

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203208
(11) (B1)

[22] Přihlášeno 20 04 77
[21] (PV 2618-77)

[51] Int. Cl.³
A 61 K 31/305
A 61 K 31/335 //
C 07 D 493/10

[40] Zveřejněno 31 03 80

[45] Vydáno 15 09 83

(73)
Autor vynálezu

RATUSKÝ JOSEF dr., MÁLEK PROKOP prof., KOLC JIŘÍ dr.
a VRÁNA MILAN MUDr., PRAHA

(54) Prostředek k léčení a ochraně ischemicky poškozených tkání a normalizaci jejich funkcí

1

Předmětem vynálezu je prostředek k léčení, ochraně ischemicky poškozených tkání a k normalizaci jejich funkcí, sestávající z roztoku směsi polohových isomerů 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinů.

Nedostatečné prokrvení tkání — ischemie — poškozuje jejich výměnu látek a vede ve své konečné fázi k rozpadu a zániku tkáně. V lidské patologii zaujímá dnes chronické nebo akutní poškození orgánů ischemií nozologickou jednotku zvanou ischemická choroba.

Přestože v popředí patogenese této choroby stojí onemocnění cévní, jsou její důsledky organotropní povahy. Choroba proto postihuje jednotlivé orgány především srdce, mozek, pankreas, kosterní sval apod.

Jindy je ischemií ohrožen a poškozován orgán určený k transplantaci — transplantát, například ledvina, nebo játra pankreas. Ve zcela specifickém případě může místní prostorově ohraničená ischemie orgánu, například srdečního svalu vést k celkové poruše srdeční funkce a tím až ke smrti jedince (srdeční infarkt). Jde tedy o pestrou paletu klinicky vzájemně odlišných stavů, spojených ale společným pathogenetickým mechanismem, kterým je poškození tkáně, vyvolané nedostatečným přísunem kyslíku a živin krví.

2

Je proto pochopitelné, že látka, která by mohla ve všech těchto klinicky odlišných, ale pathogenetickým mechanismem vzájemně spojených situacích ovlivnit metabolickou poruchu vyvolanou ischemií, by byla cenným léčebným přínosem. Tím spíše, kdyby navíc bránila vzniku dalších ischemií vyvolaných reakcí, jakými jsou například funkční insuficience transplantátu a poruchy srdečního rytmu — arytmie — u srdečního infarktu.

Dnes známá léčiva, používaná při infarktu myokardu, můžeme rozdělit do dvou skupin: antiarytmika zaměřená na potlačení poruchy srdečního rytmu a na kardiostimulaci, zaměřená na zvýšení výkonu srdeční funkce a tím i na zvýšení minutového srdečního objemu.

Vlastní antiarytmika dělíme podle mechanismu účinku do dvou skupin. Do první skupiny patří Chinidin, Prokainamid, Propranolol a Bretylium. Do druhé skupiny patří Lidocain (Mesocain) a Diphenylhydantoin. Obě skupiny se od sebe liší především způsobem účinku na rychlost vedení podráždění v ischemicky poškozeném myokardu. V klinické praxi se podávají uvedená antiarytmika buď jednotlivě, nebo nejčastěji v různých empiricky odzkoušených kombinacích.

Důvodem je snaha potencovat kladný antiaritmický účinek a současně obejít vedlejší nepříznivý účinek antiarytmika, kterým je další snižování kontrakční schopnosti myokardu. Mimo depresi kontrakční schopnosti myokardu mohou mít antiarytmika ještě další vedlejší nepříznivé účinky, jako vznik bradyarytmie a srdeční blokády. Přímým účinkem antiarytmik na hladkou svalovinu cév může dojít k hypotenzii. Blokádou sympatiku a β -receptoru mohou některá antiarytmika vyřadit účinek léčebně dodávaných katecholaminů.

Jako kardiostimulantia se používají různé druhy katecholaminů nebo glukagon. V obou případech je pozorována, spolu se zvýšením srdeční práce, také zvýšená pohotovost srdce k arytmií. Stojíme proto z hlediska racionální terapie před velmi obtížnou situací. Látky tlumící srdeční arytmií snižují srdeční výkon a naopak látky srdeční výkon povzbuzující zvyšují četnost srdečních extrasystol a arytmií. Navíc je nutno jak u antiarytmik, tak u kardiostimulantů udržovat vhodné terapeuticky účinné hladiny látek v krvi zpravidla pomocí dlouhodobých infúzí. Proto je farmakoterapie arytmií jedním z nejobtížnějších úkolů při akutní místní ischemii myokardu — při akutním srdečním infarktu.

Nyní bylo zjištěno, že rtuťnaté deriváty fluoresceinové řady ovlivňují příznivě některé metabolické následky ischemie a tím i druhotné její patologické reakce. Tím byl dán základ novému prostředku léčeni a ochrany ischemií poškozených tkání, popř. normalizace jejich funkcí. Předmětem vynálezu je tedy prostředek k léčeni, ochraně ischemicky poškozených tkání a k normalizaci jejich funkcí, sestávající z roztoku směsi 2'-hydroxymercurifluorescein, 4'-hydroxymercurifluorescein, bis-(hydroxymercuri)-

fluorescein a difluoresceinyl rtuti, přičemž množství uvedených složek ve směsi je v poměru 5 až 95 : 5 až 95 : 2 až 20 : 2 až 20 hmotnostních dílů. Prostředku je možno využít hlavně jako antiarytmika při léčeni infarktu myokardu, dále pro léčeni a ochranu ischemicky poškozených tkání jater, ledvin, pankreatu a kosterního svalu, popřípadě pro jejich ochranu a normalizaci při transplantaci těchto orgánů.

Chemická část

Podstatou normalizačních účinků na ischemicky poškozenou tkáň je u léčiva — přípravku podle vynálezu jeho pevná a dlouhodobá fixace do této poškozené tkáně. Tato fixace byla u preparátů kvalitativně sledována fluorescenční metodou a kvantitativně potom u vybraných derivátů pomocí scanningu do tkáně zafixovaných preparátů, označených radioaktivními isotopy rtuti. Míra radioaktivity nakumulované látky byla vyjádřena v tzv. indexech R_I a R_{II} , přičemž index R_I je poměr množství nakumulované radioaktivní látky v 1 g poškozené tkáně k množství nakumulované látky v 1 g zdravé tkáně a index R_{II} je obdobný poměr množství látky, nakumulované v 1 g poškozené tkáně k množství látky obsaženému v 1 ml krve. Množství zafixované radioaktivní látky bylo stanovováno v impulsích za minutu. Cílená kombinace obou metod nám umožnila vyhledat mezi řadou derivátů takové, které vykazovaly nejlepší výsledky jak co do kumulace v poškozených tkáních, tak i po stránce ostatních vlastností (toxická, snadnost přípravy, čištění preparátu apod.).

Z látek, u nichž byl proveden výše zmíněný průzkum, jsme pro další zkoušky vybrali následující deriváty, které vykazují tyto indexy R_I a R_{II} :

Tabulka 1

Číslo	Název	Indexy	
		R_I	R_{II}
I	2'-hydroxymercurifluorescein	65	11
II	4'-hydroxymercurifluorescein	70	15
III	bis-(hydroxymercuri)-fluorescein	30	8
IV	difluoresceinylrtuť	31	9
V	směs I a II (v poměru 1:4)	59	12
VI	směs I a II (v poměru 4:1)	63	13
VII	směs I a II (v poměru 1:1)	58	12
VIII	směs I, II, III a IV (v poměru 4:4:1:1)	64	12
IX	přípravek podle vynálezu (směs I, II, III, IV v poměru 4,2:3,8:0,2:1,8)	67	15
X	Nechromatografovaná reakční směs	8	4

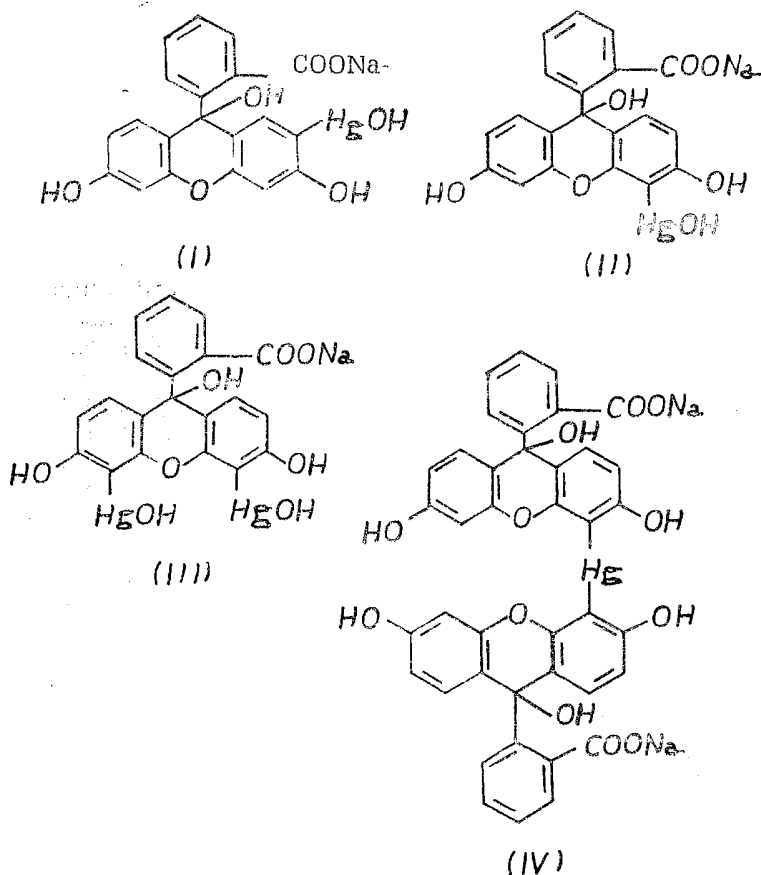
Ze srovnání velikosti indexů R_I a R_{II} nechromatografované reakční směsi s indexy čištěných derivátů je patrna důležitost chromatografického čištění; jsou při něm

vedle balastních látek odstraňovány také toxické příměsiny, tj. anorganické rtuťnaté deriváty a kovová rtuť. Vodné roztoky prostředku podle vynálezu je výhodné sta-

bilizovat přidáním kyselého uhličitanu sodného v množství 1/2 až 1 % hmotnostních na objem vody.

Po této fázi průzkumu byla dále zjišťována korelace mezi fixací preparátů do poškozené tkáně a jejich normalizačními účinky na tuto tkáň. Tak například bylo zjištěno, že při infarktu myokardu má nakumulování uvedených derivátů v ischemicky poškozené tkáni infarktového ložiska za následek léčivý antiarytmický účinek na poškozený myokard. Přitom není samozřejmě rozhodující, zda použitý preparát je v radioaktivní nebo neradioaktivní formě, takže s výhodou je ho možno použít jako látku neradioaktivní.

Jako další příklad použití přípravku podle vynálezu je možno uvést to, že tento přípravek normalizuje biochemické funkce poškozených tkání, například snižuje v nich hladinu laktátů, upravuje změněnou iontovou rovnováhu, udržuje pro funkci tkáně důležité makroorganické fosfáty, přispívá k zachování glykogenových rezerv a upravuje aktivitu klíčových enzymů. Podobný ochranný účinek má tento přípravek i při transplantacích srdce. Při transplantaci ledvin chrání tento přípravek ledvinu před následky ischemického poškození a umožňuje podstatně její další přežívání (viz biologická část).



Biologická část

Účinek přípravku podle vynálezu na tkáň poškozenou ischemií je možno doložit jak experimentálně, tak klinicky. V prvním případě ukážeme na vliv tohoto přípravku při místní ischemizaci srdeční tkáně. V druhém případě na vliv tohoto přípravku na celkovou ischemii orgánu určeného k transplantaci.

1. Účinky přípravku podle vynálezu na místní ischemii myokardu

Místní ischemizaci srdeční tkáně vyvoláváme v experimentu na zvířeti podvazem postupně větve levé koronární arterie. Během několika minut dojde k poruše tvorby a pře-

nosu podráždění v levé srdeční komoře. Vznikne porucha srdečního rytmu — arytmie. Místní ischemické ložisko způsobí dále poruchu kontrakce srdeční komory a tím oslabí funkci srdce jako pumpy.

Účinek přípravku pozorovaný v experimentech na zvířeti vychází z jeho přímého účinku na ischemií poškozenou tkáň. Ischemické ložisko srdeční tkáně vzniklé v levé srdeční komoře po podvazu větve levé koronární tepny, prodělává během prvních dvou hodin po vzniku ischemie charakteristické metabolické změny: v ložisku se mění poměr laktát/pyruvát, klesá obsah adenosintrifosfátu a monofosfátu. Draselné ionty unikají z tkáně a na jejich místo vstupují ionty sodné. Dochází k poklesu aktivit důležitých enzymů ve tkáni.

Celkový obsah vody v ložisku stoupá. Tyto změny nejsou specifické jen pro tkáň srdeční, ale vidíme je i v ostatních ischemisovaných tkáních.

Přímým důsledkem metabolických změn v ischemické tkáni srdeční je vznik arytmii a pokles kontrakční schopnosti myokardu. Arytmie jsou vyvolány poruchou funkce srdečních membrán, která je spojena s patologickou koncentrací iontů v buňce. Pokles kontrakční schopnosti je podmíněn otokem tkáně a poklesem energetických rezerv svalových buněk.

Přípravek podle vynálezu se váže na ischemií poškozenou tkáň a zabraňuje, popřípadě zpomaluje charakteristické změny metabolismu provázející ischemii. To znamená, že zmenší pokles ATP a únik draselných iontů z buňky. Zmenší se také otok tkáně. Tento přípravek dále brání poklesu aktivních klíčových enzymů ve tkáni. V souladu s těmito metabolickými ději jdou také druhotné děje elektrofyziologické a hemodynamické. Přípravek proto snižuje fibrilační pohotovost v ischemií poškozeném ložisku levé srdeční komory a normalizuje patologicky zkrácenou efektivní refrakterní periodu. Po použití přípravku nepozorujeme pokles kontraktivity srdeční komory.

Účinek tohoto přípravku byl pozorován také na ischemií poškozeném kosterním svalu. V experimentu na krysách bylo prokázáno, že přípravek urychloval hojení svalů a zmenšoval následky jeho poškození.

Účinek přípravku pozorovaný na klinice vychází ze sledování výskytu arytmii v časném pooperačním průběhu po rekonstrukčním výkonu na koronárních tepnách při ischemické chorobě srdeční (ICHS). Časný pooperační průběh během prvních 24 hod. je zpravidla provázen různými typy supraventrikulárních a ventrikulárních arytmii. Nezdrádka pozorujeme salvy komorových extrasystol až komorovou tachykardií. Je to patrně následek revaskularizace ischemií poškozených tkání, ale i krátkodobé ischemizace určitých oblastí srdce během kardiochirurgického výkonu.

Naše výsledky s podáním přípravku podle vynálezu ukázaly, že tento preparát snižuje četnost a dobu trvání pooperačních arytmii. Přitom není pooperační průběh rušen poklesem krevního tlaku. Přípravek podle vynálezu nebrání účinku kardiostimulantů při léčbě syndromu nízkého minutového srdečního objemu.

Antiarytmické účinky rtuťnatých derivátů fluoresceinové řady, které jsou základem přípravku podle vynálezu, jsou podmíněny jejich bezprostředním zásahem do metabolismu ischemií poškozené tkáně, na kterou se dlouhodobě fixují. Tím je dána jejich aplikační forma.

Přípravek se podává jednorázově a ve srovnání s běžnými antiarytmiky v řádově nižší dávce. Vlastní fixace přípravku trvá ve tkáni zhruba tři týdny, tj. preparát se fixu-

je na poškozenou tkáň irreversibilně a mizí z ní při jejím zhojení. Je samozřejmé, že sledovat antiarytmický účinek přípravku po tak dlouhou dobu je prakticky nemožné. V našem případě jsme antiarytmický účinek preparátu prokázali v pokusu na zvířeti ještě za 24 hod., při sledování na klinice za 18 hod. po jednorázové dávce. Dlouhodobější sledování antiarytmického účinku nebylo zatím z technických důvodů provedeno.

Předností přípravku ve srovnání s obvyklými antiarytmiky je jeho jednorázová dávka podání a dále to, že nezpůsobuje žádné vedlejší účinky, především srdeční blokády, hypotenze, nebo snížení srdeční kontrakce. Odpadá proto udržování účinné hladiny antiarytmika v krvi pomalou infúzí, které je mnohdy spojeno se stanovením jeho koncentrace v krvi. Další výhodou je, že léčba přípravkem nepůsobí snížení srdeční kontraktility, a proto nemusí být per se doplňována podáním kardiostimulancií.

V případě, že by přesto bylo nutné z určitých důvodů kardiostimulantia podat, je rovněž výhodou antiarytmické léčby přípravku podle vynálezu, že jeho užití nebrání účinku uvedených kardiostimulantů. Konečně je možno v případě nutnosti kombinovat podání přípravku s některým jiným rychle působícím antiarytmikem, ovšem s přihlédnutím k případným nepříznivými vedlejším účinkům tohoto antiarytmika.

Vzhledem k naprosté neškodnosti nepatrných aplikačních dávek přípravku podle vynálezu a dále vzhledem k jeho dlouhodobému antiarytmickému účinku bez vedlejších nepříznivých vlastností jeví se plně oprávněné jeho preventivní podávání při každém podezření ze vzniku infarktu myokardu.

2. Účinky přípravku podle vynálezu na celkové poškození orgánů ischemií

Dalším příkladem je účinek přípravku na celkové poškození orgánu ischemií, se kterým se setkáváme při jeho transplantaci. V experimentu byl zjištěn účinek přípravku podle vynálezu v podstatě ve dvojí formě: zpomaluje až odstraňuje metabolické změny vyvolané přerušáním dodávky krve orgánu — transplantátu po jeho odpojení od krevního oběhu dárce, a mimoto ovlivňuje i jeho antigenní vliv na budoucího příjemce. Při transplantaci srdce chrání tento přípravek glykogenové rezervy myokardu a zabraňuje poškození buněčných struktur. Po obnovení činnosti srdce nastupuje sinusový rytmus podstatně rychleji a arytmie v dalším období jsou méně časté.

Při transplantacích ledvin bylo experimentálně zjištěno, že přípravek umožňuje jejich delší přežití bez použití imunosupresivních látek. Prokázali jsme, že kožní štěpy transplantované myším, kterým byl před transplantací podán extrakt myších ischemických jater, se odlučují dříve, než transplantáty neovlivněných myší. Naproti tomu jsme expe-

rimentálně prokázali, že přípravek odstraňuje tento nepříznivý účinek ischemických jater na štěp, který potom přežívá stejně dlouho, jako transplantáty neovlivněné.

Experimentální část

A. Příklady chemické — příprava derivátů

K vyzkoušení normalizačních účinků jednotlivých derivátů byly tyto deriváty, respektive jejich izomery, jednotlivě připraveny v chromatograficky čisté formě pomocí sloupcové chromatografie na neutrálním kysličníku hlinitém ve vodném prostředí, respektive v prostředí zředěných roztoků kyselého nebo normálního uhličitanu sodného. Jednotlivé deriváty izolované v čisté formě byly potom nejdříve vyzkoušeny, a to jako radioaktivní, na fixační schopnost do poškozené tkáně (viz tabulku 1) a potom na základě získaných výsledků byly zkoušeny v neradioaktivní formě na normalizační aktivitu. Z výsledků jsme usoudili, že bude vhodné připravit směs výše uvedených derivátů pro experimentální zkoušky derivátů na normalizační aktivitu u infarktu myokardu. To sledovalo celkem dva cíle: jednak podstatně jednodušší přípravu normalizačního preparátu (zjednodušení chromatografického čištění) a tím i zvýšení výtěžků, jednak zachování, popřípadě zvýšení normalizační aktivity preparátu. Po provedení zkoušek s řadou směsí a zhodnocení fixační schopnosti a normalizačních účinků v korelaci se snadností přípravu preparátu, jsme došli k závěru, nejvhodnější preparát, že má složení derivátu IX (tabulka 1). S tímto preparátem byly potom po experimentálních zkouškách na zvířatech provedeny klinické zkoušky na pacientech, a to v postoperačním stadiu po kardiologickém výkonu po ICHS. Provedené zkoušky měly kladné výsledky. Dále byly provedeny s přípravkem podle vynálezu klinické zkoušky na pacientech s infarktem myokardu v časném stadiu.

Příklad 1

Reakční směs sestávající z 19,65 g (0,05 M) sodné soli fluoresceinu rozpuštěno v 100 ml vody, 16,0 g octanu rtuťnatého (0,05 M) rozpuštěného v 100 ml vody a okyselená 9,0 g (0,15 M) kyseliny octové byla zahřívána po dobu 4 hod. pod zpětným chladičem. Reakční směs tvořila za těchto podmínek jemnou suspensi ve vodě při pH cca 4,5. Po skončení zahřívání byla suspence zfiltrována. Odfiltrovaná pevná část byla rozpuštěna ve vodném roztoku NaOH (100 ml vody a 6,0 g NaOH) (0,15 M) a podrobena chromatografii na sloupci kysličníku hlinitého (neutrálního) (2000 g). V prvních frakcích (4 po 2000 ml) bylo eluováno 1,5 g nezreagovaného fluoresceinu (podíl A), v dalších 4 frakcích po 2000 ml byla eluová-

no 9,5 g směsi pevných produktů (podíl B), která podle analýzy na papírové chromatografii obsahovala difluoresceinylrtuť a oba polohové isomery 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceiny. V dalších 3 frakcích po 2000 ml 1% roztoku NaHCO₃ bylo eluováno 8,2 g směsi polohových isomerů 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinu (podíl C), které byly z alkalického roztoku izolovány okyselením kyselinou octovou a odfiltrováním. V dalších 3 frakcích po 2000 ml 1% roztoku Na₂CO₃ bylo eluováno 5,3 g směsi 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinu a bis-(hydroxymercuri)fluoresceinu (podíl D), která byla solvoována z alkalického roztoku obdobně jako předešlé okyselením a odfiltrováním. Na sloupci kysličníku hlinitého zůstala část reakčních produktů, které byly výšemolekulární povahy.

Potom byly podíly B a C (9,5 a 8,2 g) po rozpuštění a zalkalizování ekvivalentním množstvím NaOH znovu chromatografovány na 1500 g neutrálního kysličníku hlinitého stejným způsobem jako v předešlém případě. V prvních dvou podílech (1500 ml) vody bylo izolováno malé množství (0,2 g) fluoresceinu. V dalších 3 podílech (po 1500 ml) vody bylo izolováno 3,6 g difluoresceinylrtuti, dále ve 4 podílech (po 1500 ml) vody bylo izolováno 5,0 g 2'-hydroxymercurifluoresceinu, v dalších 4 podílech (po 1500 ml) vody bylo izolováno 4,0 g směsi 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinu jako mezifrakce, a konečně v 5 podílech (po 1500 ml) 1% roztoku NaHCO₃ bylo izolováno 3,9 g 4'-hydroxymercurifluoresceinu, který byl z elučního roztoku po částečném zahuštění a po okyselení kyselinou octovou izolován odfiltrováním a promytím vodou do neutrální reakce.

Potom byly jednotlivé podíly čistých derivátů I, II, IV zalkalizovány vypočteným množstvím vodného 1 N roztoku NaOH a tím uvedeny do roztoku. Podílu octanu sodného, vzniklého při zalkalizování roztoku, byly deriváty zbaveny chromatografií přes malý sloupec kysličníku hlinitého (poměr Al₂O₃ k derivátu 10:1), přičemž bylo eluováno pouze vodou. Octan sodný odešel v čele, načež byla jímána sodná sůl jednotlivých derivátů. Tím byly po odpaření roztoků a dokonalém vysušení ve vakuu získány čisté frakce jednotlivých hydroxymercuriderivátů. Pro analýzu byly jednotlivé deriváty přečištěny chromatografií na papíře podle způsobu popsaného dále pro čištění derivátu III.

Derivát III byl v malém množství pro analýzu vyčištěn od octanu sodného chromatografií na papíru W 3 v soustavě methanol : vodný amoniak 4 : 1 tak, že nejprve byl vzorek zneutralizován vypočteným množstvím 1 N roztoku NaOH (3 ekvivalenty) uveden do roztoku a ten potom po nanesení pásu na papír W 3 podroben chromatografii, přičemž octan sodný odešel v čele. Potom byla skvrna derivátu III po vystřížení eluována destilovanou vodou, eluát odpařen do

sucha a vysušen ve vakuu olejové vývěvy při 100 °C.

Analýzy derivátů I—IV

I

2'-hydroxymercurifluorescein:
pro $C_{20}H_{12}O_7HgNa_2$ (610,9)

vypočteno:
39,3 % C, 2,0 % H, 18,3 % O, 32,8 % Hg
7,5 % Na

nalezeno:
38,95 % C, 1,9 % H, 33,0 % Hg, 7,7 % Na

II

4'-hydroxymercurifluorescein:
pro $C_{20}H_{12}O_7HgNa_2$ (610,9)

vypočteno:
39,3 % C, 2,0 % H, 18,3 % O, 32,8 % Hg,
7,5 % Na

nalezeno:
39,5 % C, 2,2 % H, 32,7 % Hg, 7,3 % Na

III

bis-(hydroxymercuri)fluorescein:
pro $C_{20}H_{12}O_8Hg_2Na_2$ (827,5)

vypočteno:
29,0 % C, 1,5 % H, 15,5 % O, 48,5 % Hg,
5,5 % Na

nalezeno:
28,7 % C, 1,7 % H, 48,2 % Hg, 5,8 % Na

IV

difluoresceinylrtuť:
pro $C_{40}H_{22}O_{12}HgNa_4$ (987,2)

vypočteno:
48,7 % C, 2,2 % H, 19,4 % O, 20,3 % Hg,
9,2 % Na

nalezeno:
49,0 % C, 1,95 % H, 19,9 % Hg, 9,4 % Na

Příklad 2

Reakční směs sestávající z 19,65 g (0,05 M) sodné soli fluoresceinu rozpuštěného ve 100 ml vody, 11,2 g (0,035 M) octanu rtuťnatého rozpuštěného v 80 ml vody a okyselená 9,0 g (0,15 M) kyseliny octové byla zahřívána po dobu 5 hod. pod zpětným chladičem. Reakční směs (jemná suspence ve vodě při pH 4–4,5) obsahovala podle papírové chromatografie cca 4,0 g (22 %) nezureagovaného fluoresceinu, cca 10 % difluoresceinu rtuť, cca 50 % směsi polohových izomerů 2'- a 4'-hydroxymercurifluo-

resceinu a cca 20 % bis-(hydroxymercuri)-fluoresceinu a výše mercurisovaných podílů. Proti pokusu 1 se tedy snížil obsah výšemercurisovaných derivátů, které se obtížně chromatograficky dělí a mají nižší indexy R_f a R_{Hf} a naopak se zvýšil obsah polohových izomerů 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinu, difluoresceinylrtuť, které mají vyšší R_f a R_{Hf} a nezureagovaného fluoresceinu; tyto deriváty se chromatograficky lépe dělí. Proto pro zjednodušení byl na menším sloupci kyslíčnicku hlinitého z reakční směsi oddělen nezureagovaný fluorescein, potom směs difluoresceinylrtuť a polohových izomerů 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinu, které všechny mají příznivé R_f a R_{Hf} , a je proto možno použít je ve směsi a zbytek výšemercurisovaných derivátů byl ponechán nedělen na sloupci.

Reakční směs po rozpuštění a zalkalizování ve vodném roztoku NaOH (100 ml vody a 6,0 g) (0,15 M NaOH) byla tedy chromatografována na sloupci neutrálního kyslíčnicku hlinitého (900 g). V prvních čtyřech frakcích po 900 ml bylo eluováno 3,8 g nezureagovaného fluoresceinu v dalších 11 frakcích po 900 ml bylo izolováno 15,1 g směsi difluoresceinylrtuť a polohových izomerů 2'- a 4'-hydroxymercurifluoresceinu. Tato směs vzhledem ke svým příznivým farmakologickým vlastnostem nebyla již dále dělena a po srovnání s umělem připravenými směsmi sestávajícími se s výše uvedených derivátů byla jako taková používána k experimentům.

Jestliže se preparát uchovával delší dobu ve zředěných vodných roztocích, například v ampulkách pro injekce, bylo výhodné přidat k němu kyselý uhličitán sodný jako pufrovací činidlo v množství 0,5 až 1 % hmotnostního množství počítáno na objem vody v roztoku; pH roztoku bylo potom 8,6–8,8. Takto upravený roztok uchovaný v temnu v lednici při 0 až 3 °C zůstával bez rozkladu 9 měsíců.

B. Příklady biologické

Příklad 3

Ovlivnění metabolismu ischemií poškozené tkáně přípravkem podle vynálezu

Bylo použito modelu ischemického poškození srdeční tkáně dočasným podvazem sestupné větve levé koronární arterie. U psů nečistě rasy se provede v celkovém zneclivění (Pentobarbital, 20 mg/kg živé hmotnosti) levostranná thorakotomie a zavede se řízené dýchání kyslíkem. Po protěti perikardu se vypreparuje ramus interventricularis levé koronární arterie. Potom se vyvolá místní ischemie srdeční tkáně podvazem větve koronární arterie cca 2 cm od jejího vstupu z levé koronární tepny. Po 2 hodinách ischemizace se podvaz uvolní a obnoví se krevní oběh ischemizovanou tkání. Změny

metabolismu tkáně se sledují ve tkáňových vzorcích o hmotnosti 100 až 200 mg, které jsou odebírány ze stejného místa přední stěny z levé komory u zdravých psů (kontroly) i u psů po ischemizaci myokardu. Psi byli rozděleni do tří skupin. V první skupině byly vzorky odebrány před provedení podvazu, ve druhé za dvě hodiny po podvazu a ve třetí za 2 hodiny po obnovení cirkulace v ischemizovaném ložisku. Vzorky tkáně byly excidovány a zmrazeny pomocí Wollenbergerových kleští, váženy a extrahovány 10% roztokem kyseliny trichloroctové a acetonem a homogenizovány v homogenizátoru Elvenjem—Potter. Ve tkáňových vzorcích

byly provedeny tyto analýzy: Adenosintrifosfát (ATP), adenosindifosfát (ADP) adenosinmonofosfát (AMP), laktát a pyruvát pomocí enzymatického testu (Boehringer, Mannheim GmbH, NSR), fosfokreatin kolorimetricky (Ennor a Rosenberg: Biochem. J. Biochem. J. 51, str. 606, 1952), obsah sodných a draselných iontů plamenným fotometrem.

U kontrolní skupiny zvířat (psů) byl podáván fyziologický roztok. U pokusné skupiny byl podán přípravek podle vynálezu v dávce 0,5 mg/kg živé hmotnosti, a to těsně před uvolněním ligatury.

Výsledky pokusů ukazují následující tabulky:

Tabulka 2

Vzorky tkáně	ATP ($\mu\text{Mol/g}$)		Fosfokreatin průměr	($\mu\text{Mol/g}$) SD
	průměr	SD		
A	4,28	0,55	6,35	1,64
B	2,10	0,83	4,55	2,57
C	1,19	0,39	2,30	1,00
Cm	3,22	0,96	5,25	1,51

Symbody v tabulce 2 znamenají:

A — normální srdeční tkáň kontrolních psů,
B — tkáň odebraná po dvouhodinové ischemizaci,

C — tkáň odebraná po dvouhodinové ischemizaci a dvouhodinovém obnovení průtoku krve ischemickým ložiskem,

Cm — tkáň odebraná po dvouhodinové ischemizaci a dvouhodinovém průtoku krve ischemickým ložiskem, když před odstraněním ligatury byl podán intravenózně přípravek podle vynálezu (0,5 mg/kg živé hmotnosti psa).

Hodnocení tabulky 2

Po podvazu klesá koncentrace ATP ve tkáni (B proti A). Za 2 hodiny po uvolnění podvazu dojde ve tkáni k dalšímu poklesu ATP. Podání přípravku (viz položku Cm) nejen že tomuto poklesu zabrání, ale prakticky normalizuje hodnotu ATP ve tkáni. Podobný průběh změn vidíme i u koncentrace fosfokreatinu.

Tabulka 3

Vzorky tkáně	Laktát průměr		($\mu\text{Mol/g}$) SD
	průměr	SD	
A	3,16	1,54	
B	7,27	3,20	
C	4,05	1,42	
Cm	2,54	0,99	

Symbody stejné jako u tabulky 2

Hodnocení tabulky 3

Po podvazu stoupá v ischemické tkáni obsah laktátu (B proti A). Za 2 hod. po uvol-

nění podvazu dojde k poklesu koncentrace laktátu v ischemii poškozené tkáni, avšak není dosaženo výchozí hodnoty (C proti A). Podání přípravku urychlí pokles laktátu v ischemii poškozené tkáni a normalizuje jeho obsah ve tkáni (Cm proti A).

Tabulka 4

Vzorky tkáně	Sodík průměr	($\mu\text{Eq/g}$) SD	Draslík průměr	($\mu\text{Eq/g}$) SD	Voda (%)	
					průměr	SD
A	63,81	12,46	59,22	5,17	76,24	0,34
B	68,11	8,11	46,48	9,77	77,83	1,43
C	109,31	11,83	23,11	6,51	79,00	0,70
Cm	72,42	10,70	52,21	10,26	77,91	1,36

Symbody stejné jako u tabulky 2

Hodnocení tabulky 4

Koncentrace sodných iontů se při zachovaném podvazu významněji nemění od výchozí hodnoty (B proti A). Po uvolnění podvazu stoupne obsah sodíku ve tkáni (C proti B). Podání přípravku významně zabrání vzestupu koncentrace sodných iontů v ischemii poškozené tkáni a udrží jejich obsah blízko normální hodnoty (Cm proti A). Podobnou, ale zrcadlovou změnu vidíme v průběhu koncentrací draselných iontů. Za 2 hodiny po reperfúzi tkáně klesá ve tkáni koncentrace draselných iontů (C proti A, B). Přípravek podle vynálezu tento pokles (únik draselných iontů z buněk) zastaví a normalizuje obsah draselných iontů ve tkáni (Cm proti A). V souladu se změnami iontů normalizuje přípravek také obsah vody v ischemii poškozeném ložisku za 2 hodiny po perfúzi.

Příklad 4

Vliv přípravku podle vynálezu na aktivitu enzymů ve tkáni poškozené ischemií.

Byl použit stejný model místní ischemizace tkáně srdce jako v příkladu 3. To se týká i míst a doby odběru vzorku. Vzorky tkáně byly fyziologickým roztokem, osuše-

ny filtračním papírem a zváženy. Ze tkáně byl potom připraven 1% homogenát ve fyziologickém roztoku za teploty 0 °C, pro stanovení enzymových aktivit. Pro určení izoenzymu laktátdehydrogenázy byl připraven 10% homogenát tkáně ve veronal-acetátovém pufru o pH 8,6. Homogenizace byla provedena přístrojem Ultraterax. Homogenáty byly ponechány 1 hod. při teplotě 0 až 3 °C. Potom byly centrifugovány při 1000 °C. Supernatanty byly použity k vlastní analýze.

Aktivita malátdehydrogenázy (MDH) a laktátdehydrogenázy (LDH) byla stanovena neotetrasoliovou technikou (Mrhová a spol., Quart, J. Exp. Physiol. 1, 289, 1965). Aktivita kyselé fosfatázy, metodou podle Kaplana a Narahara (J. Lab. Clin. Met. 11, 819, 1953). Aktivita adenosintrifosfatázy metodou podle Banga a Novotného (Acad. Sci. Hung. 2, 327, 1951). Aktivita karboxylesterázy podle Seligmana a spol. (Amer. J. Physiol. 159, 337, 1949).

Rozdělení frakcí LDH bylo provedeno elektroforeticky na papíru W3 v barbitátovém pufru o pH 8,6 při spádu napětí 6 V/cm. Frakce byly obarveny tetrazoliovou technikou, eluovány acetonem a změřena jejich optická denzita při 490 nm.

Výsledky ukazují následující tabulky:

Tabulka 5

Vzorky tkáně	LDH %	MDH %	ACP %	Karb. est. %	ATPáza %
A	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
B	93,1	108,9	89,8	113,6	98,4
C	38,2	83,5	78,1	104,6	85,9
Cm	62,6	93,1	82,4	133,5	97,6

Symbole A, B, C, Cm viz tabulka 2
Normální hodnota ve zdravé tkáni:

LDH — 124,8 μ g diformazanu/100 μ g bílk. za hod. = 100 %

MDH — 101,9 μ g diformazanu/100 μ g bílk. za hod. = 100 %

ACP — 0,158 μ Mol fenolu/100 μ g bílk. za hod. = 100 %

Karb. est. — 1,216 μ g naftolu/100 μ g bílk. za hod. = 100 %

ATPáza — 0,42 μ g fosforu/100 μ g bílk. za hod. = 100 %

Hodnocení tabulky 5

Aktivita laktátdehydrogenázy se po podvazu významněji nemění (B proti A). Za 2 hodiny po uvolnění podvazu dojde k významnému poklesu aktivity (C proti A). Podání přípravku podle vynálezu normalizuje aktivitu LDH (Cm proti C). Podobný průběh

změn vidíme také u malátdehydrogenázy. Aktivita kyselé fosfatázy, karboxylesterázy a ATPázy klesají po dvouhodinové recirkulaci v ischemii poškozené tkáni (C proti B). Přípravek normalizuje aktivity enzymů (Cm proti C).

Tabulka 6

Vzorky tkáně	LDH α 4+5 %
A	100
B	88,1
C	111,1
Cm	49,8

Symbole A, B, C, Cm viz tabulka 2.

Hodnocení tabulky 6

Iscenzymy LDH se mění v ischemii poškozené tkáni po reperfúzi především v anaerobní frakci α 4+5. Dochází k jejich významnému vzestupu (C). Přípravek situaci normalizuje a vede k poklesu anaerobních frakcí izoenzymů LDH (Cm).

Příklad 5

Ovlivnění elektrofyzilogických vlastností srdeční tkáně přípravkem podle vynálezu při poškození ischemizací

Byl použit stejný model ischemizace tkáně jako u příkladu 3 a 4, jen s tím rozdílem, že nebyly odebrány vzorky tkáně, ale byly našity stimulační elektrody (Chardack W., US pat. 3 216 424, 1965). Jedna elektroda byla našita do tkáně normálně prokrvované poblíže báze levé komory srdeční, druhá elektroda do ischemie poškozené tkáně poblíž srdečního hrotu. Byla sledována hod-

nota fibrilačního prahu ve tkáni normálně prokrvované a ve tkáni poškozené ischemií. Ke stanovení fibrilačního prahu byla zvolena metoda dráždění srdeční tkáně sérií stimulačních elektrických impulsů. Fibrilační prah je vyjádřen velikostí stimulačního proudu potřebného pro vyvolání fibrilace srdečních komor (Blažek a spol., Cor et Vasa 13, 251, 1971).

Přípravek byl podáván v dávce 0,5 mg/kg živé hmotnosti za 30 minut po uvolnění podvazu koronární větve. Měření fibrilačního prahu bylo prováděno za 30, 60 a 90 minut po podání přípravku.

Výsledky jsou zachyceny v tabulce 7.

Tabulka 7

	Fibrilační prah (FP) (mA)	
	Kontrola	Přípravek podle vynálezu
Normální tkáň	0,29±0,02	0,35±0,04
Ischemická tkáň	0,81±0,12 A	0,3±0,27 B
		NSA = B P < 0,05 A ≠ B

Fibrilační prah v ischemii poškozené a krví reperfundované tkáni je po podání přípravku podle vynálezu významně vyšší, než u skupiny kontrolní. Přípravek neovlivňuje výši fibrilačního prahu ve tkáni, která nebyla poškozena ischemií.

V další sérii experimentů byl pokusný model modifikován v tom smyslu, že ligatura byla ponechána po dobu 3 hodin.

Během tříhodinové ischemizace tkáně

jsme sledovali změny efektivní refrakterní periody ve tkáni normálně prokrvované a ve tkáni ischemické podle metody Han J., Circ. Research. 14, 44, 1964). Pokusné skupině zvířat byl podán přípravek podle vynálezu v dávce 0,5 mg/kg živé hmotnosti těsně před podvazem větve koronární tepny.

Výsledky ukazuje tabulka 8.

Tabulka 8

	Efektivní refrakterní fáze (ERP) (msec)	
	Kontrola	Přípravek podle vynálezu
Normální tkáň	143±6,8	131,8±18,7
ischemická tkáň	114±10,9	123,9±18,7
P	0,05 A ≠ B	NS A = B

Za 2 hodiny po podvazu tepny je v ischemické tkáni patologicky zkrácena ERP proti tkáni normální (P < 0,05). Po podání přípravku podle vynálezu je zkrácení ERP v ischemické tkáni významně menší, a proto je rozdíl obou hodnot statisticky nevýznamný.

Přípravek podle vynálezu (0,5 mg/kg hmotnosti) ve srovnání s kontrolou průběh nitrokomorového tlaku neovlivňuje. Naproti tomu Mesocain v dávce 3 mg/kg hmotnosti vede buď ke snížení systolického komorového tlaku, nebo ke zvýšení endodiastolického tlaku v levé komoře srdeční.

Příklad 6

Ovlivnění hemodynamických vlastností srdce poškozeného místním ložiskem ischemie přípravkem podle vynálezu

Byl použit stejný model ischemizace srdeční tkáně jako u příkladu 3 a 4 s tím rozdílem, že nebyly odebrány vzorky tkáně ani nebyly našívány elektrody do srdce. Místo toho byl zaveden do levé komory srdeční katetr pro přímé měření nitrokomorového krevního tlaku. Sledovali jsme okamžitý účinek přípravku na tlak v levé komoře srdeční ve srovnání s účinkem Mesocainu. Výsledky ukazuje obr. 1.

C. Klinické zkoušky

Příklad 7

Antiarytmický účinek přípravku podle vynálezu u nemocných operovaných pro ischemickou chorobu srdeční

V pooperačním údobí koronární chirurgie se setkáváme s celou řadou komplikací, mimo jiné také s arytmiemi. Vznik těchto arytmií je dán revascularizací ischemických oblastí myokardu během operace. Zároveň však mohou vznikat nová ischemická ložiska. Příčinou jejich vzniku může být jednak změněná hemodynamika koronárního řečiště, jednak vlastní operační technika.

Sledovali jsme účinek přípravku na pooperační výskyt arytmií v kardiochirurgii. Nejčastějším druhem operace byl dvojitý aortokoronární bypass a jednoduchý aortokoronární bypass.

Nemocní byli rozděleni do dvou skupin: 13 nemocných, kteří nedostali přípravek podle vynálezu tvořilo kontrolní skupinu. Ve vlastní skupině léčené přípravkem bylo 25 nemocných. Přípravek jsme podávali v dáv-

ce 0,05 mg/kg hmotnosti v jednorázové pomalé nitrožilní injekci ještě na operačním stole po zrušení mimotělního oběhu. V pooperačním průběhu jsme hodnotili četnost extrasystol a trvání arytmiie pomocí monitoru arytmií firmy Hewlett-Packard (model 7822B). Průměrná doba sledování nemocného byla 19 hodin. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9

Četnost ES	5—10/min.	11—20/min.	21—30/min.	nad 30/min.	n
I kontrola	1,20	1,30	0,67	1,10	13
II přípravek podle vynálezu	0,63	0,36	0,09	0,05	25

P<0,05

Z tabulky plyne, že přípravek zkracoval trvání arytmiie při všech četnostech extrasystol. Šlo o extrasystoly supraventriculární i komorové často s „R on T“. Ojedinele jsme viděli komorovou tachykardii. I když šlo ve většině případů o extrasystoly homodynamicky neúčinné, které neohrožovaly nemocného na životě, prokázal přípravek schopnost normalizovat srdeční rytmus a zkrátit trvání arytmiie. Na rozdíl od ostatních antiarytmik neměl přípravek podle vynálezu žádné vedlejší účinky.

D. Ochrana orgánů přípravkem podle vynálezu při transplantacích

Příklad 8

Ovlivnění biochemických, elektrofyziologických a morfologických změn přípravkem podle vynálezu při transplantacích srdce

Při orthopických transplantacích srdce byl sledován vliv přípravku na biochemické změny v srdeční svalovině, morfologické změny a výskyt komorových fibrilací a

arytmií po transplantaci. Pokusy byly prováděny na dvou skupinách pokusných zvířat. V první skupině nebyli psi ovlivňováni, ve druhé byl podáván přípravek. Po vyjmutí srdce dárce byl koronární systém propláchnut perfúzním roztokem při teplotě 4 st. Celsia buď samotný, nebo po přidání přípravku v množství 2,5 mg na 500 ml roztoku.

Srdce potom bylo transplantováno příjemci za použití mimotělního oběhu a srdeční činnost byla obnovena defibrilačním vývojem. Druhé skupině psů byl podán přípravek ještě před obnovením činnosti srdce intravenózně v množství 0,5 mg na kg živé hmotnosti zvířete. Vzorky srdeční svaloviny byly odebírány téhož psa před vyjmutím srdce dárce, před obnovením činnosti transplantovaného srdce a za 30 minut po obnovení činnosti. Ve vzorcích srdeční tkáně byla stanovena glukóza, laktát a adenosintrifosfát (ATP). Pro elektronovou mikroskopii byly odebrány vzorky v těchto intervalech. Průběžně byla zaznamenávána činnost srdce a její poruchy na elektrokardiogram (EKG). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11.

Tabulka 10

	ATP a	(μ Mol/g) b	Glukóza a	(μ Mol/g) b	Laktát a	(μ Mol/g) b
I	4,82	5,05	2,57	6,85	2,47	4,66
II	2,15	3,00	4,00	2,86	19,73	12,88
III	1,70	3,20	17,70	10,56	6,95	9,32

I — výchozí hodnoty před vyjmutím srdce,
II — hodnoty na konci transplantace před obnovením srdeční činnosti,
III — hodnoty za 30 minut po obnovení srdeční činnosti,
a — neovlivněná zvířata,
b — zvířata ovlivněná přípravkem podle vynálezu.

Z výsledku vyplývá, že i zde byl metabolismus myokardu přípravkem podle vynálezu chráněn před nepříznivými účinky ischemie.

Sledování vlivu přípravku podle vynálezu na tkáň v elektronovém mikroskopu: výsledky podává tabulka 11.

Tabulka 11

Čas od defibrilace srdce	Četnost výskytu srdečních poruch v %		Jiné arytmie		Sinusový rytmus	
	Fibrilace komor					
	a	b	a	b	a	b
0 až 60 min.	80,00	0	60,00	23,0	48,0	100,0
60 až 120 min.	50,0	0	50,0	24,0	24,0	50,0

a — neovlivněná zvířata,

b — zvířata ovlivněná přípravkem podle vynálezu.

Při sledování v elektronovém mikroskopu byl prokázán příznivý vliv přípravku na buněčné struktury, neboť, byly prokázány vyšší glykogenové rezervy ve formě granul a rovněž byly prokázány zachované membrány mitochondrií a mitochondriální krusty oproti srdeční svalovině, která nebyla přípravkem chráněna. Srdeční činnost se obnovovala po defibrilaci u psů ovlivněných přípravkem snáze, sinusový rytmus nastupoval dříve, snížil se počet arytmí a ne-
vznikaly fibrilace komor.

Příklad 9

Vliv přípravku podle vynálezu na přežívání alotransplantovaných ledvin

Tabulka 12

	Průměrná doba přežití (dny)	SE ±
Transplantovaná ledvina bez ovlivnění	16,2	1,7
Transplantovaná ledvina ovlivněná přípravkem podle vynálezu	22,5	2,6
Statistická významnost	p 0,05	

Z tabulky vyplývá, že přípravek velmi významně prodlužuje přežití alotransplantované ledviny u psa.

Příklad 10

Ovlivnění imunogenity ischemické tkáně účinkem přípravku podle vynálezu

V pokusech na myších bylo prokázáno, že ischemická tkáň je mnohem více imunogenní než tkáň normální. Přípravek tuto nepříznivě zvýšenou imunogenitu potlačuje.

K pokusům byly použity myši imbreghních kmenů. Kmen B.10 byli dárce, kmen B.10 LP příjemci kožních štěpů. Změny imunogenity byly testovány délkou přežití kožních štěpů. Kůže byla transplantována z ocasu dárce na hřbet příjemce. Přijde-li příjemce štěpu před transplantací do styku s antigenem dárce, potom se kožní transplantáty

Byl sledován účinek přípravku podaného jednorázově dárce ledviny na délku přežití transplantátu bez imunosupresivní terapie. Pokusy byly prováděny na psech. Dárce byl podán přípravek intravenózně v množství 0,5 mg na kg hmotnosti 3 hod. před vyjmutím ledviny. Ledvina byla potom našita na ilické cévy příjemce a ureter implantován do močového měchýře. Obě vlastní ledviny příjemce byly odstraněny. V druhé skupině zvířat byla ledvina transplantována bez ovlivnění. Psi v obou skupinách dostávali denně infúzi 5 % glukózy a tetracyklin v množství 10 mg na kg hmotnosti. Funkce ledviny byla sledována podle hladin kreatininu v krvi až do uhynutí zvířete. Výsledky jsou zachyceny v tabulce 12.

odloučí dříve a rychlost je závislá na síle antigenní aktivity. Ve čtyřech sériích pokusů byl proto podán antigen příjemci ve formě buněčné frakce jaterní tkáně dárce subkutánně v množství 0,1 mg na myš (přepočteno na suchou hmotnost), a to 7 dní před transplantací kůže. V první skupině dostali příjemci buněčnou frakci normálních jater, ve druhé skupině buněčnou frakci normálních jater, která byla odebrána za 20 hodin po aplikaci přípravku, podaného intravenózně v množství 0,5 mg na kg hmotnosti. Ve třetí skupině dostali buněčnou frakci jater ischemizovaných 90 minut a odebraných za 20 hodin po ischemizaci. Ve čtvrté skupině potom byla podána buněčná frakce jater dárce, kterým byl 3 hodiny před 90minutovou ischemizací aplikován přípravek ve stejném množství a játra byla odebrána 20 hodin po ischemizaci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13

Skupina		Průměrná doba přežití štěpu (dny)	SE $\pm$
	Kontroly	19,2	0,6
I	Normální játra	17,0	1,3
II	Normální játra + přípravek podle vynálezu	20,0	1,4
III	Ischemická játra	12,8	0,3
IV	Ischemická játra + přípravek podle vynálezu	19,3	1,3

Statistická významnost:

Kontroly proti I: nevýznamné

I proti III: $p < 0,01$

IV proti III: $p < 0,01$

IV proti kontrole: nevýznamné

Z tabulky vyplývá, že buněčná frakce normálních jater dárce je poměrně slabým antigenem, který sice zkracuje přežití kožních štěpů, ale statisticky nevýznamné. Antigenní aktivita se však velmi průkazně zvýší, jsou-li játra vystavena ischemii. Přípravek podaný preventivně ochraňuje játra před nepříznivými účinky ischemie, nebo, antigenicita se nejen nezvyšuje, ale neuplatňuje se ani jako u jater neischemizovaných, neboť kožní štěpy přežívají stejnou dobu jako ve skupině kontrolní.

Příklad 11

Vliv přípravku podle vynálezu na hnojení ischemií poškozeného kosterního svalu

Tabulka 14
Malatodehydrogenáza

Skupina		Neovlivněné svaly	Přípravkem podle vynálezu ovlivněné svaly	
	Kontroly	100 %	100 %	
I	za týden po ischemizaci	79 %	106 %	$p < 0,01$
II	za dva týdny po ischemizaci	92 %	100 %	
III	za 11 týdnů po ischemizaci	85 %	93 %	$p < 0,05$

Podávání přípravku ovlivnilo aktivitu v ischemizovaném svalu, a to jak v akutní, tak v chronické fázi. Zatímco v ischemickém svalu bez podání přípravku se aktivita malatodehydrogenázy za jeden týden po operaci signifikantně snížila a tento pokles

Pokusy byly prováděny na kryších o hmotnosti 200 g. Ischemie kosterního svalu (musculus tibialis anterior) byla vyvolána přetětím ilické tepny mezi dvěma obratly. V jedné skupině byl podáván kryšům prostředek v množství 0,5 mg na kg hmotnosti intravenózně denně po dva týdny a potom dvakrát týdně až do jedenáctého týdne. Ve druhé skupině byl podáván místo přípravku podle vynálezu fyziologický roztok. Krysy byly dekapitovány za jeden, dva a jedenáct týdnů (po 20 zvířatech) a odebrán ischemizovaný sval pro stanovení obsahu malatodehydrogenázy, která umožňuje posuzovat rychlost hnojení poškozeného svalu. Výsledky byly porovnávány s hodnotami nalezenými při analýze svalů zdravých kryš. Výsledky ukazuje tabulka 14.

přetrvával až do chronické fáze ischemie, zůstala aktivita po ovlivnění přípravkem v ischemickém svalu v akutní i v chronické fázi nezměněna proti svalům kontrolních zvířat. Svědčí to pro rychlejší nástup repačních dějů a rychlejší hojení svalů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Prostředek k léčení a ochraně ischemicky poškozených tkání a normalizaci jejich funkcí, vyznačený tím, že sestává z roztoku směsi 2'-hydroxymercurifluorescein, 4'-hydroxymercurifluorescein, bis-(hydro-

xymercuri)fluorescein a difluoresceinyl rtuti, přičemž množství uvedených složek ve směsi je v poměru 5 až 95:5 až 95:2 až 20:2 až 20 hmotnostních dílů.