

Témavezető: Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanár
PTE, Orvostudományi Kar
Kísérletes Sebészeti Intézet

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Dr. Gál János

Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar
Anaesthesiológiai és Intenzív Therápiás Intézet

Pécs

2000

I. Bevezetés

Az ischaemiás szívbetegség és ennek következményeként fellépő szövődmények, halálozások a statisztikák vezető helyét foglalják el hazánkban és a fejlett országokban. A jelenlegi terápiás beavatkozások célja, a szív felborult energia szükséglet és ellátás egyensúlyának visszaállítása, illetve ezen eltérés csökkentése. A coronaria keringés - energia ellátás - javítása érdekében elvégzett coronaria artéria bypass graft (CABG) operáció közben, azonban szintén számolni kell az ischaemiás-reperfúziós károsodások lehetőségével. A myocardiumban normoxiás körülmények között túlsúlyban lévő szabad zsírsav metabolizmus során történő energiaképzés oxigénhiányos környezetben az anaerob glikolitikus folyamatok irányába terelődik. Az anaerob energiatermelés következtében a piruvát-lebomlás a laktát-keletkezés irányába tolódik el. A piruvát-laktát-shunt hatására nagyfokú szöveti laktát-felzaporodás, laktacidózis lép fel a sejtekben, melynek eredményeként blokkolódik egy - a glikolízis folyamatában kulcsfontosságú - a piruvát-foszfofruktokináz (PFK) enzim működése, amelynek következményeként tovább csökken a sejtek energiakészlete. Ezek a patológias folyamatok nem képesek fenntartani a nagy energiatartalmú molekulák képzését, mely a sejtek reverzibilis, majd később irreverzibilis károsodásához vezetnek. A CABG műtétre kerülő betegek már eredetileg is sérült szív szöveteinek műtét alatti ischaemiás-reperfúziós károsodását teljesen kivédeni jelenleg még nem tudjuk. Azonban újabb sebészi, konzervatív cardioprotektív eljárások, gyógyszerek alkalmazásával törekednünk kell a szív lehető legjobb „kondícióban” tartására az inzultusok idején, valamint az óhatatlanul fellépő ischaemiás-reperfúziós károsodások mértékének mennyiségi és minőségi csökkentésére.

A fruktóz-1,6-difoszfát (FDF), a glikolitikus folyamatokban szerepet játszó intermedier hexóz, mely az emberi szervezetben egyébként is megtalálható természetes anyag. Az FDF jellemző tulajdonsága, hogy a PFK enzimet megkerülve, be tud lépni az energiatermelő folyamatokba és ischaemiás környezetben képes a glikolízis reaktiválására, ezzel biztosítva többletenergiát a hypoxiás környezetbe került sejtek számára. Ezen ismeretek birtokában logikailag megalapozottnak látszott az FDF klinikai alkalmazása és az ischaemiás szívre kifejtett cardioprotektív hatásának vizsgálata.

Vizsgálataink célkitűzései

1. A *klinikai vizsgálataink* célja a CABG műtéten átesett, FDF-t kapott betegek felépülésének és cardiovascularis státuszának nyomonkövetésével az FDF cardioprotektív hatásosságának összehasonlítása, az 5%-os dextrózt kapott kontrollcsoporttal.

2. Az FDF-ről megjelent tanulmányok, az FDF hypoxiás körülmények között, a sejtek energiatermelő folyamatában betöltött reaktiváló szerepét hangsúlyozták. Ezen megállapítás ellenőrzésére, a klinikai vizsgálatokba bevont betegek egy csoportjánál a sínus coronariusából és arteria radialisából nyert vérmintákban lévő *nukleotid degradációs termékek* mennyiségének és kinetikai változásának *meghatározását* végeztük el.

3. A klinikai vizsgálatok eredményeinek elemzéséből kiderült, hogy csak a kombináltan (intravénásan és cardioplegiás oldatban) adott FDF-nek van kedvező cardioprotektív hatása az 5%-os dextrózzal szemben. Ezzel szemben az intravénásan, vagy csak cardioplegiában alkalmazott FDF nem mutatott egyértelmű előnyös hatásokat. Az FDF pozitív klinikai hatása a hemodinamikai paraméterekben mutatkozott meg a 12-18 órás idő-intervallumokban. Feltételeztük, hogy az FDF ezt a hatását a vasculatúrán jelentkező, hosszabb időt igénybe vevő regulációs mechanizmuson keresztül váltotta ki. Ezen hipotézis vizsgálata céljából alkalmaztuk az *in vitro humán érgyűrű modell-kísérleteinket*, melyben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az FDF szerepet játszik-e a direkt vasoreguláció folyamatában.

4. Az érgyűrűkísérletekkel párhuzamosan vizsgáltuk az FDF coronaria endothelsejtekre kifejtett hatását is. Mivel a humán in vivo mérések elvégzése nehéz és a CABG operációra kerülő betegre nézve fokozott kockázattal járt volna, ezért *in vitro patkányszív modellt* készítettünk, ezen vizsgálatok elvégzése céljából.

A humán érgyűrű-modelleken és állatkísérletekben elvégzett vizsgálataink *célja* az volt, hogy magyarázatot találjunk a következő kérdésekre: *a*, A humán vizsgálatok során az FDF miért nem mutatott olyan egyértelmű kedvező előnyöket az 5%-os dextrózzal szemben, melyek az eddig ismert irodalmi adatokra alapozva várhatóak lettek volna? *b*, Van-e az FDF-nek egy eddig még nem ismert hatásmechanizmusa, amelyet a humán vizsgálatokban nem vettünk figyelembe? *c*, Szükséges-e az FDF eddigi klinikai alkalmazásának megváltoztatása?

II. Beteganyag, kísérletes modellek és módszerek

I. Betegcsoportok

A vizsgálatokat öt betegcsoportban végeztük, ezen belül az V. csoport további két alcsoportra oszlott. A randomizált betegek összlétszáma 120 fő volt.

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

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

III csoport: 2,5 mM FDF-t (10 beteg), vagy 5% dextróz-t tartalmazó (10 beteg), antegrade adott, 4 °C-os St. Thomas krisztalloid cardioplegia alkalmazása.

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

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

V/B csoport: 250 mg/ttkg FDF (9 beteg), vagy 5% dextróz (9 beteg) intravénás adása 30 perc alatt, közvetlenül az ECK előtt, majd további két alkalommal (2 és 6 órával az ECK befejezése után) 125 mg/ttkg FDF, vagy 5% dextróz infundálása 30 perc alatt.

1/1. A funkcionális és laboratóriumi paraméterek monitorozása

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

Az anesztézia előtt, az arteria radialisból vért vettünk *laboranalízisre* (ionok, CK, CK-MB, vese-májfunkció, kvantitatív és kvalitatív vérkép, vérgáz, vércukor) és ezen értékeket használtuk alapértékként. A laborparaméterek ellenőrzésére 12, 24, 48, majd 72 óra múlva került ismét sor.

A CK, CK-MB vizsgálatra küldött vérek levételének időpontjai: alapérték (az indukciót megelőzően), az aorta-leszorítás (AXC) felengedésekor azonnal, majd ezt követően 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72 óra múlva.

Az indukciót követően a jobb oldali vena jugularis internán keresztül, 4 lumenű Swan-Ganz-katétert vezetünk be, a *hemodinamikai mérések* elvégzése céljából. A cardiac output (CO) meghatározására termodilúciós módszert használtunk, három egymást követő mérés átlagát vettük figyelembe. A haemodinamikai mérések időpontjai: közvetlen az indukciót követően a Swan-Ganz katéter bevezetése után (alapérték), az aorta kanülálása előtt közvetlenül, végül az ECK-t követő 1, 2, 4, 6, 12, 18 órában.

További adatként vettük figyelembe az ECK-t követő *inotrop szerek* alkalmazásának szükségességét és mennyiségét.

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

2. A szív nukleotid metabolizmusának vizsgálata

26 beteg CABG műtete során a szív-tüdő extracorporalis pumpa artériás szárából és a sinus coronariusból vettünk 1 ml vért különböző időintervallumokban. A betegeket 2 csoportba soroltuk az FDF alkalmazási módja szerint.

1. 8 beteg az ECK elindítása előtt, egy órán belül, 250 mg/ttkg FDF-t kapott intravénásan 30 perc alatt, még a kontrolles csoportba tartozó 8 beteg 5% dextróz kezelésben részesült.

2. 5 betegnél a műtét során 2,5 mM FDF-t tartalmazó, anterograd adott, 4 °C-os St. Thomas krisztalloid cardioplegiát alkalmaztunk, míg az 5 kontrollbeteg 2,5 mM 5% dextrózt tartalmazó cardioplegiás kezelésben részesült.

A mintavételek időpontjai: 1. Közvetlenül a sinus coronarius katéter behelyezése után, még az aorta lefogás (AXC) felengedése előtt (alapérték). 2. Az ACX felengedését követően azonnal (0 perc), majd ezt követően 1, 5, 10, 30 perc múlva. A vérmintákhoz - a nagy molekulású fehérjék elválasztására - 1 ml 1,3 M perklorosavat adtunk. Ezt követően a csöveket előre lehűtött (0 °C) centrifugával 11000 g fordulaton 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót átpipettáztuk és 0,3 ml 2 M-os kálium-hidroxiddal neutralizáltuk. Ezt a lépést újabb centrifugálás követte. Az így kapott második felülúszót a Smolenski által leírt, módosított „nagy teljesítményű folyadék-kromatográfia” technikával (HPLC) analizáltuk.

3. Izolált vena saphena érgyűrűk reakcióinak vizsgálata in vitro modell-kísérletekben

CABG műtétek során kipreparált, 5-8 cm hosszúságú vena saphena darabokból készített, kb. 4 mm szélességű érgyűrűket vizsgáltunk. Az érgyűrűket oxigenizált, Krebs-oldatot tartalmazó 24 rekeszekből álló edényekbe helyeztük és 37 °C-on 15 percig preinkubáltuk. A maximális cGMP-akkumuláció felbecsülése és az érgyűrűk reakcióképességének megállapítása céljából pozitív kontrollként a szöveteket 10^{-6} M-os végső koncentrációjú nitroprusszid-nátriummal (SNP) kezeltük 15 percig.

Negatív kontrollként 10^{-4} M-os koncentrációjú L-nitro-arginin-metil-észterrel (L-NAME) való 30 perces előkezelés szolgált.

A kísérleteket duplikálva végeztük és minden kísérletet legalább hat alkalommal ismételtünk meg, a reprodukálhatóság megállapítása végett. A vizsgálatok utolsó fázisában 20 percig 1 mM 3-isobutil-1-metilxanthin foszfodiészteráz bénítót használtunk, a termelődött cGMP gyors lebomlásának megakadályozására. Az inkubációs idők lejártakor az érgyűrűkhöz 200 μ l, 0,1 N-os HCl-t adtunk az intracelluláris cGMP mennyiség extrahálása céljából. A így nyert sósavas extraktumokból, nyúl polyclonalis cGMP antitestet használva, radioimmunoassay vizsgálatot végeztünk, az érgyűrűkből felszabaduló cGMP meghatározására. A cGMP mennyiségeket a szövetek nedvességére korrigálva hasonlítottuk össze. Az eredményekből közvetetten információt nyertünk az ereken létrejövő vasodilatatio mértékéről. Ezen protokoll felhasználásával a következő kísérletsorozatokat végeztük el.

1. Különböző koncentrációban és inkubációs ideig alkalmazott FDF hatásának vizsgálata.
2. Az FDF által, érgyűrűkben kiváltott cGMP-válasz és az L-arginin-NO-cGMP rendszer közötti kapcsolat elemzése.
3. A vasoreguláció mechanizmusában kulcsszerepet játszó endothelsejtek és az FDF érgyűrűkre kiváltotta hatás közötti összefüggés vizsgálata.
4. Az FDF molekulát alkotó komponensek hatása az érgyűrűk cGMP-szint változására.
5. A glikolízisben résztvevő két intermedier által kiváltott esetleges vasodilatatív hatás, majd az azonos helyzetű foszfát csoportot, de fruktózt nem tartalmazó, és a különböző helyzetű foszfát csoportot tartalmazó fruktóz hatásának vizsgálata.
6. A proteinszintézis szerepének vizsgálata az FDF-NO-cGMP rendszer működésében.

4. Az FDF coronariákra kifejtett direkt hatásának vizsgálata in vitro patkányszív-modelleken

Kísérleteinkben Langendorff patkányszívmodellét használtunk. Az ischaemia kiváltására a szívpreparátumokat 4 órán keresztül, 4°C-os St. Thomas kristalloid cardioplegiával áramoltattuk át. Az FDF-t kétféle formában alkalmaztuk, amely egyben a csoportbeosztásnak is megfelelt.

1. Az FDF-t az ischaemiát megelőzően, 37 °C hőmérsékleten, 250 mg/ttkg összdózisban, 15 percig, intravénásan adtuk a patkány elaltatása után. Ezt követően a Langendorff átáramoltató folyadékhoz adva (2,5 mM végső FDF koncentráció) alkalmaztuk. Kontrollként, hasonló adagolási sémában 5%-os dextrózoldatot használtunk. A vizsgálatba bevont patkányok száma 20 volt (10 FDF, 10 kontroll).

2. Ischaemiás, hypothermiás (4°C) körülmények között, St. Thomas cardioplegiás oldathoz adott (2,5 mM végső koncentráció) FDF-t alkalmaztunk. Kontrollként, hasonló adagolási sémában 5%-os dextrózoldatot használtunk. A vizsgálatba bevont patkányok száma 16 volt (8 FDF, 8 kontroll).

Kísérleteinkben a provokált ischaemiát követő coronaria-áramlás tendenciáját, és a csúcsáramlás nagyságát regisztráltuk. Az ischaemiát követő coronaria endothelfunkció megítélésére az 5-hidroxi-triptamin (5-HT) - endothelfüggő vasodilatátor - által kiváltott coronaria-áramlásváltozás mértékéből következtettünk. Az ischaemiát követően a coronariaerek simaizomsejt funkciójának megítélésére a gliceril-trinitrát (GTN) - endotheltől független vasodilatátor - coronaria-áramlást befolyásoló hatásából nyertünk információkat. A kísérlet befejező lépéseként, ismerve a nitrogén-monoxid (NO) vasoregulációban betöltött szerepét, a coronariákon átáramló folyadék, kemilumineszcenciás nitrit/nitrát mennyiségének meghatározását végeztük el, így ebből közvetett módon a coronaria-vasodilatatio mértékére kaptunk felvilágosítást.

III. Eredmények

I. Klinikai mérési eredmények

A különböző dózisu, intravénás FDF kezelés az ECK megkezdése előtt (I, II, csoport), illetve az ECK befejezését követően (V/A, V/B csoport) további, ismételt FDF adagolással kiegészített dozirozási protokoll, nem váltott ki szignifikáns előnyös hatásokat a kontroll csoportokhoz képest. A CK-MB szint ugyan alacsonyabb volt az ECK-t követő első 18 órában, és a hemodinamikai adatok is kedvezőbb eredményeket mutattak az első 12 órában az FDF-t kapott betegeknél, azonban a statisztikai elemzések során ez nem felelt meg a statisztikai szignifikancia kritériumának.

A III. csoportnál a cardioplegiában FDF-t vagy placebo-t kapott betegek eredményei között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető.

A IV. csoportban a kombináltan intravénásan és cardioplegiában adott FDF-kezelt csoport eredményeinek kiértékelésekor szignifikáns eltéréseket találtunk a kontroll csoporthoz képest a következő adatokban:

A hemodinamikai mérések szignifikánsan jobb eredményeket mutattak az FDF-fel kezelt betegeknél a következő paraméterekben és időpontokban: a bal kamrai löketmunka-index a 6. ($p = 0,001$), 12. ($p = 0,005$) és a 18. ($p < 0,01$) órában, a szívindex a 6. és 12. posztoperatív órában ($p = 0,024$), a pulmonális vasculáris rezisztencia-index az ECK követően 2. ($p = 0,032$), a 6. ($p = 0,002$), 12. ($p < 0,05$) és a 18. ($p = 0,006$) órában javult szignifikánsan.

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

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

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

2. A szív nukleotid anyagcsere vizsgálatának eredményei

Az intravénásan adott FDF kezelésben részesült betegek mintáiban az alapértékekhez viszonyítva, az AXC felengedését követő 1. és 5. percben volt szignifikáns hipoxantin- és inozin-felzaporodás megfigyelhető ($p < 0,05$). Ezzel szemben, a kontrollcsoportnál ezen szignifikáns emelkedés az ACX-t követően azonnal (0 perc), majd az 1. ($p < 0,01$), 5. és 10. ($p < 0,05$) percekben jelentkezett. A 30. percben vett vérmintákban már nem találtunk egyik csoportban sem szignifikáns metabolit emelkedést az alapértékhez képest. Ezzel teljes mértékben megegyező eredményeket kaptunk a hipoxantin- és inozin-felzaporodás elért csúcserkékek összehasonlító elemzése során is. Az előbb leírt időpontokban a kontrollcsoport tagjainál ezen csúcserkékek szignifikánsan magasabbak voltak ($p < 0,05$), mint az FDF-t kapott betegeknél. Elemezve az uridin-trifoszfát (UTP) lebomlása során keletkezett uridin-mennyiség szintjét, hasonló eredményeket kaptunk. A kontroll-csoportnál szignifikáns uridin-szintemelkedést találtunk az AXC-t követő 1. 5. percekben ($p < 0,05$). Ezzel szemben az FDF-csoportban egyetlen mintavételi időpontban sem volt szignifikáns változás megállapítható.

A cardioplegiában adott FDF kezelésben részesült betegek mintáiban nem találtunk szignifikáns különbséget sem a purin, sem a pirimidin degradációs termékek koncentrációiban a kontroll 5%-os dextrózt kapott csoporthoz képest.

Az HPLC adatok további elemzése lehetőséget ad a protekcióban részesülő sejttípusok azonosítására is. Humán szívizomsejtekben hypoxia hatására fokozódó purin-katabolizmus végterméke az inozin, ezzel szemben a szív endothelsejtjeiben ez a katabolizmus a purin-nukleozid-foszforiláz enzim jelenléte miatt tovább folytatódik és a

teljes lebontás eredménye a hipoxantin lesz. Ezért a hipoxantin szintjének vizsgálata pontos felvilágosítást ad, az endothel hypoxiás károsodásának mértékéről. Elemezve a vérmintákban megjelenő lebomlási termékek – endothel-specifikus – hipoxantin és -szívizomsejt-specifikus – inozin %-os arányát (98% - 2%) megállapítottuk, hogy az endothelsejtek nagyrésze nem károsodott, funkcionálisan tökéletesen működött, ami az FDF endothelsejteken kiváltott cytoprotektív hatását bizonyította.

Kísérleteink jelentőségét abban látjuk, hogy a klinikai vizsgálatok során fényderült a kombináltan alkalmazott FDF új, a késői posztoperatív szakban megjelenő kedvező hemodinamikai hatásaira. Ez azonban nem magyarázható egyedül, az FDF energiatermelésben szerepet játszó hatásmechanizmusával. Továbbá kiderült, hogy az FDF hideg cardioplegiában alkalmazva hatástalan. Ezeket az eredményeket támasztotta alá a kétféle adagolási módban FDF-t kapott betegek szív nukleotid metabolizmusának vizsgálata is.

3. Izolált vena saphena érgyűrűkén mért, FDF kiváltotta cGMP-szintváltozás eredményei

Az FDF szignifikáns cGMP-szintemelkedést okozott humán in vitro vena saphena érgyűrű preparátumokban. Az FDF kiváltotta maximális cGMP-emelkedés az inkubációt követő 6. órában érte el a csúcspontját. Leghatásosabb a 2,5 mM-os koncentráció volt. A kísérletek bizonyították, hogy az FDF hatása intakt, funkcionáló endothelréteghez kötött. Az, hogy az FDF cGMP-szintemelő képességét az L-arginin fokozta, illetve az L-NAME blokkolta, bizonyította az L-arginin-NO-cGMP rendszer részvételét az FDF érgyűrűkre kifejtett vasodilatatív hatásában. Ez a felismerés magyarázatként szolgálhat a klinikai vizsgálatok során talált „késleltetett” hemodinamikai hatásokra, amire a gyorsan változó metabolikus hatásmechanizmus elképzelés önmagában nem adhat feleletet.

További vizsgálatainkkal tisztáztuk, hogy a glikolízisben a PFK-enzim előtt szerepet játszó intermedierek, és a glükózt tartalmazó glükóz-1,6-difoszfát nem okoztak cGMP-szintváltozást az érgyűrűkben.

Az FDF molekula felépítésében résztvevő komponensek önmagukban alkalmazva szintén nem eredményeztek cGMP-szintváltozást, ami bizonyította, hogy a hatás kiváltásához a fruktóz és foszfát csoportok jelenléte szükséges. A foszfát csoport elhelyezkedése a molekulán belül, nem befolyásolja az FDF érrendszeren kiváltott vasodilatatív hatását. A glikolízisben résztvevő intermedierekkel és a proteinszintézist gátló anyagokkal végzett vizsgálataink eredményeiből azt a következtetést vontuk le, hogy a transzkripciós, translációs folyamatoknak fontos szerepe van az FDF-kiváltotta NO-cGMP-rendszeren keresztül érvényesülő vasodilatatív hatás megjelenésében. Azonban a glikolitikus folyamatok normál hatásfokú működése önmagában nem elegendő ezen hatás kiváltásához.

Kísérleteink jelentőségét abban látjuk, hogy először ismertük fel az FDF-nek egy új, a vasculatúrán megjelenő, endothelfüggő, az NO-cGMP-rendszeren keresztül ható, a proteinszintézis szintjén gátolható vasodilatatót kiváltó tulajdonságát.

4. Az FDF coronariákra kifejtett direkt hatásának eredményei, in vitro patkányszív-modelleken

A kombinált (intravénás + cardioplegia) kezelésben részesült első csoport mérési eredményeinek ismeretében a következő megállapítások vonhatók le:

1. Az ischaemiát követő alapáramlás mértéke a preischaemiás alapáramláshoz viszonyítva kisebb mértékben csökkent az FDF-fel kezeltéknél, mint a kontrollcsoportnál.
2. A közvetlen postischaemiás fázisban vasodilatátorokra adott inverz vasokonstrictio nagyobb arányban jelent meg az FDF-t nem kapott csoportban.
3. A postischaemiában fellépő kompenzáló hyperaemia nagyobb volt az FDF-fel kezelt csoportban.
4. A vasodilatátorokra adott válaszkészség visszatérésének ideje és nagysága kedvezőbb volt az FDF-kezelésben részesült csoportban.

Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a coronaria erek az ischaemiás-reperfüziós inzultus során kevésbé károsodtak és így funkcionálisan jobban működtek, ami véleményünk szerint az FDF cardioprotektív és különösen coronaria-endothelsejt-védő hatásával magyarázható.

A cardioplegiában adott kezelési sémát alkalmazó Langendorff-modellekben, nem voltak regisztrálható kedvező eredmények az FDF-t kapott csoportban a kontroll-csoporttal összehasonlítva.

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

Kísérleteink jelentőségét abban látjuk, hogy az in vitro Langendorff preparátumokon végzett méréseink alátámasztották a klinikumban és a nukleotid metabolitok vizsgálatai során szerzett tapasztalatainkat. A hideg cardioplegiás oldatban alkalmazott FDF nem mutatott a cardiomyoprotekciónak tulajdonítható kedvező tulajdonságokat az 5%-os dextrózzal szemben. Ezzel ellentétben a kombináltan alkalmazott FDF adagolási formánál megfigyelhető volt minimális kedvező hatás a funkcionális mérési paraméterek tekintetében.

IV. A fontosabb új eredmények összefoglalása és klinikai jelentősége

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

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

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

IV. Az *in vitro* *patkányszív-kísérletes* modelljeinkből kapott eredmények - összehangban a nukleotid metabolikus vizsgálatok eredményeivel - igazolták az intravénásan adott FDF közvetlen coronaria-keringésre kifejtett kedvező hatását, melyet a coronariák endothelsejtjeinek védelmén keresztül váltott ki. Ugyanez a kedvező hatás nem volt megfigyelhető az FDF-t tartalmazó hideg cardioplegiás oldat alkalmazása során.

Összegezve elmondhatjuk, hogy megismerve az FDF hatásának egy újabb tulajdonságát, és felhasználva az in vitro vizsgálatokban szerzett ismereteket, vissza kell térni ismételt klinikai vizsgálatok megtervezéséhez. Így pontosabb választ kaphatunk az FDF klinikai alkalmazási módja tekintetében. A humán vizsgálatokkal megegyezően az in vitro patkányszív-kísérletes és a nukleotid metabolizmus vizsgálati eredményei bizonyították, hogy a cardioplegiában alkalmazott FDF hatástalan. Ennek ismeretében inkább a preoperatív, majd az aorta lezoritás felengedését követő reperfüziós szakban alkalmazott intravénás adagolási módot tartjuk hasznosabbnak.

Véleményünk szerint, az FDF-nek a coronaria arteria bypass graft műtétek során történő alkalmazásával és további vizsgálatával kapcsolatos klinikai vizsgálat-sorozatokban, a következő változtatásokat kellene elvégezni.

1. Az FDF intravénás adását 4-6 órával az extracorporalis keringés elindítása előtt kell elkezdeni.
2. Az FDF intravénás adását folytatni kell az aorta lezoritás felengedését követően, az ATP képzésre kifejtett pozitív hatás folyamatos fenntartása érdekében.
3. Az FDF hideg cardioplegiában nem hatásos, alkalmazása nem ajánlatos.
4. Az FDF-NO-rendszer között talált kapcsolatban kulcsszerepet játszó FDF-L-arginin szinergizmus hasznos lehet a klinikai gyakorlatban.

Továbbá javasoljuk, az FDF hatékonyságának összehasonlítását, a szintén cardioprotekcióra használt glükóz-inzulin-kálium-oldattal.

Eddigi megfigyeléseink, klinikai vizsgálataink és kísérletes eredményeink további fontos információkkal járultak hozzá az FDF ischaemiás-reperfüziós körülmények között kifejtett cardioprotektív hatásának alaposabb megismeréséhez. Eredményeink figyelembe vételével a kliniai alkalmazás során elérhető az FDF által kiváltott maximális cytoprotektív hatás, amely hozzájárulhat az évtizedek óta tartó erőfeszítések sikeréhez a cardioprotekció területén.

V. A Ph.D. témával kapcsolatos saját közlemények, absztraktok

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

Elbírálás alatt:

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

VI. A Ph.D. témával kapcsolatos előadások és poszterek

1. 1994 május, *Balatonfüred*: Mühl D, Gál J, Sárosi I, Tekeres M.: Az öregkori myocardialis infarctus előfordulási gyakorisága és jellegzetessége Intézetünkben. (A Magyar Kardiológiai Társaság Tudományos ülése, **előadás**.)
2. 1995 október, *Athén*: Gál J, Schmidt I, Marczin N, Tekeres M.: Potentiation of lipopolysaccharide (LPS) - induced nitric oxide (NO) synthesis by serum in cultured vascular smooth muscle cells (rat). (8th Congress of the European Society of Intensive Care Medicine, **poszter**.)

3. 1996 május, *Siófok*: Gál J, Schmidt I, Marczin N, Tekeres M.: A Szeptikus shock biokémiai monitorizálásának egyik lehetséges módszere, cGMP radioimmunoassay használatával. (A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Nemzeti Kongresszusa, **előadás**.)
4. 1998 október, *Pécs*: Marczin N, Gál J, Riedel B, Yacoub M.: Influence of transient or prolonged lung ischemia and reperfusion on gas phase nitric oxide (NO), in man. (II. International symposium on myocardial cytoprotection, **előadás**, a szervező bizottság tagja.)
5. 1998 október, *Orlando, USA*: Gál J, Riedel B, Smolenski T, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) prevents myocardial adenine nucleotide degradation in cardiac surgery. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, **poszter**.)
6. 1998 október, *Orlando, USA*: Riedel B, Gál J, Hoare G, Marczin N, Royston D.: Fructose-1,6-diphosphate (FDP) enhances human vascular cGMP production. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, **előadás**.)
7. 1998 október, *Orlando, USA*: Marczin N, Gál J, Yacoub M.: Influence of breath-holding and one-lung ventilation on gas phase nitric oxide (NO) levels in patients undergoing cardio-thoracic surgery. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, **poszter**.)
8. 1998 november, *Hévíz*: Gál J, Marczin N, Riedel B, Tekeres M, Royston D.: A szepszis-mediált vasodilatatio mechanizmusának kísérletes vizsgálata. (A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Dél-Dunántúli Szekciójának tudományos ülése, **előadás**.)

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

10. 2000 május, *Siófok*: Gál J, Riedel B, Róth E, Tekeres M, Royston D.: A fruktóz-1,6-difoszfát vasculatúrára kifejtett hatásának in vitro kísérletes vizsgálata. (A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Nemzeti Kongresszusa, elfogadott **előadás**.)

11. 2000 szeptember, *Pécs*: Gál J, Riedel B, Róth E, Royston D.: Coronary endothelial cytoprotection by fructose-1,6-diphosphate. (III. International symposium on myocardial cytoprotection, elfogadott **előadás**, a szervező bizottság tagja.)

12. 2000 szeptember, *Pécs*: Riedel B, Gál J, Royston D.: Is myocardial protection still necessary in off pump surgery? (III. International symposium on myocardial cytoprotection, elfogadott **előadás**.)

Elbírálás alatt

1. 2000 október, *San Francisco*, USA: Gál J, Riedel B, Marczin N, Royston D.: Heparine induced endothelial dysfunction as quantified by cGMP radioimmunoassay. (Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists.)

2. 2000 december, *Singapore*: Gál J, Riedel B, Royston D.: FDP decreases cGMP level in vena saphena rings, incubating with human septic serum. (11th Congress of the Western Pacific Association of Critical Care Medicine.)