkuláris encefalopátiát jelzett. Onkológiai kontroll vizsgálatai metasztatikus, recidív folyamatot nem igazoltak, mely alapján a páciens gyógyultnak nyilvánították. A malignus elváltozás felismerését követően 12 évvel a beteg onkológiailag gyógyult, ellenben súlyos polineuropatiás jelekkel, centrális facialis parézissel jobb oldalon, nystagmussal, kétoldali alsó végtagi és bal felső végtagi rigorral, az alsó végtagokon térd alatti taktilis hipesztéziával, paresztéziával járó tünetekben szenved.

Összességében a beteg esetében nem javuló, életét tartósan negatív irányba befolyásoló, progrediáló érzés- és mozgászavar, neuropátia maradt fenn, mely a rokkantság mértékét elérő egészségkárosodáshoz vezetett.

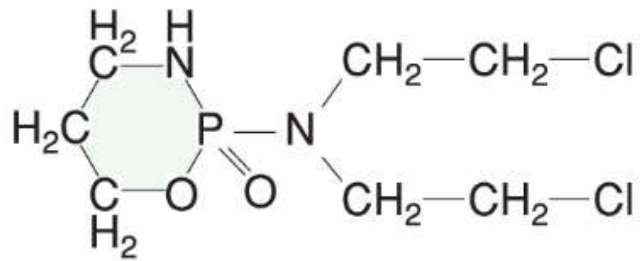
A kórtörténetet és az alkalmazott gyógyszeres terápia hatásmechanizmusát, ciklofoszamid mellékhatás profilját az ismert irodalom alapján vizsgálva történt meg egy kis egyedszámú állatkísérlet annak a megítélésére, hogy a beteg által kapott citosztatikus kezelés kiválthatta-e a betegnél tapasztalt súlyos tünettant.

A kezdeti kísérlet eredményei alapján [9, 10] munkacsoportunk úgy gondolta vizsgálatra érdemes az, hogy a ciklofoszamid egyéb területen megjelenő káros mellékhatásainak megítélésére alkalmas-e a módszerünk. Ezt a célt szem előtt tartva végeztünk nagyobb egyedszámú állatkísérletet immár nem csak ideg-izom komplexet, hanem szívizmot, vérplazmát és vörösvértest szuszpenziót is vizsgálva azonos feltételek mellett.

Ciklofoszfamid

A ciklofoszfamid – kémiai nevén di-(béta-klóretil)-amino-propilénfoszforsav-észteramid ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$) - citotoxikus, DNS támadáspontú oxazafosforin-gyűrűt tartalmazó mustárnitrogén származék (1. ábra), mely a legszélesebb körben alkalmazott alkilező szer a klinikai gyakorlatban. „Az alkilezés azt a kémiai reakciót jelöli, amikor egy vegyület alkilcsoportja egy másik vegyület H-atomját kicseréli. Az alkilező vegyületek kovalens kötést hoznak létre, ha az

elektrofil sajátosságú hidroxilkarbonil-csoportjukat nukleofil vegyületekhez képesek kapcsolni” [11]. A sejteken belül az alkilező szerek a kis és nagy molekulatömegű - mint a DNS - molekulák között alakítanak ki kovalens kötések mind a molekula láncokon

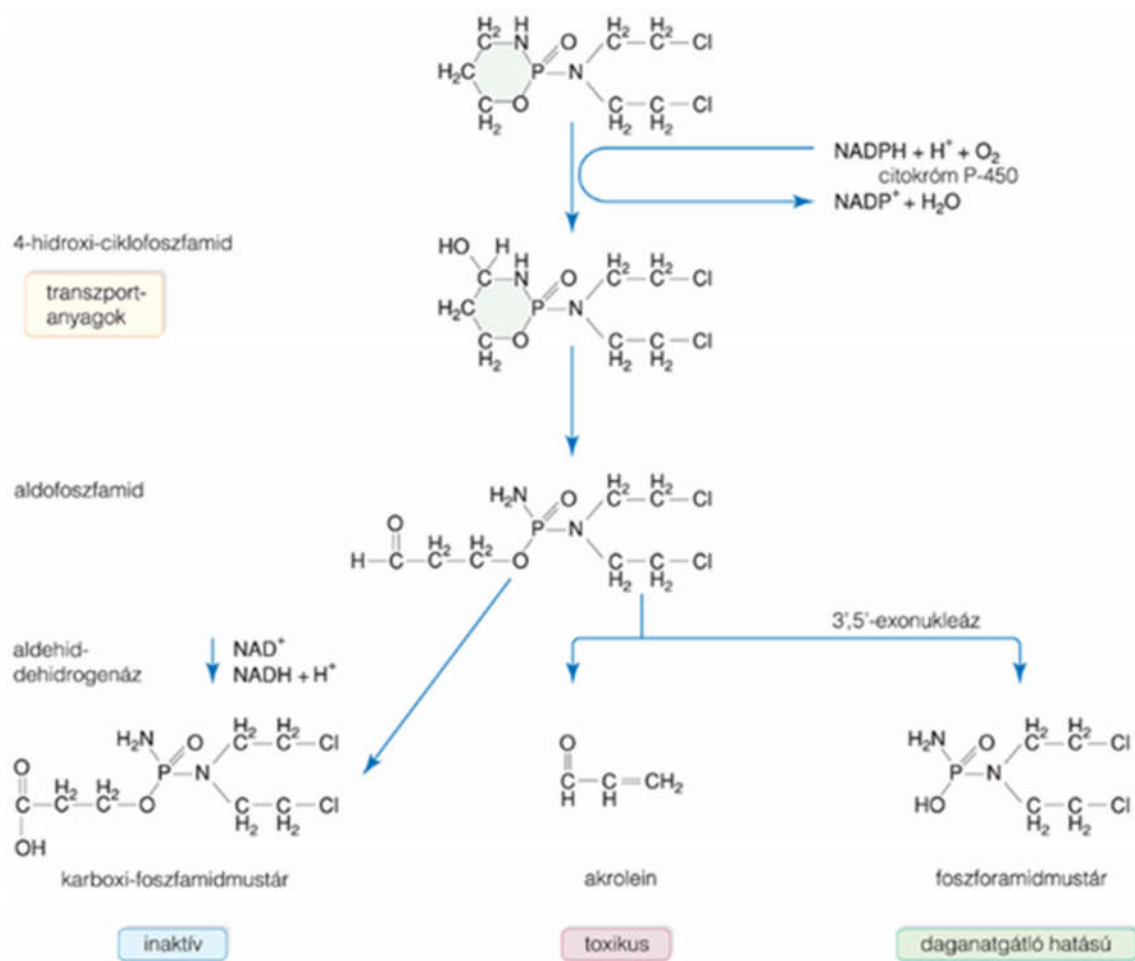


1. ábra: A ciklofoszfamid kémiai szerkezete

belül, mind azok között [12, 13]. Az így létrejött keresztkötések és lánctörések révén károsítja a géneket, végeredményben gátolva a sejtproliferációt, illetve indukálva az apoptózist [14]. Hatásmechanizmusából adódóan régóta ismert, hogy a ciklofoszfamid jóval hatékonyabb a gyorsan proliferáló sejtek esetén [15].

Farmakodinámia, farmakokinetika

A ciklofoszfamid *in vitro* körülmények között hatástalan, a szervezetbe profarmakonként juttatjuk be intravénásan vagy per os – a gyomor-bél rendszeren keresztül 74 %-a szívódik fel [11]. A szervezetben *in vivo*, a metabolizmus során inaktív, reaktív és toxikus vegyület is képződik. A prodrug aktiválásáért a citokróm P450, a máj monooxygenáz rendszere felelős, mely során több lépcsőben (hidroxi-ciklofoszfamid, aldofoszfamid-mustárnitrogén) egy reakciósorozat révén jön létre a foszforamid-mustárnitrogén, az aktív alkiláló termék (2. ábra) [16]. Emellett keletkezik az akrolein is, mint toxikus metabolit és az egyik gyakori mellékhatás, a hemorrágiás cisztitis kialakulásáért felelős vegyület [17].



2. ábra: A ciklofoszfamid hatásmechanizmusa [11]

A hidroxí- ciklofoszfamid és az aldofoszfamid-mustárnitrogén transzportforma, melyek a sejtmembránon jól átjutnak ellentétben az ionos foszforamid-mustárnitrogénnel [18]. Habár a hatás mértékét nem befolyásolja, de a mikroszomális poliszubsztrát monooxigenáz rendszer szükséges a ciklofoszfamid aktivitásához. Ezt jól bizonyítja, hogy a fenobarbitál-előkezelés ugyan kis mértékben emeli a metabolitok szintjét, de a daganatgátlás mértékét érdemben nem befolyásolja [19].

A ciklofoszfamidra csökkent érzékenységű sejtekben, akár csak a rezisztens tumorsejtekben is kimutatható egy inaktiváló reakció, ami az aldofoszfamid-mustárnitrogént biológiailag inaktív karboxi-ciklofoszfamiddá oxidálja NAD-függő aldehyd-dehidrogenázok segítségével. Ebből adódóan az aldehyd-dehidrogenáz gátlásával a citosztatikus/citotoxikus hatás fokozható, ellenben a terápiás indexet mégiscsak csökkenti, mivel ezzel jelentősen

csökken a ciklofoszfamid relatív szelektív hatása a tumoros sejtekre, tekintve, hogy az ép sejtek aldehid-dehidrogenáz-aktivitása magasabb a daganatos sejtekhez képest [11, 16].

A kialakuló foszforamid-mustárnitrogén makromolekulák elsősorban a DNS-eket alkilálják, keresztkötéseket létrehozva a DNS láncok között, és ezzel gátolják a sejtek proliferációját, így a tumor növekedést, illetve elpusztítják az antigén hatására proliferáló sejteket, akadályozva az immunválaszt, mely miatt hatásosan alkalmazhatóak az autoimmun betegségek terápiájában is [12,13,14].

A gyógyszer beadását követően a plazmakoncentráció 1-2 óra múlva éri el a maximumát, a 20 %-uk liquorban is kimutatható [20]. A vérben a ciklofoszfamid 10-20 %-a, míg az aktív metabolit, a foszforamid-mustárnitrogén 33 %-a kötődik plazmafehérjéhez. A ciklofoszfamid plazma koncentrációjának felezési ideje felnőttekben és gyermekekben jelentősen eltér, előbbi esetben 7 óra, míg utóbbi csoportban 4 óra [21]. Eliminációjáért elsősorban a máj felel, de 5-25 %-át a vese választja ki változatlan formában, míg a metabolitok jelentős része, 60-70 %-a mutatható ki a vizeletben a beadást követő 48 órában [11, 16, 22, 23]. Igen kis mennyiségben a ciklofoszfamid és metabolitjai a székletben és a kilélegzett levegőben is kimutatható [24].

Fontos kiemelni, hogy ismételt kezelések során – több napos kezelési séma esetén – a felezési idő redukálódik, aminek a hátterében maga a ciklofoszfamid által indukált metabolikus aktiválódás gyorsulása áll. [25, 26, 27].

Tartós kezelés során a gyógyszer iránt relatíve gyakori a rezisztencia kialakulása, melynek létrejöttében 3 mechanizmus játszik szerepet. Az egyik a daganatban az aldehid-dehidrogenáz aktiválódása, a másik, hogy a glutation konjugációval semlegesítődés jön létre, harmadrészt pedig a DNS repair mechanizmus segítségével a DNS-károsodás helyreáll [11, 28, 29].

A ciklofoszfamid metabolizmusa nagymértékű egyéni variabilitást mutathat, mely részben genetikailag determinált, részben a társbetegségek és kísérő kezelések befolyása alatt áll, így időben is változhat [30]. Joy és munkatársai kimutatták, hogy a ciklofoszfamid és 4-hidroxi-ciklofoszfamid farmako-kinetikája eltérő autoimmun betegségek (pl.: glomerulonefritisz) és daganatos betegségek esetén. (A vizsgálatok során a plazma

ciklofoszfamid szintjét folyadék kromatográfia - tömeg spektroszkópia segítségével monitorozták, mely hatékony, de körülményes módszer [31].)

Alkalmazás

A ciklofoszfamid orvosi alkalmazásának lehetőségét a daganatellenes terápiában citotoxikus szerként először 1958-ban publikálták [32]. Napjainkban a ciklofoszfamid - roppant hatásos orálisan adagolható immunszuppresszív gyógyszerként - elsődleges alkalmazási területe a súlyos szervi érintettséggel járó, enyhébb kezelésekre nem reagáló reverzibilis, illetve életet veszélyeztető komplikációkkal társuló reumatológiai-immunológiai betegségeknel van (szkleroderma, vaszkulitiszek, SLE) [16]. Több esetben első vonalbeli kezelésként, de sokszor - a némileg enyhébb mellékhatás spektrummal rendelkező metotrexát mögött - csak második választásként jön szóba [33, 34, 35]. Hatására jellemző, hogy a gyulladáshoz vezető tünetek csökkentése helyett a folyamatot lelassítják, szerencsésebb esetben megállítják. Kiemelendő, hogy az egyidejű szteroid kezelés esetén a szteroid szükségletet is csökkenti [11].

Kiváló immunszuppresszív hatása miatt szervátültetések esetén, ritkább esetben Wegener-granulomatózisban és gyermekkori nefrózisban szintén jól és eredményesen alkalmazható [36, 37].

A ciklofoszfamid bár mind a B-, mind a T-sejtekre hat, mégis a humorális immunválaszt gátolja kifejezettebben [38].

Kiemelkedő szerepét emellett a daganatok kezelésében betöltött helyének köszönheti, nagyobb dózisban az egyik legfontosabb antineoplasztikus szer, a legszélesebb körben alkalmazott alkilező kemoterapeutikum. A legfontosabb alkalmazási területe a hematológiai rosszindulatú daganatok kezelése (ALL, CLL, Hodgkin-kór, non-Hodgkin-kór), de egyes szolid daganatok esetén szintén sikeresen alkalmazzák, gyakran egyéb kemoterápiás szerekkel kombinálva [39, 40, 41, 42, 43]. Segítségével akár teljes remisszió érhető el Burkitt-limfómában és gyermekkori akut limfoid leukémiában, de fontos összetevője az emlődaganatok adjuváns kezelésének is [39, 44, 45]. Szerényebb hatásfokkal a mielóma multiplex, petefészek és tüdő daganatok terápiájában is részt vesz [46, 47, 48]. Az előrehaladott, későn felfedezett rosszindulatú folyamatokban a sikeres gyógyszeres

kezelések esélye kisebb, mivel a daganatok progressziója során a tumor tömegének emelkedésével arányosan nő a mutációk gyakorisága és az osztódások okán az eredendően rezisztens sejtek száma [11]. Ellenben a ciklofoszfamid fontos tulajdonsága, hogy egyidejűleg képes károsítani a gyorsan és lassan osztódó sejteket [16].

Lokálisan a szer nem alkalmazható, de adható tablettá (per os) és intravénás injekció formájában. A ciklofoszfamidra érzékeny limfómák terápiájában és hasonlóan károsodott csontvelő esetén 2–3 mg/kg (75–112 mg/m²) dózisban, rosszul reagáló daganatokban kétszeres dózist lehet alkalmazni intravénásan 6 napon át, majd 1–5 mg/kg-mal fenntartó, per os kezelés szükséges. Limfómás betegekben egyszeri nagy dózis – 30 mg/kg – kifejezetten hatásosan alkalmazható a klinikai állapot javítására [11].

Alkalmazásában kontraindikációt képez a súlyos májkarosodás (májelégtelenség), míg rossz veseműködés (veseelégtelenség) esetén csak szoros kontroll mellett adható. Terhesség, szoptatás és leromlott egészségi állapot, gyulladós góc, szepszis mellett nem alkalmazható. A fenobarbital és phenytoin egyidejű használata gyógyszer interakció okán toxicitását emeli [11, 16, 49].

Mellékhatásai

A jótékony hatásai mellett a ciklofoszfamidnak súlyos, akár életveszélyes mellékhatásai, szövődményei is lehetnek. Akut toxicitása a fehérvérsejtekre nagyon erős, a trombocitákra enyhe. Gyakori mellékhatása az alopecia, mérsékelt fokú hányás, hányinger, tüdőfibrózis és kiemelten a vérzéses húgyhólyaggyulladás (10%-ban). Ez utóbbi megelőzésére N-acetil-cisztein vagy MESNA (HS-CH₂-CH₂-SO₃) adása megoldást jelenthet. A celluláris immunitást csökkentő hatása esetenként a rosszindulatú folyamat progresszióját, a metasztázis képzést is elősegítheti. Primer daganatképző hatása is ismert, huzamosabb alkalmazásából adódóan akut myeloid leukémia, húgyhólyag tumor alakulhat ki. Emellett súlyosabb mellékhatásai is lehetnek pl. a trombembólia, infertilitás vagy a teratogén neurotoxikus hatás [11, 50, 51, 52].

Ciklofoszfamid vizsgálatunkban kiemelt szerepet kapó hatásai

Polineuropátia

A ciklofoszfamidot perifériás idegkárosodás, polineuropátia kezelésre is használják IgM ill. IgG monoklonális gammopátiában [53, 54, 55], miközben több esetben is felmerült, hogy a ciklofoszfamid maga is indukálhatja ezt a betegséget. A ciklofoszfamid polineuropátiás hatásáról eddig kevés közleményt publikáltak [56, 57]. Ezeknek a többsége is feltételezésen alapszik, mint például Tschöp és társai által közölt Werlhof-kórban (autoimmun idiopátiás trombocitopéniás purpura) szenvedő beteg nagy dózisu ciklofoszfamid terápiát követően kialakult perifériás szenzoros és motorikus polineuropátiája, melynek etiológiájára egyéb magyarázatot nem találtak [58]. Mindazonáltal, ahogy Könczöl és társai rámutattak, a látszólag enyhébb mellékhatásnak igen komoly, rokkantsághoz vezető következményei és akár igazságügyi orvosszakértői aspektusai is lehetnek [9, 10].

A polineuropátia egy polietiológiájú, általában összetett szindrómák részeként jelentkező, típusosan distalis területeken kezdődő kórkép. Az ehhez vezető betegségek, kiváltó tényezők számát több százra becsülik, melyek közül a leggyakoribbak a diabetes mellitus, hipotireózis, B₁₂ vitaminhiány és az alkohol abúzus. A paraneopláziás eredetű polineuropátia ritka, becslések szerint az összes polineuropátia kevesebb, mint 1%-a, azonban egy korábbi tanulmány a daganatos betegek 2,5%-ában mutatta ki [59]. A különböző gyógyszerek, így a feltételezetten ciklofoszfamid indukálta kórkép a toxikus polineuropátiák közé sorolható. A daganatos betegek polineuropátiáját a kemoterápia során alkalmazott szerek váltják ki a leggyakrabban [60].

Az érintett területtől függően előfordulhatnak vegetatív, szenzoros vagy motoros diszfunkciók is, melyek sokszor keverten jelentkeznek ezzel megnehezítve a diagnózis felállítását. A legbiztosabb diagnózist a célzott biopszia jelenti, de ez a gyakorlatban rutinszerűen nem elérhető, csak dedikált esetekben alkalmazzák. Amennyiben a klinikum alapján felmerül, a kórképet elektroneuromiográfia (ENMG) segítségével lehet megerősíteni, de még emellett sem kerül az esetek 20%-a felismerésre [61].

Kardiomiopátia, kardiotoxicitás

Számos citotoxikus szer rendelkezik cardiotoxikus hatással, melyek közül az antraciklinek (pl.: doxorubicin) emelhetőek ki, de a napi munkánk során az onkoradiológában egyik leggyakrabban alkalmazott epirubicinnek is ismert ez irányú mellékhatása [62]. Használatuk relatíve jól ismert mechanizmussal vezethet hosszú távú morbiditáshoz [63]. Emellett a ciklofoszfamidnak ismert, de kevésbé egyértelmű mechanizmussal magyarázott kardiotoxikus hatása is van.

Az alkilező szerek közé tartozó ciklofoszfamid súlyos, akár fatális következményekkel járó szívkárosító hatását már több mint 40 éve leírták csontvelő-transzplantáció kapcsán [64, 65]. Míg a doxorubicin és társai szívkárosító hatása kumulatív jellegű, addig a ciklofoszfamid nagy dózisu kezelés esetén is csak ritkán okoz akut szívelégtelenséget vagy hirtelen szívhalált, mivel nem kumulatív jellegű [66].

A ciklofoszfamid indukálta kardiomiopátia patogenezise a szabadgyökök felszaporodásán és az antioxidánsok lecsökkenésén alapszik [67], patofiziológiája részben ismert, azonban teljes egészében még napjainkban sem tisztázott. A ciklofoszfamid metabolitjai oxidatív stresszt és direkt kapilláris endotél károsodást okoznak, melynek következtében a fehérjék, vörösvértestek és toxikus metabolitok extravazációja jön létre súlyosan károsítva a szívizmot. A miokardiumban mikrotrombusok, intersticiális bevezések és ödéma jelentkezik. Boncolások során a magnagyobbodott szívizom intersticiumában észlelt kapilláris szintű mikrotrombusok, fibrin lerakódások a ciklofoszfamid indukálta kardiomiopátiára jellegzetes [68].

A gyakorlatban típusosan a gyógyszer adásától kezdődően az első 48 órában, esetleg az első 10 nap alatt jelentkeznek a klinikai tünetek, mint a tahiaritmia, hipotenzió, szívelégtelenség, miokarditisz, perikarditisz, perikardiális tamponád [69]. Ritka komplikáció a hemorrágiás szívizomgyulladás, mely általában gyors és végzetes lefolyású [68].

A súlyos kardiotoxicitás incidenciája pontosan nem ismert – a magasabb gyógyszer dózis emeli az előfordulását, de a határérték nem tisztázott - a megjelenő szívelégtelenség rizikó faktornak tekinthető [70]. Történtek próbálkozások a szívizomban létrejövő változások

korai kimutatására szív MRI segítségével, de egyértelmű prediktív eltéréseket nem sikerült azonosítani [71]. A súlyos kardiotoxicitást kiváltó határérték nem ismert.

Vérplazma alkotóelemire gyakorolt hatás

A vérplazma az extracelluláris folyadékter - „milieu intérieur” - 25 %-át teszi ki, annak a mozgó részét képezi, mely ezáltal kapcsolatot teremt szervek, szervrendszerek között. Összetételét tekintve 90 %-a víz, emellett diffúzibilis anyagok és nem diffúzibilis plazmafehérjék találhatók benne. A plazmafehérjék között elektroforézis alapján 6 fő frakció különíthető el – albumin; α_1 ; α_2 ; β - globulin; γ -globulin és fibrinogén. Emellett valójában több mint 200 különböző, funkcióval rendelkező fehérje ismert. Jelentőségüket figyelembe véve kiemelendők a transzport-fehérjék pl.: transferrin, cöruoplazmin, tiroxin kötő globulin, transzkortin, transzkobalamin, haptoglobin, de a fehérjék többek között befolyásolják a véralvadást, a folyadékmegoszlást a szervezetben, a sav-bázis egyensúlyt és az immunitást. Az érpályába adott anyagok, mint például az intravénás gyógyszerek, nagyjából 5 perc alatt oszlanak el egyenletesen az intravazális térben [72].

A ciklofoszfamid régóta tisztázott egyik mellékhatása az átmeneti fehérvérsejt és vörösvértest szám csökkenés, mely a szer citotoxikus hatásából adódik [11, 16]. Emellett a beadott ciklofoszfamid a vér alkotó elemeihez részben kötődik, részben azokon egyéb úton változásokat hoz létre, ami a vörösvértesteken és az egyéb plazma alkotó elemeken a biológiai törvényszerűségek okán igen nagy valószínűséggel funkcionális módosulásokat is kivált, de ezeknek a következményei még napjainkban sem tisztázottak megalapozottan.

Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC)

Termikus vizsgálati módszer alatt általánosságban az olyan eljárásokat értjük, melyek képesek a hő hatására lejátszódó átalakulások kimutatására. Melegítés hatására az elemzett minta fizikai vagy kémiai tulajdonságai változnak, melyeket különböző készülékek segítségével detektálhatunk, és következtetéseket tudunk levonni a folyamat természetéről. Az analitikai eljárások között a termikus analitikus eljárások külön csoportot alkotnak, melyben a vizsgált anyag tulajdonságait az idő vagy a hőmérséklet függvényében követünk, miközben a minta hőmérsékletét előre meghatározott algoritmus szerint változtatjuk [73].

Ezen csoporton belül helyezkedik a mára már leggyakrabban alkalmazott termoanalitikai módszer, a számos tudományterület által használt DSC is, melynek alapjait Watson és O'Neill rakta le az 1960-as években [74, 75]. Eredendően szervesanyagok fizikai tulajdonságainak vizsgálatára fejlesztették ki, majd a gyógyszerkutatásban is jelentős szerepet kapott [76]. A későbbiekben, mint érzékeny validált analitikai módszer a biológiai makromolekulák (nukleinsavak, fehérjék, szénhidrátok) szerkezeti változásainak elemzésében [77], majd kísérleti állatmodell vizsgálatoknál is alkalmazták [78]. Az ezredfordulót követően a klinikai kutatásokban is egyre nagyobb teret nyert [79, 80, 81, 82], míg napjainkban már klinikai alkalmazását vizsgálják, mint diagnosztikai vagy követési módszert, az egyes daganatos betegségekben [81, 83, 84]. Végeredményben kijelenthető, hogy az orvostudományi kutatásokban a DSC az egyik alapmódszernek számít a biológiai struktúrákban lejátszó változások megítélésében.

A DSC alapjai

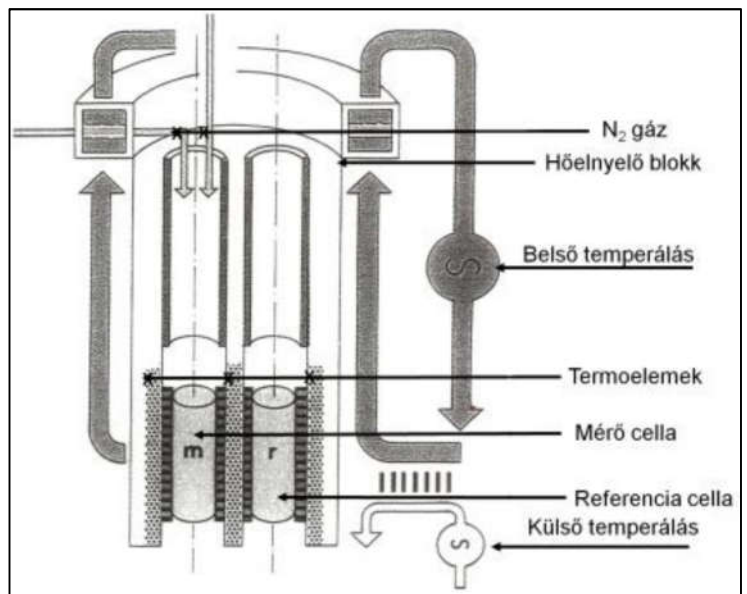
A biológiai szervezetben zajló folyamatok során az anyag belső struktúrája meghatározott, ismert törvényszerűségek alapján változik. Egy rendszer egymással szorosan összefüggő állapotváltozókkal jellemezhető, mint például a hőmérséklet, nyomás, térfogat, koncentráció, és ezek összességében állapotegyenletekkel írhatók le, melyek információt adnak a rendszer energiaállapotáról, stabilitásáról, belső rendezettségéről.

A DSC érzékeny a strukturális és konformációs változások detektálásában a biológiai és biokémiai folyamatokban, kifejezetten szenzitív a fehérjék termikus denaturációjának kimutatásában és alkalmas globális és szubmolekuláris változások jellemzésére [85, 86]. A termodinamikai analízis segítséget nyújt több tulajdonság meghatározásában, mint pl. a hőkapacitás, szerkezeti stabilitás, transzformációk, konformációs változások, olvadási pontok [87].

A biológiai minták különböző kémiai vegyületek vagy makromolekulák formájában vannak jelen a hőmérséklet függvényében a sejtekben, szövetekben, így a hőmérséklet változtatásával egy bizonyos ponton a halmazállapot illetve a szerkezet változni fog. Ez a változás a különböző anyagokra jellemző és bizonyos külső hatásokra, vagy patológiás eltérések esetén egyedi képet mutatnak. A hőmérsékletváltoztatás által indukált átalakulásokat hőjelenség kíséri, ezeket figyelve a felszabaduló vagy elnyelt hőenergiát mérhetjük és segítségével beazonosíthatjuk az anyag szerkezetét. Ehhez csak össze kell hasonlítani a már korábban - hasonló módon mért - tiszta kémiai anyagok termikus tulajdonságaival [76, 87].

A DSC működési elve

Az általunk használt készülék működése a hő-áram mérés elvén alapszik. A vizsgálóeszköz 2 db azonos térfogatú, térben elválasztott mintatartó cellát tartalmaz, az egyik a mérő cella, amibe a vizsgált anyagot helyezzük, a másik a referencia cella, és mindkettő egy fűthető-hűthető hőelnyelő blokkban helyezkedik el (3. ábra). Ha a vizsgált anyag folyékony halmazállapotú, leülepedését megakadályozandó a cellák cellatetőbe beépített haránt irányú tálcákat tartalmaznak. A referencia cellába mindig az adott vizsgálatnak megfelelő inert anyagot kell kerülnie, ami a mérés alatt nem mutathat szerkezeti változást. Ez általában a minta puffer-oldata.



3. ábra: Hőáramos DSC készülék sematikus elrendezése
(Forrás: Setaram kézikönyv)

A megtöltött cellák hőkapacitásának egyeznie kell. A mérések kiértékeléséhez szükséges a műszeralapvonal felvétele, amit mindkét cella üres állapotában, vagy pufferoldattal való feltöltésük mellett végzett méréssel kapunk meg, és az adott műszerre jellemző. A mi méréseink során, mivel a makromolekulák denaturációja irreverzibilis, a denaturált minta ismételt denaturációja szolgáltatja a referencia jelet (a műszer alapvonalát), amit kiértékeléskor levonunk az első felfűtés adataiból.

A mérések során a cellák egyidejű, teljesen szinkron programozott felfűtése történik, mely során a két cella hőmérséklete teljesen azonos módon változik egészen addig, míg az egyik cellában nem jön létre valamilyen, az emelkedő hőmérséklet kiváltotta változás. Ekkor a két cella között hőmérséklet-különbség jön létre és annak előjelétől és nagyságától függően energiát kell az egyik cellába táplálnunk, hogy a program-hőmérsékletet mindkét cella azonos módon kövesse, s köztük a hőmérséklet különbség zérus maradjon. A készülék az ehhez szükséges fűtőáram változást detektálja, és ebből vonatkoztatva rögzíti kimeneti jelként a hőteljesítményt/hőáramot az idő vagy hőmérséklet függvényében (4. ábra). Állandó nyomás és hermetikus zárás mellett az így nyert hőáram görbe alatti terület (idő szerinti integrálja) megadja a kalorimetrikus entalpiát (5. ábra). Ez az energia megfelel vagy a konformáció illetve szerkezeti változáshoz szükséges, vagy a folyamat során felszabaduló energiának. Grafikus feldolgozással a minta állandó nyomásra vonatkoztatott hőkapacitását is megkaphatjuk.

A hőteljesítmény (Watt) leírható az alábbi egyenlettel:

$$Q/t=R \cdot I^2$$

R állandó, így elegendő a fűtőáramot mérni (I) azonos körülmények között

4. ábra: Hőteljesítményt leíró egyenlet [88.]

$$dH/dt = C_p \cdot dT/dt$$

ahol:

dH: kalorimetrikus entalpia változás
C_p: a minta hőkapacitás
dT/dt: a fűtési / hűtési sebesség

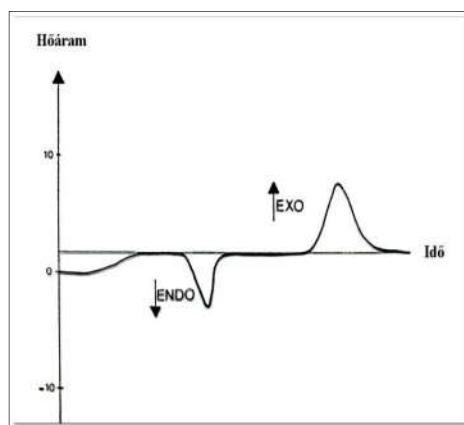
5. ábra: kalorimetrikus entalpiát leíró egyenlet

Fontos megjegyezni, hogy a termikus analízis csak arra ad választ, hogy egy gondosan megtervezett kísérleti sor esetén az általunk elvégzett beavatkozások, vagy a különböző károsodások megváltoztatták-e a mintánk szerkezetét (a hőkapacitás változás ennek

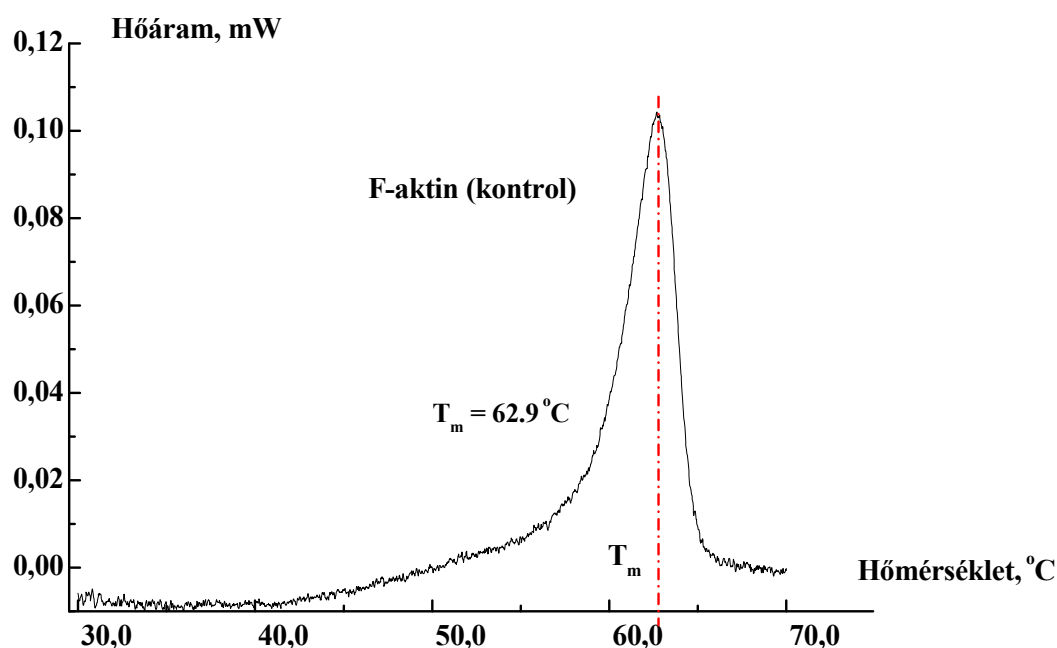
egyértelmű jele), de hogy melyik részén, annak eldöntésére kiegészítő vizsgálatok szükségesek. A kapott jel erőssége a megváltozott anyag mennyiségével arányos – kiemelendő azonban, hogy a minta tömegének növelésével nem kapunk többletinformációt sőt, a kapott görbék inkább mű- illetve melléktermékekkel terheltté válnak, vagyis bizonyos határon túl előnytelen.

A DSC görbe értelmezése

A DSC mérés révén kapott hőelnyelési görbék szemléltetik a vizsgált anyag fizikai és kémiai sajátosságainak megváltozását. A megszokott szemlélet és jelölések mellett a vizsgálat során bekövetkező endoterm folyamat lejátszódásakor a termogramon egy negatív csúcsú görbét kapunk (6. ábra). Ekkor a minta hőmérséklete a referencia cellához képest elmarad, mivel a betáplált hőenergia egy része a kémiai szerkezet átalakulásához szükséges, például kötések felbomlásához, vagyis nem a belső energiát növeli – ezért ez egy hőelvonó folyamat. A referenciával való azonos hőmérséklet fenntartásához plusz energiát kell a mérő cellába táplálnunk, vagyis a referencia cellával közölt össz-hőáram kisebb a mérő cellába folyóhoz képest, ezt mutatja a negatív irányú kitérés. Exoterm – hőtermelő folyamat – esetén a mérő cellában lezajló reakció során felszabaduló energia hővé alakul, így a referencia cella hőmérséklete elmarad a mintáétól. Ezt kompenzáló befolyó hőáramot növelni kell a referencia cellába, ezt demonstrálja a pozitív csúcs. Jól láthatóan ebben az esetben a hőáram változását a referencia cella szemszögéből ábrázoltuk, de ez nem törvényszerű, a mérőcellára vonatkoztatva az ábrázolást egy endoterm reakció pozitív csúcsként jeleníthető meg. (7. ábra). Ebből adódóan a görbék értékelése előtt fontos meghatározni melyik szemszögéből kerültek ábrázolásra a mért adatok.



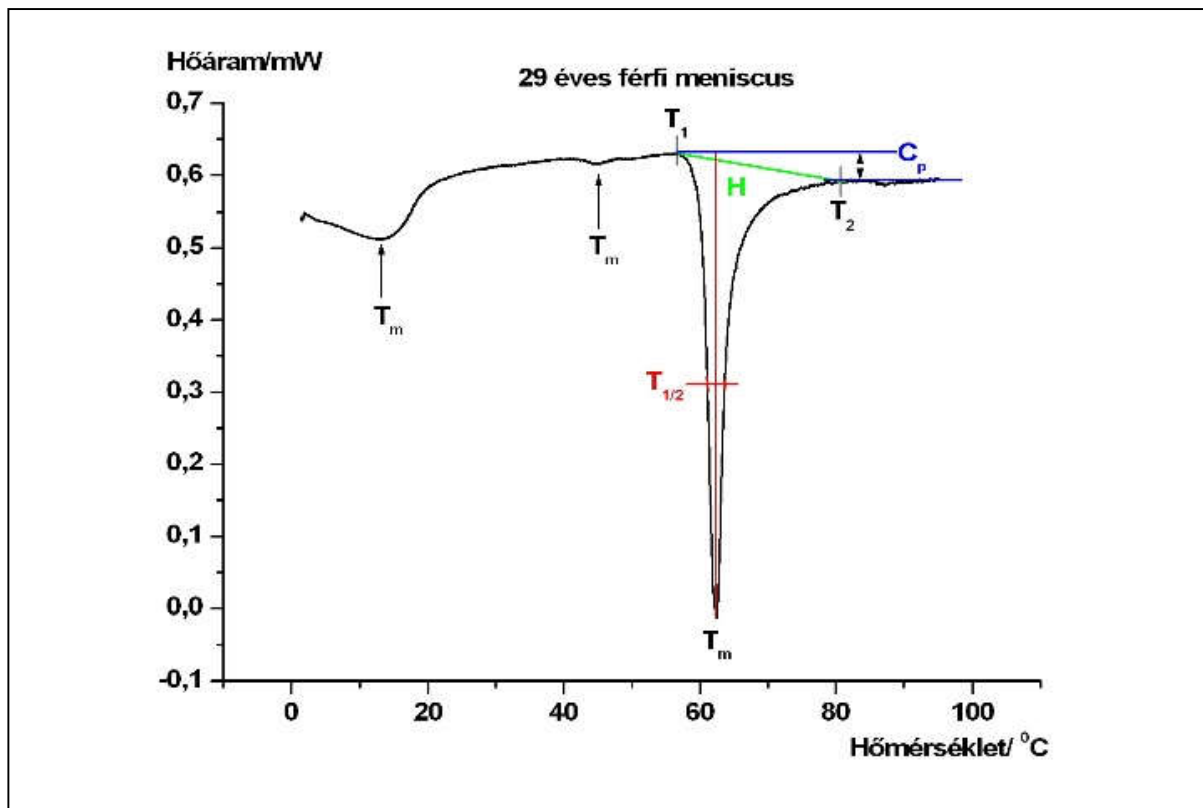
6. ábra: Termogram (Forrás: SETARAM kézikönyv)



7. ábra: F-aktin DSC termogramja. A DSC görbe maximumához tartozó hőmérsékletet (T_m) tekintjük a termikus stabilitás mértékének. (endoterm folyamat a növekvő hőáram irányában)

A DSC-termogram alapesetben több fázisra bontható, amint az, az alábbi konkrét példán keresztül végigkövethető (8. ábra). Kezdetben a minta és referencia cella a hőt egyenletesen felveszi, melegszik, így azonosan nő a belső energiájuk és nincs hőmérsékletkülönbség a referencia oldathoz képest – ez az 1. plató fázis (az ábrán az első két T_m között, közel vízszintes szakasz). További hevítésre a hőáram csökken T_1 -től, negatív csúcs ábrázolódik. Mivel a referencia cella szemszögéből történt az ábrázolás ez egy endoterm folyamatot demonstrál – a minta hőmérséklete alacsonyabb a referenciáénál a benne lezajló szerkezet változás miatt, így többletenergiát kell betáplálni a hőegyensúly fenntartásához – ez a cellákat tartó úgynevezett hőelnyelő blokkban lévő platina fűtőellenállás révén valósul meg. A folyamat megfelel biológiai, kémia kötések felszakításának, átrendeződésének, ami energiatöbbletet igényel. A görbe negatív irányú maximumát akkor éri el, amikor a makromolekulák felének szerkezete átalakult, innentől egyre kevesebb plusz hőmennyiséget igényel a rendszer időegység alatt. Amint az összes molekula szerkezet átalakulása lezajlott (T_2 után) nincs szükség többletenergiára, a cellák hőmérséklete azonos módon változik, és elkezdődik a 2. plató fázis (ami a denaturált állapot). Az első és második plató alapvonala

közi különbség a natív és denaturált minta közti hőkapacitás különbséget adja, és egyértelműen jelzi a szerkezet megváltozásának jellegét: merevebb vagy lazább lett.



8. ábra: Rostos porcshövet denaturációs görbéje és paraméterei (A szerzők engedélyével [89])

- a denaturáció kezdete (T_1) és vége (T_2)
- denaturációhoz szükséges energia (ΔH =kalorimetriás entalpia)
- denaturáció maximális hőmérséklete (T_m = a minta 50%-a átalakul más konformációba)
- félértékisélesség ($T_{1/2}$: ha kicsi, akkor nagyon erős a kölcsönhatás/kooperativitás az adott termikus egységen belül, ha nagy, akkor igen laza. Tehát a denaturáció során létrejövő új állapot merevebb, vagy lazább szerkezetű lesz)
- a natív és denaturált állapot alapvonala közti különbség a két állapot hőkapacitás (C_p) különbségét adja.

A biológiai minták termogramja egyedi és mivel az emberi szervezetben lezajló káros folyamatok patomorfológiai változásokkal járnak, ezen strukturális eltéréseket észlelve különbség tehető a fiziológiás és patológiás ill. megváltozott szerkezetű – és ezáltal a biológia törvényszerűségei szerint feltehetően megváltozott, módosult funkciójú - szövetek között [90, 91].

Kísérleteink és eredményei

Kutatásaink céljának ciklofoszfamid által indukált biológiai eltérések kimutatását tűztük ki DSC segítségével annak reményében, hogy eredményeink alapján a későbbiekben más nemzetközi tanulmányok eredményére is támaszkodva klinikai alkalmazhatóságát bizonyítsuk. Vizsgálatainkhoz etikai engedélyt kértünk, engedélyszáma: BA02/2000-4/2012.

A DSC, mint vizsgálati módszer klinikai alkalmazhatóságát már számos publikáció bizonyította az elmúlt években [89, 92-97].

Kutatásainkhoz kifejlett tengerimalacokat (*Cavia porcellus*) használtunk, mely során intraperitoneálisan injektáltunk ciklofoszfamidot. Az intraperitoneális gyógyszerbevitel kisemlősök esetében széles körben elfogadott módszer [98], mely emberekre vonatkoztatva egyenértékűnek tartható az intravénás alkalmazással.

Kezdő vizsgálat

A DSC módszer alkalmazásának gondolata egy konkrét, a bevezetésben ismertetett igazságügyi orvosszakértői eset megoldásának kapcsán merült fel [9, 10]. Ennek megválaszolása érdekében a kísérletek során tengerimalacok intraperitoneálisan, az emberi terápiás dózis testtömeg kilogrammra arányosan számított mennyiségű (5 mg/kg) ciklofoszfamidot kaptak egymást követő 2-5 alkalommal, illetve több nap szünettel a humán protokollnak megfelelően. Kontrollként gyógyszert nem kapott állat szerepelt (1. táblázat).

Az állatok aether ad narcosimmal telített kamrában exitáltak, és a hátsó végtagokból az ülőideg (*nervus ischiadicus*) és lábszárizom (*m. gastrocnemius*) kipreparálása történt, az idegekből egységesen 2 cm hosszú, az izmokból azonos anatómiai helyről 0,5x0,5x2 cm-es mintavétel történt, melyek a kalorimetriás feldolgozásig (a minta vételét követően 12 órán belül) steril fiziológiás konyhasóoldatban voltak tárolva 4 °C-on.

Testtömeg (gramm)	Ciklofoszfamid kezelés időpontja / nap														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. 490 (k)	Exit														
2. 572	X	X						Exit							
3. 526	X	X						X				Exit			
4. 462	X	X						X				d.e.X d.u.Exit			
5. 686	X	X						X				X	X	X	Exit

1. táblázat: Kísérleti állatok (tengerimalac) ciklofoszfamid (5 mg/testtömeg) kezelésének (X) és a mintavételek (exit) időrendi beosztása, k=kontroll.

DSC mérések

A mérések rövid időn, minden esetben 12 órán belül elvégzésre kerültek, a kalorimetriás vizsgálatokat megelőzően az állatokból kipreparált minták fiziológias sóoldatban háromszor átmosásra kerültek a zavaró szennyeződések, szövetmaradékok eltávolítása érdekében.

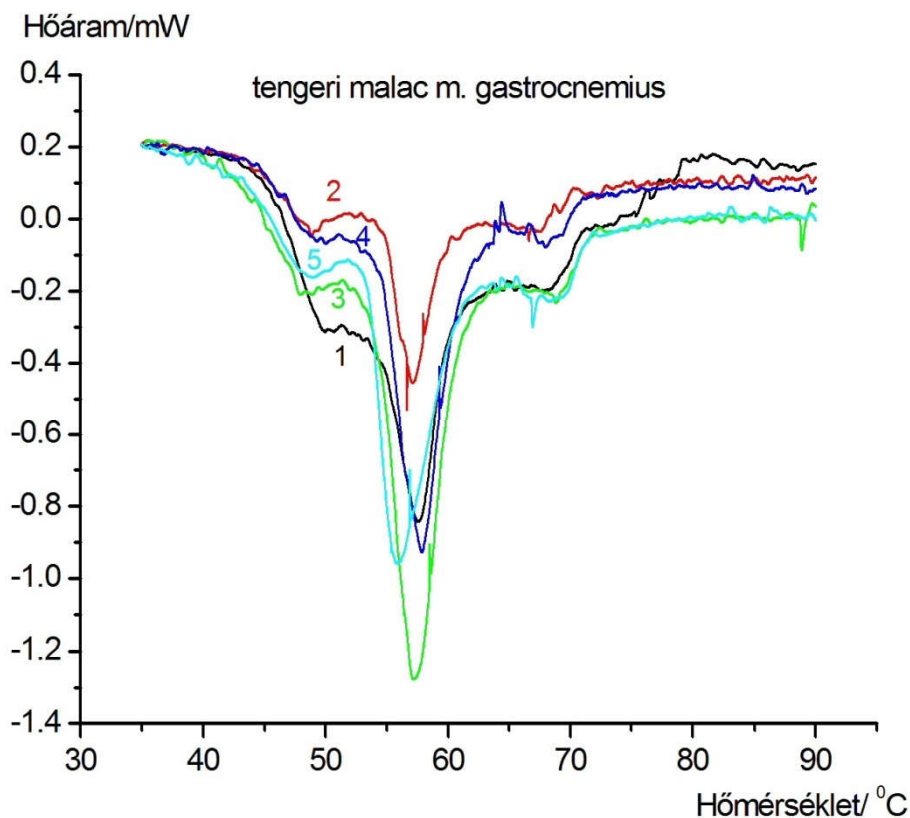
A termikus analízis SETARAM Micro DSC-II kaloriméterrel (9. ábra) történt 0 és 100 °C között 0,3 K/perc melegítési ütem mellett. A kísérletekben hagyományos Hastelloy-cellákban (V=1 mL) történt a denaturáció,



9. ábra: PTE ÁOK Biofizikai Intézet SETARAM Micro DSC-II kalorimétere

melyekben átlagosan összesen (minta + puffer) 950 µL mintatérfogat volt. A vizsgált szövetdarabok tömege 250-400 mg között volt. Referenciaként izotóniás sóoldat szerepelt. A referencia- és mintaedények tömege ± 0,1 mg pontossággal megegyezett, így az edények hőkapacitása között nem volt szükséges korrekciót alkalmazni. A hőabszorpció görbe alatti területből történt a kalorimetriás entalpia meghatározása kétpontos illesztésű SETARAM integrálás segítségével, majd a vizsgálati eredmények (a különböző minták denaturációs hőmérsékletei, a kalkulált entalpia értékei) összehasonlítása történt.

A kontroll egészséges gastrocnemius izom denaturációja (10. ábra) az aktomiozin oldatok [99-102] és a nyúl psoas izomrostok [103-105] esetén mért három átalakulási hőmérsékletű hőabszorpciós görbékhez hasonlít. Az előbb említett irodalmak alapján az első denaturációs csúcs a miozin fej, a második a miozin rúd, míg a harmadik az aktin termikus denaturációjával hozható kapcsolatba. A citosztatikummal kezelt állatok mintáinak termikus denaturációja a DSC görbék alapján jó közelítéssel a kapott terápiás dózis függvényében változott (10. ábra).



10. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok musculus gastrocnemius hődenaturációs görbéi. Számozás a 2. táblázat szerint.

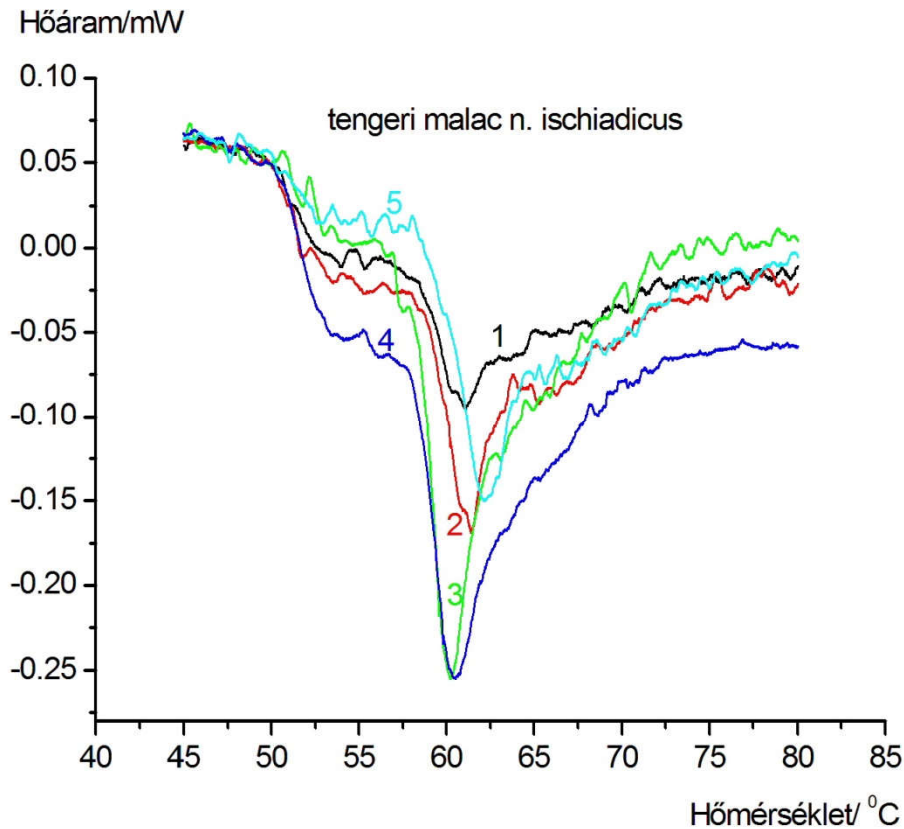
A 2. táblázat alapján a miozin fej (T_{m1} értékek) tűnik a legérzékenyebbnek (ez egy ATPase) a kezelési dózisa. Az első dózis sok hatásként értelmezhető a kiugróan magas T_{m1} miatt, míg a további dózisok közel azonos mértékű változást eredményeztek. A miozin rúd (T_{m2} értékek) és az aktin (T_{m3} értékek) a második és negyedik adag citosztatikumra adott a kontrollhoz képest jelentősen eltérő eredményt. A kalorimetriás entalpia, amely a szerkezeti változásokat szintén jól monitorozza, hasonlóképp dóziszfüggést mutat. A mérések korlátozott száma (csak egy kezelési sorozat elvégzése történt a kontrollal együtt öt egyedből álló csoporton) miatt természetesen statisztikailag igazolt összefüggés nem volt kimutatható, de a tendencia jól látható. A kemoterapiás kezelésnek tehát lehet a mozgatórendszerre károsító hatása.

Minta: m. gastrocnemius	Termikus paraméterek			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (1)	50,3	57,5	67,56	3,77
kezelt (2)	54,27	57,09	67,4	1,6
kezelt (3)	48,9	68,79	68,79	3,38
kezelt (4)	49,2	57,83	67,95	2,62
kezelt (5)	48,9	55,8	68,26	3,57

2. táblázat: Tengeri malac m. gastrocnemius izmának termikus denaturációs paraméterei a kezelési idő függvényében. (T_m -k denaturációs hőmérséklet maximumok, ΔH tömegre normált kalorimetriás entalpia.)

Tekintettel arra, hogy a mozgató rendszer (izom) működése nem csak annak szerkezeti tulajdonságától, hanem a beidegzettségétől is függ, ezért az izom működtetéséért felelős ischiadicus idegen is történtek mérések.

A 11. ábra alapján az ideg denaturációs hőáram görbéje szintén dóziszfüggő lefutású.



11. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddel kezelt tengerimalacok nervus ischiadicus hődenaturációs görbéi, számozás a 3. táblázat alapján.

A 3. táblázatban feltüntetett termikus adatok alapján az alkalmazott kemoterápiás dózisok többsége szerkezeti változást okozott (vagy a T_m vagy ΔH alapján).

Minta n. ischiadicus	Termikus paraméterek			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (1)	53,9	61,08	63,54	1,06
kezelt (2)	55,35	61,44	65,25	1,72
kezelt (3)	54,83	60,21	63,1	0,93
kezelt (4)	54,1	60,50	65,13	1,65
kezelt (5)	52,86	66,7	66,74	0,86

3. táblázat: Tengerimalac n. ischiadicusa hődenaturációs értékei a kemoterápiás kezelési idő függvényében.

(T_m -k denaturációs hőmérséklet maximumok, ΔH tömegre normált kalorimetriás entalpia.)

Az ideg összességében nagyobb érzékenységet mutatott a kemoterápiás kezelésre, mint az általa beidegzett izom.

Megbeszélés

Számtalan endogén és exogén ok idézhet elő polyneuropathiát [106-110]. A malignus daganatos betegségek kapcsán kialakuló neuropathiák etiológiájaként sokszor paraneoplasziás jelenség merül fel először, azonban bizonyítottan tekinthető, hogy túlnyomó részéért az alkalmazott kemoterápiás gyógyszeres kezelések lehetnek a felelősek, bár ezek direkt neurotoxikus hatása csak részben bizonyított [60]. A kezdő vizsgálat alap gondolatát egy ovarium adenokarcinómából meggyógyultnak nyilvánított ciklofoszfamiddal kezelt fiatal nőbetegnél kialakult kevert típusú polineuropátia igazságügyi orvosszakértői véleményezése adta. Állatkísérlettel sikerült igazolni a ciklofoszfamid neuro- és miotoxikus hatását, mely során rosszindulatú tumoros betegeknél alkalmazott protokollal és dózissal ekvivalens ciklofoszfamidot kaptak a tengerimalacok, majd leölésük után a nervus ischiadicusból és m. gastrocnemiusból vett minták differenciál scanning /pásztázó kalorimetriás vizsgálata történt. A kalorimetriás vizsgálat alkalmas a különböző típusú és mértékű izom károsodások igazolására a nemzetközi irodalomban közölt adatok alapján [111, 112]. Ezelőtt kalorimetriás méréseket még nem alkalmaztak perifériás idegek vizsgálatára.

Következtetés

Mivel a vizsgálat elsősorban egy célzott klinikai esetre próbált választ találni, így csak viszonylag kisszámú mérés elvégzése történt, ezáltal önmagában ennek alapján szignifikáns eredmény nem prezentálható. Elmondható azonban, hogy a ciklofoszfamid hatására mind a perifériás idegekben, mind az izmokban kalorimetriával jól mérhető és igazolható szerkezeti változások jöttek létre. Emellett kijelenthető, hogy a változások mértéke függ az alkalmazott ciklofoszfamid dózistól. Ezen eredmények megbízható támpontot nyújtottak a konkrét, nem szokványos eset körültekintő megoldásához és egyúttal stabil állapotot biztosítottak további vizsgálataink megtervezéséhez és kivitelezéséhez.

Az új vizsgálatok kivitelezése

A kis egyedszámú kezdő vizsgálat biztató eredményeire alapozva terveztük meg a kísérletsorozatunk folytatását, mely során az egyedszámot több mint tízszeresére emeltük és immár többfajta oltási sémát alkalmaztunk, melyet az 5. táblázat demonstrál. A kísérlet során használt tengerimalacok tömege között a két szélsőértéket tekintve (230 g és 1200 g) közel ötszörös az eltérés, de az állatok többségét nézve is relatíve nagy szórás volt tapasztalható (4. táblázat), így a kezdő vizsgálattal megegyezően minden tengerimalacnak egyedi abszolút dózist, külön-külön testtömegekre számolva 5 mg/ testtömeg kilogramm ciklofoszfamidot adagoltunk intraperitoneálisan – ami megfelelt az intravénás humán terápiás alkalmazásnak.

A DSC méréseket a kezdő vizsgálattal megegyező körülmények és paraméterek mellett végeztük el.

Csoport	testtömeg (g)					átlagos testtömeg (g)
1	724	670	630	600	550	634,8
2	686	566	870	1200	680	800,4
3	626	320	620	690	480	547,2
4	732	810	550	530	642	652,8
5	890	800	690	830	710	784
6	556	560	720	260	310	481,2
7	550	230	330	510	850	494
8	660	620	630	240	310	492
9	260	300	420	540	600	424
10	800	820	720	820	630	758
11	800 (E*)	820 (E*)	820	720	630	758
Kontroll	724	280	630	410	466	502

4. táblázat: A vizsgált tengerimalacok testtömege. E* jelenti a vizsgálat befejezése előtti exitálást.

A kísérletben 11 különálló csoporton – 5-5 egyeddel, n=55, n=5/csoport - 11 különböző oltási sémát állítottunk fel, melyek során 1-6 alkalommal ismételtük a gyógyszerbeadást részben egymást követő napokon, részben több nap szünettel (5. táblázat). Megjegyzendő, hogy a 6 kezelést kapó csoportból 2 tengerimalac a kísérlet befejezése előtt, az ötödik kezelés után elpusztult, melynek oka nem tisztázott.

Eredményeink értékeléséhez kontroll csoportot alkalmaztunk, mely során ciklofoszfamiddal nem kezelt tengerimalacok (n=5) vizsgálatát végeztük el ugyanolyan módszerrel és körülmények között.

Kezelések száma	Ciklofoszfamid kezelés időpontja / nap														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kontroll	Exit														
1 inj.	X	Exit													
1 inj.	X				Exit										
1 inj.	X						Exit								
2 inj.	X	X	Exit												
2 inj.	X	X				Exit									
2 inj.	X	X						Exit							
2 inj.	X				X				Exit						
3 inj.	X	X						X				Exit			
4 inj.	X	X						X				d.e.X d.u.Exit			
5 inj.	X	X						X				X			d.e.X d.u.Exit
6 inj.	X	X						X				X	X	X	Exit

5. táblázat: A vizsgálati csoportok (n=5/csoport) oltási sémája (X) és a mintavétel időpontjai (Exit)

Az állatok leölése altató étterrel telített kamrában történt, melyet követően több lokalizációból végeztünk mintavételt:

- kipreparálásra került anatómiailag ekvivalens helyekről mindkét oldali musculus gastrocnemiusból 0,5 x 0,5 x 2 cm-es, a nervus ischiadicusból 2 cm hosszú darab.
- eltávolításra került a szív bal kamra izomzatából 0,5 x 0,5 x 0,5 cm-es darab.
- EDTA tartalmú (1,5 mg/ml vér) vérmintavételi vákuumcső segítségével perifériás vért gyűjtöttünk, majd 15 percig centrifugáltuk (1600g) 4 °C-on elkülönítve a plazma frakciót és a sejtes elemeket (vvt).

Az ideg és izom mintákat 4 °C-on steril izotóniás sóoldatban tároltuk (max. 12 óra) a mérések elvégzéséig.

A továbbiakban a tengerimalacokból 4 különböző lokalizációból nyert minták vizsgálati eredményeit és értékelését külön-külön mutatjuk be.

Ideg-izom komplex vizsgálata

A kezdő vizsgálat kiterjesztése annak eredményeit volt hivatott alátámasztani/megerősíteni, illetve finomítani az oltási sémák számának növelésével.

Az állatokat 7 nagyobb csoportra osztottuk, mely során a kontroll csoport mellett a kezelések száma alapján (1-6) soroltuk be őket. Habár funkcionális egységet képeznek, de az eltérő szöveti tulajdonságok okán külön vizsgáltuk a nervus ischiadicust és a musculus gastrocnemiust. Mivel minden tengerimalac esetén mindkét oldali ideg-izom komplex kipreparálásra került, így minden esetben dupla méréseket végeztünk, külön jelölve a jobb és bal oldali mintákat.

A nervus ischiadicus vizsgálata során kapott mérési eredményeinket az alábbi táblázatok mutatják be, az adatokat a jobb átláthatóság érdekében kettéosztottuk, a legfelső sorban a kontroll értékeket mindkét táblázatban szerepeltetjük összehasonlítás végett (6. és 7. táblázat).

A n. ischiadicus kezelése	Termikus paraméterek							
	jobb				bal			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	53.41	61.15	63.29	5.48	54.67	61.44	64.21	5.88
egy injekció (5)								
1i-E	53.41	61.74	65.35	3.94	53.41	61.04	66.28	3.37
1i-3d-E	53.06	59.88	62.72	3.5	52.93	59.89	63.64	3.19
1i-5d-E	54.46	61.12	65.54	3.9	54.65	62.01	67.06	3.64
két injekció (5)								
2i-E	54.14	61.25	65.04	4.09	53.65	61.27	65.00	4.27
2i-3d-E	53.7	61.42	65.1	3.52	53.84	61.22	65.24	3.88
2i-5d-E	52.99	60.84	65.27	3.43	53	61.1	71.96	3.88
1i-3d-1i-3d-E	54.17	60.37	64.5	2.13	53.35	61.2	64.85	2.35

6. táblázat: tengerimalac nervus ischiadicus hődenaturációs értékei 1-2-szeri ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladó, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek ($p < 0,05$, $n=5$).

A n. ischiadicus kezelése	Termikus paraméterek							
	jobb				bal			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	53.41	61.15	63.29	5.48	54.67	61.44	64.21	5.88
három injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-E	53.83	59.58	64.03	5.26	53.88	60.21	64.51	4.67
négy injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-1i-E	53.66	59.96	65.01	3.95	53.91	60.2	65.03	4.26
öt injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-2i-E	52.98	60.69	64.6	3.32	54.99	60.66	64.8	3.01
hat injekció (5-2E)								
2i-5d-1i-3d-3i-E	52.42	61.84	64.6	5.41	53.37	61.46	65	3.51

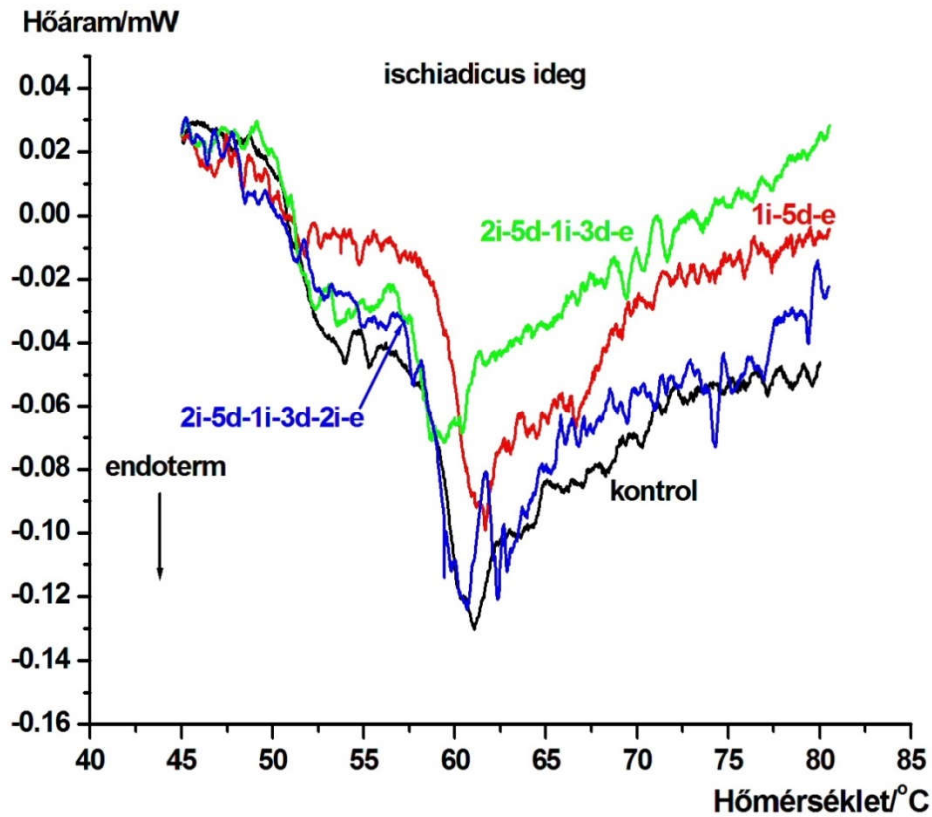
7. táblázat: tengerimalac nervus ischiadicus hődenaturációs értékei 3-6-szori ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek ($p < 0,05$, $n=5$).

A ciklofoszfamid kezelés dóziszfüggő hatásait a perifériás idegre a 12. ábra szemlélteti.

A hőáram maximum csökkenése együtt jár a denaturációs hőmérséklet alacsonyabb tartományba történő eltolódásával a dózis függvényében. A táblázat értékeiből kiolvasható egy meglepő nem várt eltérés is. Az eredmények alapján a kezelés jól láthatóan jobban érintette a bal oldali ideget. Erre az egyik lehetséges nyilvánvaló válasz az lehet, hogy az injektálást végző orvos jobb kezes volt, mely által a ciklofoszfamid konzekvensen minden esetben a has bal oldalán került injektálásra, így ha kismértékben is, de hosszabb és esetlegesen némileg erősebb hatást válthatott ki ezen az oldalon.

A jobb oldali idegek esetében a T_{m3} – mal jellemezhető termikus domén és a teljes kalorimetriás entalpia mutatja a kezelés dózis függését, míg a T_{m1} és T_{m2} változásaiban csak enyhe, mérsékelt tendencia figyelhető meg injektálások számának és a kezeléseket után eltelt idő függvényében, az is csak 1-2 injektálás során. Két kezelésig az injekciózás között eltelt idő is szignifikáns hatású(csökken). Ennél több kezelés csak az általunk végzett legtöbb, 6-szori injektálást követően figyelhető meg szignifikáns dózis dependencia T_{m1} -ben. Ezzel szemben ugyanezek az adatok a bal oldali idegek esetén azt mutatják, hogy a termikusan

elkülöníthető szerkezeti domének termikus stabilitásának erős dózis függését T_{m1} és T_{m3} is csak két injekcióig követi. A kontroll vizsgálatokhoz képest a kalorimetriás entalpia dózis függése gyakorlatilag minden esetben egyértelmű, de a második és harmadik injekció hatása az előzőekhez képest nő.



12. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok nervus ischiadicus hődenaturációs görbéi

A PTE ÁOK Biofizika Intézetben korábban már több aspektusból történt harántcsíkolt izomzat DSC-vel történő vizsgálata [111-116], ezáltal már jelentős előnyt adó tapasztalatokkal rendelkezünk a musculus gastrocnemius vizsgálata során kapott mérési adatok kiértékelésében (8. és 9. táblázat).

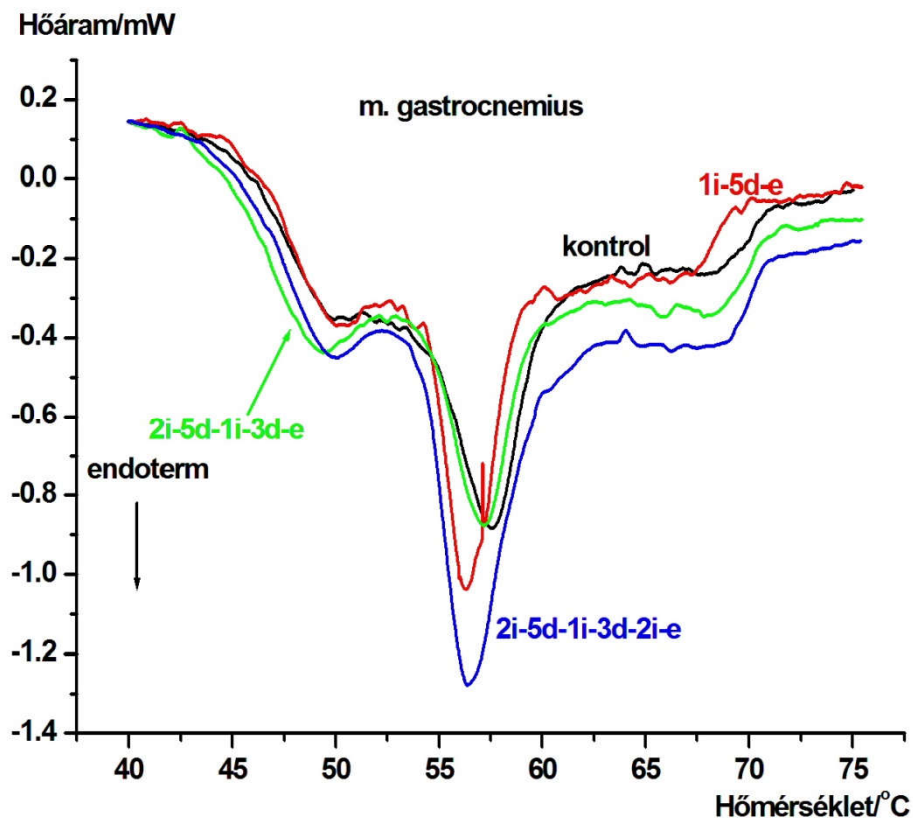
m. gastrocnemius kezelése	Termikus paraméterek							
	jobb				bal			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	50.19	56.95	67.32	2.86	49.73	56.77	68.15	3.15
egy injekció (5)								
1i-E	50.07	56.78	66	1.92	50.18	56.93	64.91	2.17
1i-3d-E	49.54	56.62	66.92	2.34	49.80	56.55	66.8	2.3
1i-5d-E	49.95	56.81	66.5	2.48	50.33	56.93	66.71	2.21
két injekció (5)								
2i-E	49.91	56.74	67.77	2.68	49.91	56.89	67.33	2.45
2i-3d-E	50.23	56.55	66.71	2.40	50.29	56.5	66.44	2.33
2i-5d-E	49.69	56.9	67.39	2.60	50.19	56.7	67.64	2.77
1i-3d-1i-3d-E	49.89	56.64	65.61	2.26	49.89	56.71	67.47	2.63

8. táblázat: tengerimalac musculus gastrocnemius hődenaturációs értékei 1-2-szeri ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek ($p < 0,05$, $n=5$).

m. gastrocnemius kezelése	Termikus paraméterek							
	jobb				bal			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	50.19	56.95	67.30	2.86	49.73	56.77	68.15	3.15
három injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-E	50.89	56.48	64.37	2.87	50.96	56.54	64.65	2.66
négy injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-1i-E	49.97	56.44	66.64	2.56	50.35	56.71	66.18	2.50
öt injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-2i-E	49.97	56.10	68.02	3.75	49.98	56.38	66.26	3.43
hat injekció (5-2E)								
2i-5d-1i-3d-3i-E	50.39	56.35	65.84	2.20	50.40	56.50	65.40	2.40

9. táblázat: tengerimalac musculus gastrocnemius hődenaturációs értékei 3-6-szori ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek a kontrollhoz képest ($p < 0,05$, $n=5$).

Az állatokból kiperarált musculus gastrocnemius hődenaturációs görbéit a 13. ábrán láthatók:



13. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok musculus gastrocnemius hődenaturációs görbéi

A denaturációs hőáram görbéje 3 jól elkülöníthető szakaszra osztható. A korábbi vizsgálatok alapján a középső szakasz megfelel a miozin rúd, az alacsonyabb denaturációs csúcs a miozin fej, míg a legmagasabb az aktin és aktin-miozin komplex termikus denaturációjának. A hődenaturációs görbék jól demonstrálják a ciklofoszfamid kezelés okozta változásokat a dózis függvényében. A táblázatban jelzett termikus paraméterek a nervus ischiadicushoz hasonlóan a károsodás bal oldali dominanciáját mutatják.

A kemoterápia által kiváltott szerkezeti eltéréseket denaturációs hőmérsékleti pontok (T_m) és kalorimetriás entalpiák (ΔH_c) módosulásának tendenciája szemlélteti, mely alapján a jobb izomban minden kezelés során elsősorban az aktin filamentumok érintettsége rajzolódik ki (T_{m3}) hasonló jellegű entalpiaváltozás mellett. A bal oldali izmok esetén már a miozin fej is érintett (T_{m3}) szignifikánsabb entalpia dóziszfüggés mellett. Mindez fiziológiailag az aktomiozin komplex romló funkcióját okozza, mely végül rosszabb mozgási képességet eredményez. A vizsgálati adatokból kiemelendő, hogy a 6 kezelést kapó csoportból 2 egyed az ötödik injekciót követő időszakban ismeretlen okból exitált.

Megbeszélés

A ciklofoszfamid egy igen széles körben használt gyógyszer relatíve súlyos mellékhatás spektrummal, melyek közül komoly hosszú távú következményekkel járhat a perifériás ideg- és izomkárosodás, a polineuropátia kialakulása. Habár a kemoterapeutikumok neurotoxikus hatása csak részben bizonyított [60], a ciklofoszfamid esetén ennek lehetőségét már korábban is felvetették [9]. Az általunk alkalmazott DSC vizsgálati módszer igazoltan alkalmas izomkárosodás kimutatására [111, 112], míg maga az ideg károsodásának a kimutatására is történtek már vizsgálatok kisebb esetszámban kísérletes jelleggel [9, 10].

A tengerimalacokon végzett kísérleteink során onkológiai indikációval adott testtömeg kilogrammra vonatkoztatott dózist és protokollt alkalmaztunk, majd a leölésüket követően első lépésként a nervus ischiadicust és musculus gastrocnemiumot vizsgáltuk DSC módszerrel.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a termikus paraméterekben megmutatkozó eltérések egyértelműen igazolják a ciklofoszfamid károsító hatását perifériás ideg és némileg kisebb mértékben harántcsíkolt izom esetén [117]. Az eltérés a szöveti érzékenység különbségével magyarázható elsősorban, de végeredményben mindkettő funkcionális károsodáshoz vezet, hatásuk a gyakorlatban összeadódhat, melynek a mértéke az általunk alkalmazott dózis függvényében változik.

Érdekesség, hogy a vizsgálataink során egyértelmű oldalkülönbséget detektáltunk, mely a bal oldali ideg és izom fokozottabb érintettségét igazolta. Ennek a hátterét jelenleg nem tudjuk magyarázni (megjegyzendő, hogy az injekciók beadása az oltó jobb kezessége

miatt mindig a bal oldali testtájon történt!), de érdemes ezt az aspektust is vizsgálni, mivel ha a későbbiekben a kezelt humán betegpopulációban is hasonló predominancia igazolható, akkor ezt a kivizsgálás illetve kontroll eredmények értékelése során célszerű figyelembe venni.

Következtetés

A munkánkat elindító kezdő vizsgálat eredményét megerősítve és alátámasztva [9, 10] a nagyobb számú (n=55) állatkísérletünkben differenciál pásztázó kalorimetria segítségével detektált szignifikáns termokémiai változások alapján egyértelműen igazolható a ciklofoszfamid dóziszfüggő perifériás ideg- és izomkárosító hatása [117]. Mindezek alapján a ciklofoszfamid egyéb területeken kifejtett negatív hatása szintén felmerül, melyek felderítése további vizsgálatokat indokol. Az oldalkülönbség szintén további megfontolásra érdemes kérdéseket vet fel.

Szívizom vizsgálata

A kísérleteink tervezésénél a szívizom vizsgálatát egyértelműen az alapozta meg, hogy a ciklofoszfamid illetve számos más citosztatikus szer egyik legsúlyosabb, olykor fatális kimenetelű mellékhatása a kardiotoxicitás. A folyamat patofiziológiája relatíve jól ismert [67, 68], azonban a kiváltó dózisérték, prediktív eltérések, jelek nem tisztázottak [70, 71], így figyelembe véve a lehetséges következmények súlyát, vizsgálata csaknem szükségszerűen indokolt.

A vizsgált egyedeket – azonosak az ideg/izom vizsgálat kísérleti állataival – az ideg-izom komplex vizsgálathoz hasonlóan 7 nagyobb csoportba osztottuk a kezelések számának megfelelően. Mivel a legnagyobb igénybe vételnek a bal kamra van kitéve, a mintát belőle vettük. Mérési eredményeinket a jobb átláthatóság miatt ismét két táblázatban jelenítjük meg (10. és 11. táblázat).

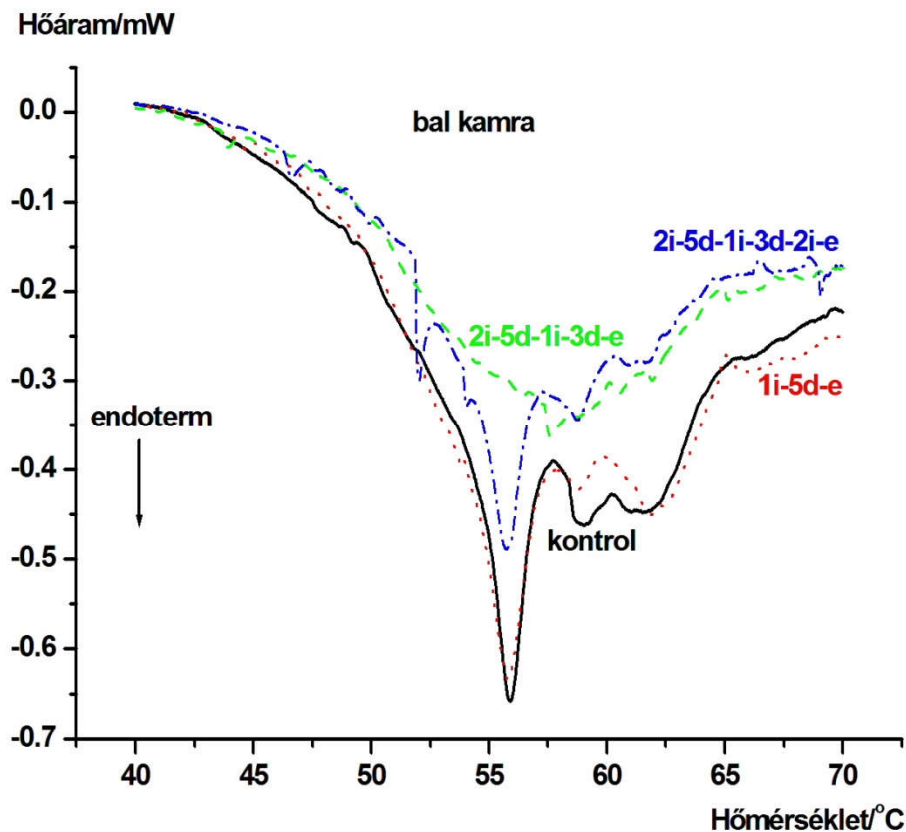
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_{cal}/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	56.06	58.97	62.01	2.1
egy injekció (5)				
1i-E	55.98	56.76	60.75	1.39
1i-3d-E	55.48	59.01	62.96	1.6
1i-5d-E	55.85	58.7	61.64	1.73
két injekció (5)				
2i-E	56.38	59.12	61.81	1.66
2i-3d-E	56.56	59.2	61.95	1.96
2i-5d-E	56.19	59.08	61.53	1.75
1i-3d-1i-3d-E	55.19	59.03	63.12	1.82

10. táblázat: tengerimalac bal karma szívizomzat hődenaturációs értékei 1-2-szeri ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek a kontrollhoz képest ($p < 0,05$, $n=5$).

	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_{cal}/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	56.06	58.97	62.01	2.1
három injekció (5)				
2i-5d-1i-3d-E	55.77	58.33	61.34	1.6
négy injekció (5)				
2i-5d-1i-3d-1i-E	49.86	55.88	60.6	1.8
öt injekció (5)				
2i-5d-1i-3d-2i-E	55.72	58.57	61.65	1.4
hat injekció (5-2E)				
2i-5d-1i-3d-3i-E	55.79	58.73	61.36	1.69

11. táblázat: tengerimalac bal kamra szívizomzat hődenaturációs értékei 1-2-szeri ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek a kontrollhoz képest ($p < 0,05$, $n=5$).

A ciklofoszfamid dózisfüggő hatása, a denaturációs hőmérsékletek eltolódása és az entalpia csökkenése jól megfigyelhető a bal kamra hődenaturációs görbéin (14. ábra).



14. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok bal kamra szívizomzat hődenaturációs görbéi

Az eredményeink elemzéséhez itt is felhasználjuk a korábbi, vázizomzat vizsgálata során szerzett tapasztalatokat és következtetéseket [111-116]. Akárcsak a harántcsíkolt vázizom esetében a szívizomzatnál is 3 szakaszra bontható a denaturációs görbe. Tapasztalataink alapján az 58 °C körüli olvadási pont (pl. a kontrollnál a középső csúcs) a miozin rúd, az alacsonyabb átmenet a miozin fej, míg a legmagasabb, 62 °C feletti csúcs az aktin ill. aktomiozin komplex denaturációjának felel meg. Mindezek módosulása a beadott ciklofoszfamid mennyiség tekintetében a görbék lefutásával (alakjával) és a hőáram maximumok elmozdulásával jellemezhető.

A fenti táblázatokban szereplő értékekből kiolvasható, hogy 1-2 ciklofoszfamid kezelés már befolyásolja a T_{m1} -t, T_{m3} -t és a kalorimetriás entalpiát, mely alapján megállapítható, hogy miozin fej és az aktin érzékenyebb a kezelésre. A kalorimetriás entalpia azonban jobban függ a dózistól és a kezelések között eltelt időtől. A nagyobb számú, 3 vagy

több kezelés során a T_{m2} , T_{m3} és a kalorimetriás entalpia változása képes monitorozni a kifejtett hatást, mely során főként a miozin rúd és az aktin érintett. A teljes folyamatot tekintve kijelenthető, hogy elsősorban a miozin fejek és az aktin filamentumok szenvednek változást (T_{m1} , T_{m3}), ami rosszabb aktomiozin komplex funkciót okoz, ezáltal végeredményben a szív pumpa funkciója csökken.

Megbeszélés

A ciklofoszfamid okozta szívizomkárosodás, hemorrágiás szívizomgyulladás az irodalomban ismert, de a mechanizmusa csak részben tisztázott és mértékadó dózis-határ értéket eddig nem sikerült megállapítani [70]. Figyelembe véve a gyógyszer széleskörű használatát és a lehetséges szövődmények adott esetben fatális kimenetelét, a folyamat pontosabb megismerése fontos szerepet játszik. A ciklofoszfamid hatását a szívizomra eddig DSC vizsgálattal nem tanulmányozták, melyet a kutatócsoportunk kísérletes körülmények között tengerimalacokon végzett el.

Vizsgálataink során onkológiai indikációval adott testsúlykilogrammmra vonatkoztatott dózist és protokollt alkalmaztunk, majd az állatok leölését követően a szív bal kamrájából kimetszett mintát vizsgáltuk DSC módszerrel.

A korábbi vizsgálataink során szerzett tapasztalatokat is felhasználva eredményeink alapján elmondható, hogy a többszöri ciklofoszfamid adás először a miozin fejet és az aktint károsítja, majd a dózist növelve végül a teljes aktomiozin komplex károsodást szenved, mely valószínűleg jelentős szerepet játszik a kialakuló klinikai képben [118].

Emellett az is kijelenthető, hogy az egyszeri ciklofoszfamid számottevő szívizomkárosító-hatást nem produkált, mely további egyértelmű bizonyítéka a dózis dependenciának, annak ellenére, hogy a korábbi vizsgálatokban kumulatív jelleget nem mutattak ki [66].

Következtetés

Vizsgálatunkkal és eredményeinkkel remélhetőleg egy lépéssel közelebb kerültünk a ciklofoszfamid indukálta kardiomiopátia patofiziológiai megértéséhez és tisztázásához, emellett sikerült egy újabb támpontot adni a becsült dózis-határ érték felállításához.

Plazma és vörösvértest vizsgálata

A vér vizsgálatát azért tartottuk indokoltnak, mert jól tükrözi az egész szervezetet ért hatásokat, de talán még ennél is fontosabb, hogy a napi klinikai rutinban az egyik legjobban és legegyszerűbben vizsgálható biológiai minta, mely információt nyújthat a beteg szervezetéről. A vér DSC-vel történő vizsgálatára egyre bővülő irodalom áll rendelkezésre számos különböző patológiai eltérések esetén [119-126]. Amennyiben sikerül szignifikáns eltéréseket találnunk, kiváltképp, ha azok az alkalmazott dózissal korrelálnak, kezünkbe kaphatjuk egy új módszer lehetőségét, mely képes monitorozni, esetlegesen előre jelezni a szervezet egyéb területein zajló folyamatokat, illetve súlyosságukat. Ha ez sikerül, esély nyílik megelőzni vagy mérsékelni a gyógyszer indukálta mellékhatásokat és súlyos következményeket.

kezelések	Termikus paraméterek							
	plazma				vörös vértest			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	59.9	62.27	84.7	0.78	68.72	75.25	84.51	4.7
egy injekció (5)								
1i-E	62.5	87.5	92.3	0.81	53.8	68.9	74.2	5.24
1i-3d-E	58.12	66.85	79.31	0.51	67.85	73.4	84.52	5.41
1i-5d-E	62.37	83.43	91.4	0.81	68.43	75.92	83.97	5.46
két injekció (5)								
2i-E	58.7	65.39	79.39	0.7	68.46	74.72	82.51	4.88
2i-3d-E	60.48	66.16	81.56	0.57	66.46	73.07	81.25	4.76
2i-5d-E	59.95	64.41	82.15	0.46	68.47	74.83	81.56	4.55
1i-3d-1i-3d-E	55.8	66.03	80.11	0.45	68.25	72.56	79.85	4.18

12. táblázat: tengerimalac vérplazma és vvt hődenaturációs értékei 1-2-szeri ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek a kontrollhoz képest ($p < 0,05$, $n=5$).

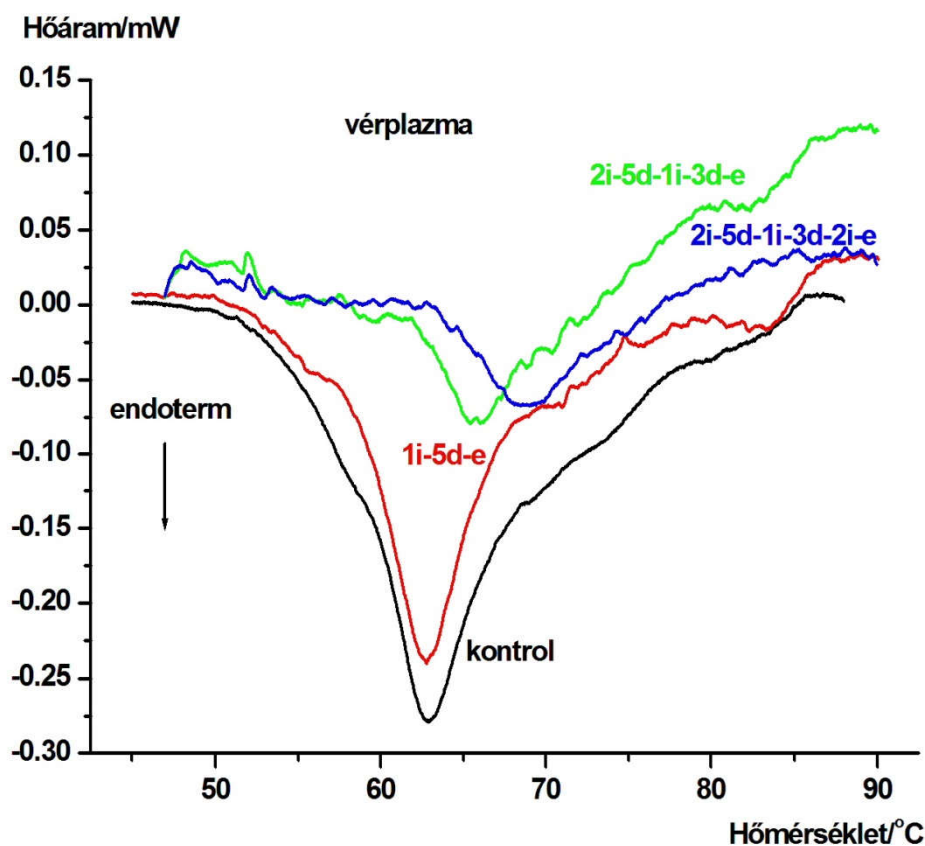
A kísérletben résztvevő állatok 12 csoportot alkottak, a kontroll mellett 11 csoport tagjai kaptak ciklofoszfamidot 1-6 alkalommal mely alapján 7 nagyobb csoportot lehet elkülöníteni hasonlóan a többi vizsgálatunkhoz. A mért termikus adatokat, ahogy eddig is 2 táblázatban prezentáljuk az áttekinthetőség miatt, egymás mellett szerepeltetve a vérplazma és vvt-k eredményeit (12. és 13. táblázat).

kezelések	Termikus paraméterek							
	plazma				vörös vértest			
	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$	$T_{m1}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m2}/^{\circ}\text{C}$	$T_{m3}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_c/\text{Jg}^{-1}$
kontroll (5)	59.9	62.27	84.7	0.78	68.72	75.25	84.51	4.70
három injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-E	55.41	62.01	67.27	0.60	67.30	73.28	79.76	3.97
négy injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-1i-E	59.77	65.53	72.02	0.27	70.76	72.48	83.46	5.50
öt injekció (5)								
2i-5d-1i-3d-2i-E	57.85	68.71	72.80	0.16	-	71.80	-	4.20
hat injekció (5-2)								
2i-5d-1i-3d-3i-E	55.65	59.66	64.75	0.70	68.63	74.86	-	3.41

13. táblázat: tengerimalac vérplazma és vvt hődenaturációs értékei 1-2-szeri ciklofoszfamid kezelés után (T_m : denaturációs hőmérséklet maximum, ΔH_c : tömegre normált kalorimetriás entalpia). A táblázatban a szürke dőlt értékek a kétszeres standard deviációt meghaladják, míg a vastagon kiemelt értékek szignifikáns különbséget jeleznek a kontrollhoz képest ($p < 0,5$, $n=5$).

A ciklofoszfamid vérplazmán okozott hatásait hődenaturációs görbék szemléltetik a dózis függvényében (15. ábra) – a könnyebb átláthatóság érdekében a kontroll mellett csak 3 különböző (1,3 és 5 kezelés utáni) denaturációs görbét ábrázoltunk, melyekből az egész folyamat trendje kiolvasható. A T_{m1} (amely az irodalom szerint a fibrinogén denaturációjának felel meg [81, 127, 128] valamint T_{m3} (globulinok denaturációja) esetében az első kezelés kivételével a denaturációs hőmérsékleti pontok az alacsonyabb tartományba tolódtak, míg a maximális hőáram csökkenő tendenciát mutatott minden kezelésre. A T_{m2} –vel jellemezhető denaturáció, amely a plazma albumin komponensétől származik [81, 127, 128] minden kezelés után szignifikánsan magasabb a kontrollnál. A vizsgált vérplazma mintákban, általánosságban feltételezhetjük, hogy minden esetben legalább 3 különböző termikus

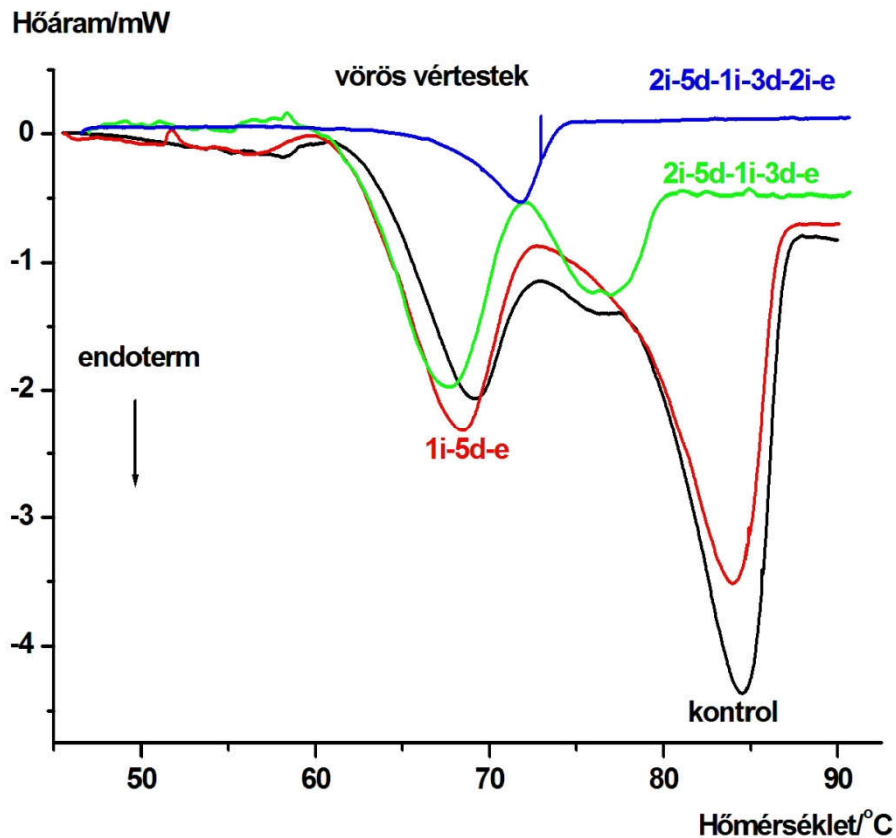
szerkezeti egység van jelen (dekonvolúció nélkül). A ciklofoszfamidok kezelés által erősebben befolyásolt domének a T_{m2} és T_{m3} értékeinek eltolódásával jellemezhetők, melyek közül a szignifikáns mértékűeket ($p < 0,05$) a 12. és 13. táblázatban megvastagítva jelöltünk. A ciklofoszfamid terápia elkezdésére, az első injektálás után kifejezett, szignifikáns emelkedés tapasztalható a denaturációs hőmérsékleti maximumokban (T_m), melyeket a kezelés után eltelt idő és a kezelések száma döntően befolyásol. A kalorimetriás entalpia csökkenése csak a második kezelést követően válik szignifikáns mértékűvé. A harmadik injektálástól viszont már a T_{m1} , a T_{m3} és a ΔH_c termikus paraméterekben szignifikáns csökkenés jelenik meg.



15. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok vérplazma hődenaturációs görbéi

A vörösvértetek esetében egy érdekes különbséget tapasztaltunk, még hozzá a kontroll csoport hődenaturációs görbéjében, mely alapján 4 lépésre elkülöníthető denaturáció lép fel (16. ábra). Az első egy alacsony hőmérsékleten (57°C) megjelenő, kis hőkapacitás változású oladási pont, mely (azonosítási adatok hiánya miatt) nem is szerepel

a táblázatokban (12. és 13. táblázat). Ezt követi 3 endoterm reakció (69, 76 és 84 °C-on). Ezek az átalakulások a kezelések számának növekedésével alacsonyabb hőmérsékletre tolódnak, míg a ötödik kezelés után gyakorlatilag már csak egy endoterm reakció játszódik le a rendszerben.



16. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok vvt hődenaturációs görbéi

Ez a felismerés fontos szereppel játszhat az orvosi kezelések megtervezése során, a klinikumban, és humán felhasználáskor szoros kontrollt tesz szükségessé. Az első csoportban (injektálást követő napon exit) a magasabb hőmérsékletű két endoterm reakció T_{m1} -je szignifikánsan csökkent. Ezzel szemben a két kezeléson átesett csoportokban csak a T_{m3} csökkent szignifikánsan, míg a T_{m1} és T_{m2} értékeiben ingadozás volt tapasztalható. A 3 és 4 dózis ciklofoszfamidot kapott csoportokban az összes olvadási hőmérséklet (kivéve a hatodik kezelést) szignifikánsan csökkent. A kalorimetriás entalpiák az első és negyedik injektálást

követően szignifikáns növekedést, a többiben csökkenést mutatnak, melyben jóval egyértelműbb szerepe van az exit előtt eltelt időnek.

Megbeszélés

Kutatásunkban a széles körben használt ciklofoszfamid okozta hatásokat vizsgáltuk a vérplazma összetevőin és a vörösvértesteken. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy az állatmodellünkön humán protokollal ekvivalensen alkalmazott ciklofoszfamid kezelés hatására mind a vörösvértesteken, mind a vérplazmában DSC-vel detektálható változások figyelhetők meg [129]. A kimutatott eltérések feltételezhetően részben a ciklofoszfamid plazma koncentrációjával állnak összefüggésben, részben a szer által a plazma összetevőkön (az irodalmi adatok alapján elsősorban a fibrinogén, albumin és globulinokon) és vörösvérsejteken kiváltott biológiai hatásokkal, melyek a biológiai törvényszerűségek alapján nagy valószínűséggel működésbeli következményekkel is járnak. Ezen módosulások a különböző mellékhatásokban feltételezhetően szerepet játszanak, így az eltérés mértéke prediktív értékű annak súlyosságát és lefolyását illetően.

Figyelembe véve, hogy a ciklofoszfamid plazma szintjének relatíve gyors és informatív meghatározása a napi gyakorlatban nehézkes, a módszer ez irányú alkalmazása új lehetőségekkel kecsegtet. Mindemellett a ciklofoszfamid ismert és nem kívánt, olykor fatális mellékhatásainak pontosabb előrejelzése szintén fontos, mely feltételezéseink szerint a vér összetevőin kiváltott hatások mértékével, illetve minőségével várhatóan korrelálhat. Ennek pontosabb megítélése még további vizsgálatok tárgyát képezheti, főleg annak tükrében, hogy a módszerünk (DSC) klinikai alkalmazhatóságának megvalósítása egyéb területeken már folyamatban van és a publikációk száma egyre növekszik.

Következtetés

Vizsgálatainkkal egyértelműen bizonyítható a ciklofoszfamid indukálta változások detektálhatósága DSC segítségével a vörösvértesteken és a plazma elemein, mely új lehetőséget teremt a várt hatások és nem kívánt mellékhatások megítélésében, valamint előrejelzésében. A DSC klinikai alkalmazásának folyamata ígéretes, így további kutatások révén újabb hasznos és értékes információt nyerhetünk ezzel a vizsgáló eljárással.

Kísérletsorozatunk értékelése

Vizsgálatainkban ciklofoszfamid okozta hatásokat, általa kiváltott változásokat igyekeztünk kimutatni egy már ismert, de még nem elterjedt módszerrel, a differenciáló pásztázó kalorimetriával.

A ciklofoszfamid perifériás idegre (nervus ischiadicus) kifejtett hatását a kezdeti, kis egyedszámú vizsgálat már előrevetítette [9, 10], amit kiterjesztett vizsgálataink megerősítettek [117]. Habár a T_{m1} és T_{m2} denaturációs hőmérsékleti maximumok mutattak kismértékű eltéréseket, ami a bal oldali T_{m1} esetén tendenciózusnak bizonyult, de egyértelmű igazolással a T_{m3} - mal jellemzett termikus domén szolgált szignifikáns emelkedésével. A perifériás ideg esetén az igazán meggyőző eredményt a kalorimetriás entalpia számítása hozta a hődenaturációs görbéből, mely markáns dózis dependencia mellett egyértelmű szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva. A relatíve nagymértékű entalpiaváltozás erős strukturális változásra, eltérésre utal, mely figyelembe véve az idegszövet kifejezett érzékenységét megalapozottan magyarázza a funkcióbeli károsodást.

A harántcsíkolt izomzat (musculus gastrocnemius) értékeléséhez jelentős tapasztalati eredmények álltak rendelkezésre [112-116]. A ciklofoszfamid károsító hatását az entalpia változása mellett elsősorban T_{m1} és T_{m3} értékek változásai mutatják, mely a perifériás ideghez viszonyítva mérsékeltebbek, de egy irányú csökkenő tendenciát mutatnak. Az eredmények a miozin fejek és az aktin filamentumok érintettségét támasztják alá, összességében az aktomiozin komplex funkciókárosodásával [117]. Fontos kiemelni, hogy funkcionális egységként kell kezelnünk a vizsgált aktomiozin komplexet és az azt beidegző nervus ischiadicust, ami a károsodásuk okozta funkciócsökkenés hatványozódásával jár.

Megjegyzendő, hogy a perifériás ideg és izom vizsgálata során bemutatott oldalkülönbség feltételezhetően technikai okokkal magyarázható, ellenben - amennyiben további vizsgálatok és humán klinikai esetek is mutatnak ilyen jellegű diszkrepanciát - további, ez irányba érzékenyített vizsgálat szükséges a háttérének kimutatására.

A szívizomzat denaturációs görbéje nagyban megegyezik a harántcsíkolt izoméval, így hasonlóan értékes alapinformációkkal rendelkezünk a vizsgálata során. Az eredmények alapján a harántcsíkolt izommal összehasonlítva a szívizom már kisebb dózisú kezelésre (1-2) is érzékeny, szignifikánsabb eltérést mutat T_{m1} és T_{m3} denaturációs hőmérsékleti maximumokban, míg a dózis emelésével (3-4) T_{m2} és T_{m3} mutat jól detektálható változást. A T_{m2} csökkenése a miozin rudak károsodását jeleníti meg. A kalorimetriás entalpia a dózis emelésével fokozódó csökkenést mutat, demonstrálva ezzel a szerkezeti károsodásokat. A teljes vizsgálatot tekintve ebben az esetben is dominánsan a miozin fejek és az aktin filamentumok sérülnek, de a miozin rudak sem maradnak intaktak. Összességében az aktomiozin komplex funkciója, ezáltal a pumpa funkció számottevően csökken. A kalorimetriás entalpia jelezte szerkezeti módosulások feltehetően aktívan hozzájárulnak a szívizom-károsodás, adott esetben a hemorrágiás szívizomgyulladás kialakulásához [118].

A ciklofoszfamid kis mennyiségű, egyszeri alkalmazásának a hatása legszembetűnőbb a vérplazma alkotóelemein, ahol az első kezelést követően egyértelmű növekedés tapasztalható a denaturációs hőmérsékleti maximumokban [129]. Egyszeri kezelést követően az idő múlásával az eltérés fennmarad, ami egyértelműen a ciklofoszfamid tartós hatásáról tanúskodik, vagyis a kezelés leállításától nem várható gyors regeneráció. Újabb kezelésekre a hőmérsékleti maximumok szignifikáns csökkenést mutatnak, mely a biológiai funkciók károsodását feltételezi. A fibrinogén denaturációjának megfeleltethető T_{m1} eltérések feltételezik a fibrinogén diszfunkcióját, vagy csökkent funkcióját, ezáltal a véralvadási rendszer károsodását demonstrálja. Ez a klinikai gyakorlatban a vérzéses, illetve trombembóliás szövődmények lehetőségét vetíti előre. A T_{m2} szemben a T_{m1} és T_{m3} –mal a kontroll csoporthoz viszonyítva, a kezelése alatt csaknem végig szignifikánsan emelkedett, mely eltérés az albumin funkciózavarára utal, ami befolyásolhatja többek között a plazma kolloid ozmotikus nyomását, a vér kötő- és szállító funkcióját, csökkentheti az antioxidáns hatást és a szervezet aminosav tartalékát.

A funkcióbeli károsodásokat erősíti meg a kétszeri injektálástól a többszöri kezelése során az egyre nagyobb mértékű kalorimetriás entalpia csökkenés, ami a szerkezeti átalakulások, módosulások egyre kifejezettebb mértékét demonstrálja.

A vörösvértetek esetében az eredmények nem mutatnak ilyen mértékű egyirányú tendenciát, mind a denaturációs hőmérsékleti maximumokban (T_m), mind a kalorimetriás entalpia eltérésekben ingadozás figyelhető meg, a különbségek számos esetben szignifikáns mértékűek, de irányuk változó. Kiemelhető azonban, hogy nagyobb számú kezelés (5-6) hatására az endoterm reakciók száma egyre csökken. Ez alapján itt is felvethető a funkciókárosodás, ami elsősorban a vér oxigén szállítási kapacitását érintheti, ez azonban az eredmények alapján kevésbé megalapozott. Igazolására a humán klinikai gyakorlatban hosszabb távú ciklofoszfamid kezelést kapó betegek ez irányú célzott vizsgálata javasolható.

Általánosságban megállapítható és az eredményeink alapján alátámasztható a ciklofoszfamid indukálta károsodások dózis dependenciája, mely azonban az érintett szöveti típustól függően változó mértékű és hatású. A vérplazma alkotóelemein és a szívizmon markáns eltérések bizonyítottak, így várhatóan ehhez kapcsolódóan várhatóak a legkomolyabb funkcionálisbeli eltérések is. A perifériás idegen és izmon is egyértelmű a károsító hatás, de itt elsősorban hosszabb távon válik szignifikánssá. A vörösvérteteken szintén tapasztalhatóak jól detektálható eltérések, de az eredmények kevésbé kongruensek, így azok funkcióbeli manifesztálódása bizonytalan, de feltételezhető.

Az értekezés összefoglalása

Munkánkat egy konkrét napi igazságügyi probléma megoldása inspirálta, mely során kísérletes körülmények között sikerült megalapozott választ adni egy jogi és orvosi konzekvenciával járó kérdésre a kemoterápiás kezelést követően.

Figyelembe véve a rosszindulatú daganatos megbetegedések emelkedő tendenciáját a kemoterápiás kezelések okozta mellékhatások egyre markánsabb előfordulása várható. A gyógyszerszintek direkt meghatározása a napi rutinban körülményes és sokszor nehézségekbe ütközik. A beadott dózisokból csak durva következtetéseket lehet levonni egy-egy adott betegnél, mivel a farmakokinetika több okból kifolyólag egyéni variációkat mutathat. Fontos kiemelni, hogy a kemoterápiás szerek többségénél a terápiás és toxikus szint igen közel esik egymáshoz, vagy akár fedhetik is egymást. A DSC vizsgálat segítségével azonban lehetőség nyílik az indirekt hatások kimutatására.

Saját klinikai munkásságomban, az intervenciós onko-radiológiában a szelektív transzarteriális citosztatikus kezelések és kemoembolizációk során, valamint azokat követően fontos szerepet játszhatna, ha relatíve egyszerűen meghatározható vagy megbecsülhető lenne a kemoterápiás gyógyszer szintje, és ebből kifolyólag az adott szelektívnek szánt beavatkozás szisztémás hatása. Az adatok ismeretében következtetést lehetne levonni a terápia várható hatásának, a beavatkozás sikerességének és a kezelés folytatásának megítélésében. Ugyanilyen lényeges az esetleges mellékhatások, a toxikus következmények előrejelzése, mely szintén befolyásolja a beteg további sorsát és kezelését. Eredményeink alapján a vér DSC-vel történő vizsgálatával minderre lehetőség nyílik.

A kutatásunkhoz kiválasztott kemoterápiás szer – ciklofoszamid – alkalmazása esetén jól detektálható dózis dependens eltéréseket sikerült kimutatni mind az ideg-izom komplex, mind a szívizom esetében és a vér alkotóelemeinél is. Eredményeinket szinkron értékelve kiolvasható, hogy milyen dózis esetén alakulnak ki olyan mértékű eltérések a vér alkotóelemein, melyek már nagy valószínűséggel a szívizmon vagy a perifériás idegeken és a harántcsíkolt izmokon létrejövő károsodásokat jelezheti.

Célkitűzéseink teljesülése, az értekezés elért új eredményei

Vizsgálatainkkal megalapozottan megerősítésre került, hogy a ciklofoszfamid hosszú távú alkalmazása során számítani kell perifériás neuropátia és motilitási diszfunkció létrejöttére az ideg-izom komplexen, melynek háttérében strukturális módosulások állnak.

Egyértelmű szerkezeti változások jönnek létre a szívizomzatban, melyek többek között a pumpa-funkció romlása által nagy valószínűséggel szerepet játszik a ciklofoszfamid kezelések szövődményeként ismert kardiomiopátia kialakulásában.

A vér alakos elemein, vörösvértesteken és vérplazmán DSC segítségével szintén jól kimutatható változások alakulnak ki. A termogramok eltérése jól jellemezhetően dózis dependenciát mutat, így indirekt információt nyújt az aktuális és kumulatív gyógyszer-szintről a keringésben. Emellett a bizonyított szerkezeti átalakulások mértéke feltehetően korrelál a funkcionális módosulásokkal, diszfunkciókkal, de az ez irányú pontosabb megállapításokhoz további vizsgálatok, humán alkalmazás során történő mérések szükségesek.

A DSC-vel detektálható eltérések prediktív értékűek a dózis dependens mellékhatások, szövődmények megítélésben.

Mindezek alapján a megfelelő humán standardizációkat követően a DSC alkalmasnak tartható a napi klinikai kezelések során a betegek szoros követésében, a mellékhatások megelőzésében, mérséklésében.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani munkahelyi vezetőimnek, Dr. Bogner Péter professzor úrnak, a Radiológiai Klinika igazgatójának és Dr. Battyáni István tanár úrnak, az Intervenciós Radiológia tanszékvezetőjének a tudományos értekezés megírására való ösztönzésükért, segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Nyitrai Miklós egyetemi tanár úrnak, a doktori program vezetőjének, hogy befogadott, a kutatáshoz lehetőséget adott és munkámban támogatott.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Lőrinczy Dénes professzor úrnak, odaadó lelkesedéséért, fáradhatatlan biztatásáért kutatásunk során. A kalorimetriás mérések kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítsége nélkül vizsgálatunk nem tudott volna megvalósulni. Önzetlensége örök példa marad számomra.

Köszönöm Dr. Barthó Lóránd professzor úrnak az állatkísérletekhez nyújtott tevéleges támogatását, és külön köszönet illeti Dr. Könczöl Franciska egyetemi docenst, az állatkísérletek kivitelezésében és a preparatív munka végzésében nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

Hálás köszönettel tartozom családomnak, feleségemnek és gyermekeinknek türelmükért és megértésükért. Támogatásukkal, biztatásukkal elengedhetetlenül hozzájárultak munkám elkészültéhez.

Irodalomjegyzék

1. Központi Statisztikai Hivatal: A halálloki struktúra változása Magyarországon, 2000-2012, 2014. május, <https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/idoszaki/pdf/halalokistruk.pdf>, letöltve: 2017.01.02.
2. Központi Statisztikai Hivatal: Születéskor várható élettartam, nemenként (2003-2014) http://www.ksh.hu/docs/hun/eurostat_tablak/tab/tps00025.html, letöltve: 2017.01.02.
3. Verstappen CC, Heimans JJ, Hoekman K, Postma TJ: Neurotoxic complications of chemotherapy in patients with cancer: clinical signs and optimal management. *Drugs*, 2003, 63(15):1549-1563.
4. Floyd JD, Nguyen DT, Raymond L, Lobins RL, Bashir Q., Doll DC, Perry MC: Cardiotoxicity of Cancer Therapy, *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23:30, 7685-7696.
5. Yeh ETH, Bickford CL: Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Incidence, Pathogenesis, Diagnosis, and Management, *Journal of the American College of Cardiology* 2009, (53) 24: 2231-2247.
6. Cozzi PJ, Hall JB: Cyclophosphamide in the treatment of pulmonary diseases: survey of use, training, and practitioner knowledge base. *Chest*, 1999, 116(5):1159-62
7. Kim J, Chan JJ: Cyclophosphamide in dermatology, *Australasian Journal of Dermatology*, 2017 (58)1: 5-17.
8. WHO Model List of Essential Medicines (April 2015) http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/EML_2015_FINAL_amended_JUN2015.pdf?ua=1, letöltve: 2015.11.11.
9. Könczöl F, Wiegand N, Nót LG, Lőrinczy D: Examination of the cyclophosphamide-induced polyneuropathy on guinea pig sciatic nerve and gastrocnemius muscle with differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2014. 115: 2239-2243.
10. Könczöl F, Farkas N: A tumor meggyógyult, és a beteg? *Orvosi Hetilap*, 2013, (154.) 13: 509–514.

11. Gyires K., Fürst Zs.: A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2011.
12. Shulman-Roskes EM, Noe DA, Gamcsik MP, et al. The partitioning of phosphoramidate mustard and its aziridinium ions among alkylation and P-N bond hydrolysis reactions. *Journal of Medicinal Chemistry* 1998; 41: 515-529.
13. Povirk LF, Shuker DE. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research* 1994; 318: 205-26.
14. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T: DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids*, 2010 (2010): 1-7.
15. Bruce WR, Meeker BE, Valeriote FA. Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* 1966; 37: 223-45.
16. De Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH: Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*. 2005. 44(11):1135-64.
17. Cox PJ: Cyclophosphamide cystitis: identification of acrolein as the causative agent. *Biochemical Pharmacology*. 1979, 28: 2045-2049.
18. Boyd VL, Robbins JD, Egan W, Ludeman SM: ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites. *Journal of Medicinal Chemistry* 1986; 29 (7): 1206-1210.
19. Jao JY, Jusko WJ, Cohen JL: Phenobarbital effects on cyclophosphamide pharmacokinetics in man. *Cancer Research*. 1972, 32: 2761-2764.
20. Yule SM, Price L, Pearson AD, Boddy AV: Cyclophosphamide and ifosfamide metabolites in the cerebrospinal fluid of children. *Clinical Cancer Research*. 1997, 3(11): 1985-92.
21. Williams ML, Wainer IW, Granvil CP, Gehrcke B, Bernstein ML, Ducharme MP: Pharmacokinetics of (R)- and (S)-cyclophosphamide and their dechloroethylated metabolites in cancer patients. *Chirality* 1999. 11(4): 301-308.
22. Joqueviel C, Martino R, Gilard V, Malet-Martino M, Canal P, Niemeyer U: Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorous-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Drug Metabolism and Disposition*. 1998. 26: 418-428.

23. Wang D, Wang H: Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification The role of xenobiotic receptors. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2012. 2(2): 107–117.
24. Bagley CM, Bostick FW, DeVita VT: Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Research*. 1973; 33: 226-233.
25. Hassan M, Svensson USH, Ljungman P, Björkstrand B, Olsson H, Bielenstein M, Abdel-Rehim M, Nilsson C, Johansson M, Karlsson MO: A mechanism based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide of 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard autoinduction in breast cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999. 48: 669-677.
26. Huitema ADR, Mathot RAA, Tibben MM, et al. A mechanism-based pharmacokinetic model for the cytochrome P450 drug-drug interaction between cyclophosphamide and thioTEPA and the autoinduction of cyclophosphamide. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2001. 28: 211-230.
27. Petros WP, Broadwater G, Berry D, et al. Association of high-dose cyclophosphamide, cisplatin, and carmustine pharmacokinetics with survival, toxicity, and dosing weight in patients with primary breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2002. 8: 698-705.
28. Richardson ME, Siemann DW: DNA damage in cyclophosphamide-resistant tumor cells: the role of glutathione. *Cancer Research* 1995. 55: 1691-1695.
29. Gamcsik MP, Dolan ME, Andersson BS, Murray D: Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Current Pharmaceutical Design* 1999. 5: 587-605
30. McDonald GB, Slattery JT, Bouvier ME, Ren S, Batchelder AL, Kalhorn TF, Schoch HG, Anasetti C, Gooley T: Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 101: 2043-2048.
31. Joy MS, La M, Wang J, Bridges AS, Hu Y, Hogan SL, Frye RF, Blaisdell J, Goldstein JA, Dooley MA, Brouwer KLR, Falk RJ: Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide pharmacokinetics in patients with glomerulonephritis secondary to lupus and small vessel vasculitis. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012; 74: 445-455.
32. Arnold H, Bourseaux F, Brock N: Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours in rats. *Nature*. 1958. 181: 931.

33. Chighizola C, Ong VH, Denton CP: Cyclophosphamide as Disease-modifying Therapy for Scleroderma. *International Journal of Clinical Rheumatology*, 2011. 6(2): 219-230.
34. De Groot K, Rasmussen N, Bacon PA, Tervaert JW, Feighery C, Gregorini G, Gross WL, Luqmani R, Jayne DR: Randomized trial of cyclophosphamide versus methotrexate for induction of remission in early systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis & Rheumatology*. 2005. 52(8): 2461-2469.
35. Takada K, Illei GG, Boumpas DT: Cyclophosphamide for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2001. 10: 154-161.
36. Langford CA: Cyclophosphamide as induction therapy for Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 2011. 164 (Suppl. 1.): 31-34.
37. Mielcarek M, Furlong T, O'Donnell PV, Storer BE, McCune JS, Storb R, Carpenter PA, Flowers ME, Appelbaum FR, Martin PJ: Posttransplantation cyclophosphamide for prevention of graft-versus-host disease after HLA-matched mobilized blood cell transplantation. *Blood*, 2016. 127 (11): 1502-1508.
38. Hurd ER, Giuliano VJ: The effect of cyclophosphamide on B and T lymphocytes in patients with connective tissue diseases. *Arthritis and Rheumatism*, 1975. (18) 1: 67-75.
39. Kobos R, Shukla N, Renaud T, Prockop SE, Boulad F, Steinherz PG: High-dose cyclophosphamide for the treatment of refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia in children. *Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2014. 36(5): 265-270.
40. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, Smith SC, Kantarjian HM, Freireich EJ, Keating MJ: Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016. 127(3): 303-309.
41. Thakar K, Novero A, Das A, Lisinschi A, Mehta B, Ahmed T, Liu D: CEPP regimen (cyclophosphamide, etoposide, procarbazine and prednisone) as initial treatment for Hodgkin lymphoma patients presenting with severe abnormal liver function. *Biomarker Research*. 2014. 2: 12.

42. Veal GJ, Cole M, Chinnaswamy G, Sludden J, Jamieson D, Errington J, Malik G, Hill CR, Chamberlain T, Boddy AV: Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer*. 2016. 55: 56-64.
43. Valero V: Combination docetaxel/cyclophosphamide in patients with advanced solid tumors. *Oncology*. 1997. 11(Suppl 8): 34-36.
44. Sullivan MP, Ramirez I: Curability of Burkitt's lymphoma with high-dose cyclophosphamide-high-dose methotrexate therapy and intrathecal chemoprophylaxis. *Journal of Clinical Oncology*. 1985. 3(5): 627-636.
45. Gebbia V, Boussen H, Valerio MR: Oral metronomic cyclophosphamide with and without methotrexate as palliative treatment for patients with metastatic breast carcinoma. *Anticancer Research*. 2012. 32(2): 529-36.
46. Sonneveld P, Broijl A: Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Haematologica*. 2016. 101 (4): 396-406.
47. Grunberg SM: Cyclophosphamide and etoposide for non-small cell and small cell lung cancer. *Drugs*. 1999. 58 Suppl. 3: 11-15.
48. Handolias D, Quinn M, Foo S, Mileskin L, Grant P, Dutu G, Rischin D: Oral cyclophosphamide in recurrent ovarian cancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2016. 12(1): 154-160.
49. Martin-Suarez I, D'Cruz D, Mansoor M, Fernandes AP, Khamashta MA, Hughes GR: Immunosuppressive treatment in severe connective tissue diseases: effects of low dose intravenous cyclophosphamide. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1997. 56(8): 481-487.
50. Martin F, Lauwerys B, Lefèbvre C, Devogelaer JP, Houssiau FA: Side-effects of intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus*. 1997. 6(3): 254-257.
51. Sitzia J, Huggins L: Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. *Cancer Practice* 1998. 6(1): 13-21.
52. Dan D, Fischer R, Adler S, Förger F, Villiger PM: Cyclophosphamide: As bad as its reputation? Long-term single centre experience of cyclophosphamide side effects in the treatment of systemic autoimmune diseases. *Swiss Medical Weekly*. 2014. 23: 144:w14030.

53. Niemeijer ND, Alblas G, van Hulsteijn LT, Dekkers OM, Corssmit EP: Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine and dacarbazine for malignant paraganglioma and pheochromocytoma: systematic review and meta-analysis. *Clinical Endocrinology*. 2014. 81(5): 642-651.
54. Notermans NC, Lokhorst HM, Franssen H, Van der Graaf Y, Teunissen LL, Jennekens FG, Van den Berg LH, Wokke JH: Intermittent cyclophosphamide and prednisone treatment of polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neurology*. 1996. 47(5): 1227-1233.
55. Hamidou MA, Belizna C, Wiertlewsky S, Audrain M, Biron C, Grolleau JY, MussiniJM: Intravenous cyclophosphamide in refractory polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy: an uncontrolled open trial. *American Journal of medicine* 2005. 118(4): 426-430.
56. Kemp G, Rose P, Lurain J, Berman M, Manetta A, Rouillet B, Homesley H, Belpomme D, Glick J: Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 1996. 14: 2101–2112.
57. Spitzer TR, Cirenza E, McAfee S, Foelber R, Zarzin J, Cahill R, Mazumder A: Phase I-II trial of high-dose cyclophosphamide, carboplatin and autologous bone marrow or peripheral blood stem cell rescue. *Bone Marrow Transplant* 15 1995. 537-542.
58. Tschöp K, Rommel F, Schmidkonz P, Emmerich B, Schulze J: Neuropathy after cyclophosphamide high dose chemotherapy in a Morbus Werlhof patient. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2001; 126(12): T17-T20.
59. Martyn CN, Hughes RAC: Epidemiology of peripheral neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1997. 62(4): 310–318.
60. Leitsch, M. M., Sherman, W. H., Brannagan, T. H. 3rd.: Distal acquired demyelinating symmetric polyneuropathy progressing to classic chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and response to fludarabine and cyclophosphamide. *Muscle Nerve*, 2013. 47, 292–296.
61. Misra UK, Kalita J, Nair PP: Diagnostic approach to peripheral neuropathy. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2008. 11: 89–97.

62. Coukell A, Faulds D: Epirubicin - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the management of breast cancer. *Drugs* 1997. 53: 453-482.
63. Schimmel KJ, Richel DJ, van den Brink RB, Guchelaar HJ: Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Review* 2004. 30:181-191.
64. Santos GW, Sensenbrenner LL, Burke PJ, Mullins GM, Blas WB, Tutschka PJ, Slavin RE: The use of cyclophosphamide for clinical marrow transplantation. *Transplantation Proceedings* 1972. 4: 559-564.
65. Mills BA, Roberts RW: Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy: a report of two cases and review of the English literature. *Cancer*. 1979. 43(6):2223-2226.
66. Taniguchi I.: Clinical significance of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Internal Medicine*, 2005. 44(2): 89-90.
67. Asiri Y.A.: Probulcol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and Bax signal expression in rat cardiac tissues. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2010. 3(5): 308–316.
68. Dhesi S, Chu MP, Blevins G, Paterson I, Larratt L, Oudit GY, Kim DH: Cyclophosphamide-Induced Cardiomyopathy: A Case Report, Review, and Recommendations for Management. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*. 2013: 1–7.
69. Shanholtz C.: Acute life-threatening toxicity of cancer treatment. *Critical Care Clinics*. 2001. 17: 483-502.
70. Brockstein BE, Smiley C, Al-Sadir J, Williams SF: Cardiac and pulmonary toxicity in patients undergoing high-dose chemotherapy for lymphoma and breast cancer: prognostic factors. *Bone Marrow Transplant*. 2000. 25:885-894.
71. Eitel I, Kubusch K, Strohm O, Desch S, Mikami Y, de Waha S, Gutberlet M, Schuler G, Friedrich MG, Thiele H: Prognostic value and determinants of a hypointense infarct core in T2-weighted cardiac magnetic resonance in acute reperfused ST-elevation-myocardial infarction. *Circulation: Cardiovascular Imaging*; 2011. 4: 354-362.
72. Fonyó A (ed.): *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1999
73. Szakács H, Dr. Varga Cs, Nagy R: *Polimerek mérés technikája*, Pannon Egyetem, 2012.
74. Watson ES, O'Neill MJ: Differential microcalorimeter. *United Patients* 1966; 2: 1-10.

75. Watson ES, O'Neill MJ, Justin J, Brenner N: A Differential Scanning Calorimeter for quantitative differential thermal analysis. *Analytical Chemistry* 1964. 36: 1233-1238.
76. Bruylants G, Wouters J, Michaux C: Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Current Medicinal Chemistry*. 2005. 12: 2011-2200.
77. Lőrinczy D, Belágyi J: Effects of nucleotide on skeletal muscle myosin unfolding in myofibrils by DSC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995. 217: 592-598.
78. Dergez T, Lőrinczy D, Könczöl F, Farkas N, Belágyi J: Differential scanning calorimetry study of glycerinated rabbit psoas muscle fibres in intermediate state of ATP hydrolysis. *BMC Structural Biology*. 2007. 7: 41-51.
79. Zapf I, Fekecs T, Moezzi M, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, Horváth PO, Ferencz A: Differential scanning calorimetry of blood plasma in breast cancer patients. *Magyar Onkológia*. 2012. 56: 274-279.
80. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB: Calorimetric analysis of the plasma proteome. *Seminars in Nephrology*. 2007. 27: 621-626.
81. Garbett NC, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Chaires JB: Clinical application of plasma thermograms: utility, practical approaches and considerations. *Methods*. 2015. 76: 41-50.
82. Wiegand N, Vámhidy L, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetric examination of ruptured lower limb tendons in human. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2010. 101: 487-492.
83. Fekecs T, Zapf I, Ferencz A, Lőrinczy D: Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of human plasma in melanoma patients with or without regional lymph node metastases. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2012. 108: 149–152.
84. Zapf I, Fekecs T, Ferencz A, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, Lőrinczy D: DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochimica Acta*. 2011. 524 :88–91.
85. Visegrády B, Lőrinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M: A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Letters*. 2005. 579(1): 6-10.

86. Levitsky DI, Nikolaeva OP, Orlov VN, Pavlov DA Ponomarev MA, Rostkova EV: Differential scanning calorimetric studies on myosin and actin. *Biochemistry (Moscow)*. 1998. 63(3): 322-333.
87. Spink CH. Differential scanning calorimetry. *Methods in Cell Biology*. 2008. 84: 115-41.
88. Edidin M: Rotational and translational diffusion in membranes. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1974. 3:179-201.
89. Bálint G, Than P, Domán I, Wiegand N, Horváth G, Lőrinczy D: Calorimetric examination of the human meniscus. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2009. 95: 759–761.
90. Celej MS, Dassie SA, González M, Bianconi ML, Fidelio GD: Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins. *Analytical Biochemistry*. 2006. 350: 277-284.
91. Brandts JF, Lin LN: Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 1990. 29: 6927-6940.
92. Wiegand N, Vámhidy L, Patczai B, Dömse E, Than P, Kereskai L, Lőrinczy D: Differential scanning calorimetric examination of transverse carpal ligament in carpal tunnel disease. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2009; 95:793–796.
93. Wiegand N, Vámhidy L, Patczai B, Dömse E, Than P, Kereskai L, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetric examination of the degenerated human palmar aponeurosis in Dupuytren disease. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2009. 95: 797–800.
94. Wiegand N, Vámhidy L, Lőrinczy D.: Differential scanning calorimetric examination of ruptured lower limb tendons in human. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2010. 101: 487–92.
95. Wiegand N, Vámhidy L, Kereskai L, Lőrinczy D: Differential scanning calorimetric examination of the ruptured achilles tendon in human. *Thermochimica Acta*. 2010. 498: 7–10.
96. Naumov I, Wiegand N, Patczai B, Vámhidy L, Lőrinczy D: Differential scanning calorimetric examination of the human hyaline cartilage of the femoral head after femoral neck fracture. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2011. 102: 1–7.

97. Naumov I, Lőrinczy D, Várhidy L, Than P, Wiegand N. Differential scanning calorimetric examination of the interfacial membrane in failed hip joint replacements. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2012. 109: 783–787.
98. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA: Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011. 50(5): 614–627.
99. Lőrinczy D, Belágyi J.: Effects of nucleotide on skeletal muscle myosin unfolding in myofibrils by DSC. *Biochemical and Biophysics Research Communications*. 1995. 217: 592–598.
100. Belágyi J, Lőrinczy D: Internal motions in the catalytic domain of myosin heads in muscle fibres effects of ADP and ATP. *Biochemical and Biophysics Research Communications*. 1996. 219: 936–940.
101. Lőrinczy D, Belágyi J: Comparative study of myosins in solutions and supramolecular complexes. Effect of nucleotides. *Thermochimica Acta*. 1997. 296: 161–168.
102. Lőrinczy D, Hartvig N, Belágyi J: Nucleotide analogue induces global and local changes in muscle fibres. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2001. 64: 651–658.
103. Dergez T, Könczöl F, Farkas N, Belágyi J, Lőrinczy D: DSC study of glycerol-extracted muscle fibers in intermediate states of ATP hydrolysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005. 80: 445–449.
104. Lőrinczy D, Belágyi J: Intermediate states of myosin head during ATP hydrolysis cycle in psoas muscle fibres by EPR and DSC (a review). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2007. 90: 611–621.
105. Dergez T, Lőrinczy D, Könczöl F, Farkas N, Belágyi J: Differential scanning calorimetry study of glycerinated rabbit psoas muscle fibres in intermediate state of ATP hydrolysis. *BMC Structural Biology*. 2007. 7: 41–50.
106. Singleton JR, Smith AG: The diabetic neuropathies: practical and rational therapy. *Seminars in Neurology*. 2012. 32(3): 196-203.
107. Chopra K, Tiwari V: Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2012. 73(3): 348–362.

108. Manji H: Drug-induced neuropathies. *Handbook of Clinical Neurology*. 2013. 115: 729-742.
109. Rudnicki SA, Dalmau J: Paraneoplastic syndromes of the peripheral nerves. *Current Opinion in Neurology*. 2005. 18(5): 598-603.
110. Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Katsuno M, Doi H, Tanaka F, Sobue G: Clinicopathologic features of folate-deficiency neuropathy. *Neurology*. 2015. 84(10): 1026-1033.
111. Gázsó I, Kráncz J, Bellyei Á, Lőrinczy D.: DSC analysis of the abnormalities of human leg skeletal muscles: a preliminary study. *Thermochimica Acta*. 2003. 402: 117–122.
112. Wiegand N, Vámhidy L, Patczai B, Dömse E, Kereskai L, Lőrinczy D: Differential scanning calorimetric examination of the human skeletal muscle in a compartment syndrome of the lower extremities. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2009. 98: 177–182.
113. Könczöl F, Lőrinczy D, Vértés Zs, Hegyi Gy, Belágyi J: Intermonomer cross-linking affects the thermal transitions in F-actin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2010. 101: 549-553.
114. Türmer K, Könczöl F, Lőrinczy D, Belágyi J: AMP.PNP affects the dynamical properties of monomer and polymerized actin. A DSC and an EPR study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2012. 108: 95-100.
115. Könczöl F, Belágyi J, Lőrinczy D: Thermal and dynamic behaviour of the actin monomer in case of different cations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2013. 111: 1717-1723.
116. Lőrinczy D.: The „Green Issue" of JTAC as a great idea of Judit Simon. . *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2015. 120: 13-22.
117. Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the peripheral nerve and muscle damage in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2016. 126: 47-53.
118. Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the left ventricle damage in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2017. 127: 1181–1185.

119. Szalai Zs, Molnár FT, Lőrinczy D: Role of differential scanning calorimetry (DSC) in the staging of COPD: A new approach to an old definition problem. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2017. 127: 1231–1238.
120. Moezzi M, Ferencz A, Lőrinczy D: Evaluation of blood plasma changes by differential scanning calorimetry in psoriatic patients treated with drugs. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2014. 116: 557–562
121. Moezzi M, Zapf I, Fekecs T, Nedvig K, Lőrinczy D, Ferencz A: Influence of oxidative injury and monitoring of blood plasma by DSC on patients with psoriasis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2016. 123: 2037-43.
122. Ferencz A, Fekecs T, Lőrinczy D: Differential scanning calorimetry, as a new method to monitor human plasma in melanoma patients with regional lymph node or distal metastases. In book: *Skin Cancer Overview*, Editor: Xi Y., InTech. 2011; 141–151. Available: <http://www.intechopen.com/books/skin-cancer-overview/differential-scanning-calorimetry-as-a-new-method-to-monitor-human-plasma-in-melanoma-patients-with->
123. Todinova S, Krumova S, Gartcheva L, Robeerst C, Taneva SG: Microcalorimetry of Blood Serum Proteome: A Modified Interaction Network in the Multiple Myeloma Case. *Analytical Chemistry*. 2011. 83: 7992–7998
124. Krumova S, Rukova B, Todinova S, Gartcheva L, Milanova V, Toncheva D, Taneva SG: Calorimetric monitoring of the serum proteome in schizophrenia patients. *Thermochimica Acta*. 2013. 572: 59–64.
125. Rai SN, Pan J, Cambon A, Chaires JB, Garbett NC: Group Classification based on High-Dimensional Data: Application to Differential Scanning Calorimetry Plasma Thermogram Analysis of Cervical Cancer and Control Samples. *Open Access Medical Statistics* 2013. 3:1-9.
126. Garbett NC, Merchant ML, Chaires JB, Klein JB: Calorimetric Analysis of the Plasma Proteome: Identification of Type I Diabetes Patients With Early Renal Function Decline. *Biochimica and Biophysica Acta* 2013. 1830(10): 4675-4680.
127. Michnik A: Blood plasma, serum and serum proteins microcalorimetric studies aimed at diagnosis support. In book: *Thermal Analysis in Medical Application*, Editor: Lőrinczy D., Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2011. 171–190.

128. Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm CW, Jenson AB, Chaires JB. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Experimental and Molecular Pathology*. 2009. 86: 186-191.
129. Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the blood plasma and red blood cells in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2017. 127:1239–1243.

Közlemények és előadások jegyzéke

Az értekezés tárgykörébe tartozó közlemények

Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the peripheral nerve and muscle damage in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2016. 126: 47-53.

IF: 1,781

Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the left ventricle damage in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2017. 127: 1181–1185.

IF: 1,781

Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the blood plasma and red blood cells in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2017. 127:1239–1243

IF: 1,781

Farkas P, Lőrinczy D: New possibilities of application of differential scanning calorimetry - new clinical diagnostic methods on the horizon? Temperature. 2017. 4(2): 1-3.

Értekezés tárgykörébe tartozó előadások:

Farkas Péter I. - Könczöl Franciska - **Lőrinczy Dénes:**

Examination of the cyclophosphamide induced polyneuropathy on guinea pig sciatic nerve, gastrocnemius and heart muscle as well as in blood samples with DSC.

12th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis and 5th Czech – Hungarian – Polish – Slovakian Thermoanalytical Conference Zakopane, Lengyelország, 2015.

Nem a disszertáció tárgykörébe tartozó poszter:

Farkas P., Járay Á., Rostás T., Battyáni I.: Retenciós típusú appendicocele – XI. Lélek Imre Emlékülés, Modern Képképző Diagnosztikai Konferencia és Továbbképzés, Hévíz, 2013

Nem a disszertáció tárgykörébe tartozó előadások:

Farkas P., Járay Á.: A vese kontrasztanyag ultrahang vizsgálata – Területi Radiológus Továbbképzés, Pécs, 2013.

Farkas P., Járay Á., Bugya T., Battyáni I.: A transzplantált vese kontrasztanyag UH vizsgálata – kezdeti tapasztalataink - 26. Soproni Ultrahang Napok, Sopron, 2013.

Farkas P., Járay Á., Battyáni I.: Vesebetegségek és CEUS: indikációk – A vese kontrasztanyag ultrahang vizsgálata – II. CEUS tanfolyam, Pécs, 2013.

Farkas P., Harmat Z.: Ultrahang diagnosztika az urológiában I-II-III. - Magyar Urológia Szakmai Kollégium Szakorvosi felkészítő továbbképző program, Pécs, 2014.

Farkas P., Járay Á.: UH kontrasztanyagok; CEUS vizsgálatok kivitelezése, lehetséges arte factok – Kötelező Szintentartó Tanfolyam, Pécs, 2014.

Farkas P., Járay Á.: Kontrasztanyag UH vizsgálatok I-II. + esetbemutatás

Ultrahang-diagnosztika tanfolyam, Szeged, 2015.

Farkas P.: Urolithiasis diagnosztikája – Ultrahang – Magyar Urológia Szakmai Kollégium Szakorvosi felkészítő továbbképző program, Pécs, 2015.

Farkas P., Harmat Z., Battyáni I.: A kontrasztanyag ultrahangvizsgálat lehetőségei és korlátai a vese daganatok diagnosztizálásában

27. Soproni Ultrahang Napok, Sopron, 2015.

Farkas P., Harmat Z., Rostás T., Battyáni I.: Urológiai intervenciós radiológia

16. Pécsi Intervenciós Radiológiai Szimpózium Pécs, 2015.

Farkas P., Járay Á.: A kontrasztanyag UH képalkotás fizikai alapjai.

Farkas P., Járay Á.: A vese CEUS vizsgálata.

Farkas P.: Workshop I.

Farkas P.: Workshop II.

3. CEUS tanfolyam, Pécs, 2015.

Farkas P., Járay Á.: Kontrasztanyag UH vizsgálatok I-II. + esetbemutatás

Ultrahang-diagnosztika tanfolyam, Szeged, 2016.

Bányai D., Koppán M., Mátrai G., Farkas P.: Vesedaganat várandós asszonyban

Tanulságos esetek fóruma, PTE ÁOK, Pécs, 2016.

Farkas P.: A kismedence és a prosztata képalkotó diagnosztikája

Magyar Urológia Szakmai Kollégium Szakorvosi felkészítő továbbképző program, Pécs, 2016.

Farkas P.: UH diagnosztika az érsebészetben.

Farkas P.: Endovascularis technikák, klinikai esetek.

Érsebészeti aktualitások - Kötelező szinten tartó továbbképző kurzus /érsebészet/ Pécs, 2016

Farkas P.: Kismedencei térfoglaló folyamatok diagnosztikája a legkorszerűbb képalkotó vizsgálatok (CT, MR, PET) tükrében

Magyar Urológusok Társasága XXI. Kongresszusa, Debrecen, 2016.

Farkas P., Járay Á.: Kontrasztanyag UH vizsgálatok I-II. + esetbemutatás

Ultrahang-diagnosztika tanfolyam, Szeged, 2017.

Farkas P., Járay Á.: A kontrasztanyag UH képalkotás fizikai alapjai.

Farkas P., Járay Á.: A vese CEUS vizsgálata.

Farkas P.: Workshop I.

Farkas P.: Workshop II.

4. CEUS tanfolyam, Pécs, 2017.

Farkas P.: Képalkotó diagnosztikai lehetőségekre és péniszdaganatok esetében

Magyar Urológia Szakmai Kollégium Szakorvosi felkészítő továbbképző program, Pécs, 2017.

Farkas P.: Uro-onkológia: vese, húgyhólyag és heredaganatok radiológiája.

A has és kismedence képalkotó diagnosztikája - radiológus rezidens tanfolyam, Pécs, 2017.