

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az aneszteziológia és intenzív terápia egyes gyógyszereinek vaszkuláris hatásai

Dr. Gödény Ildikó

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2018.**

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS.....	5
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1	Az endotélium és a simaizomsejtek szerepe a mikrocirkuláció szabályozásában.....	9
2.1.1	A NO keletkezése és szerepe a vazodilatációban	12
2.1.2	Az EDHF szerepe az értónus szabályozásában	15
2.1.3	Az érfal relaxáció és az extracelluláris K^+ koncentráció összefüggése. A K_{IR} csatornák jelentősége	18
2.2	Egyes anesztetikumok hatása a mikrocirkulációra	19
2.2.1	A halogénezett anesztetikumok hatása az endotélium-függő vazodilatációra ..	20
2.2.2	Egyéb anesztetikus ágecek hatása az értónusra.....	21
2.3	A levosimendan és metabolitjának (OR-1896) vazoaktív tulajdonságai <i>in vivo</i>.....	21
2.4	A cremaster preparátum humán mikrocirkuláció relevanciája	24
3	CÉLKITÚZÉSEK.....	25
4	ANYAGOK és MÓDSZEREK	27
4.1	A kísérletes modell leírása	27
4.2	Állatok és anyagok	27
4.3	A patkányok anesztéziája és monitorozása	27
4.4	A cremaster preparátum készítése.....	28
4.5	Az intravitalis videomikroszkópia	29
4.6	Az agonisták által kiváltott válaszreakciók jellemzése	31
4.7	A kísérleti protokollok.....	31
4.7.1	A K_{IR} csatorna jelenlétének bizonyítása a cremaster izomban, szerepe a K^+ indukált vazodilatációban	31
4.7.2	Egyes anesztetikumok befolyásoló szerepe a NO és az EDHF útvonalakra az agonisták által kiváltott vazodilatáció során cremaster izompreparátumban ..	32
4.7.3	A K_{ATP} csatorna szerepének kimutatása a levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban	34
4.8	Anyagok	35
4.9	Adatok értékelése, statisztikai módszerek	35
5	EREDMÉNYEK	37
5.1	K^+ csatornák részvétele az érátmrő szabályozásában normál extracelluláris K^+ koncentráció mellett.....	37
5.2	A K^+ koncentráció emelkedéssel indukált vazodilatációban részt vevő K^+ csatornák vizsgálata.	39
5.3	A különböző anesztetikumok szerepének vizsgálata az értónus szabályozásában.	41
5.3.1	A NOS útvonal gátlásának hatása az érátmrőkre különböző anesztetikumok használata mellett.....	41
5.3.2	Az EDHF útvonal gátlásának hatása az érátmrőkre különböző anesztetikumok használata mellett.....	45
5.3.3	Az acetilkolin által kiváltott érválaszok a különböző anesztetikumok használata során.....	48

5.3.4	A bradikinin által kiváltott érválaszok a különböző anesztetikumok használata során	52
5.4	A levosimendan és metabolitja (OR-1896) vazodilatív tulajdonságainak <i>in vivo</i> vizsgálata.....	54
5.4.1	A levosimendan és az OR-1896 által kiváltott vazodilatáció vizsgálata	55
5.4.2	A K_{ATP} csatorna szerepének vizsgálata a levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban	56
6	MEGBESZÉLÉS	59
6.1	A mérsékelt, lokális hiperkalémia okozta vazodilatációért a K_{IR} csatorna volt felelős. A nyugalmi értónus fenntartásában a K_{ATP} csatorna is szerepet játszott ...	59
6.2	A NO és EDHF egyensúlya felborul egyes volatilis anesztetikumok alkalmazása mellett.....	60
6.3	A levosimendan és aktív metabolitja a K_{ATP} csatorna aktiválásával hozza létre a perifériás vazodilatatív hatását a fenti kísérletes modellben.	62
6.3.1	A levosimendan és az OR-1896 erőteljes vazodilatációt váltott ki <i>in vivo</i>	62
6.3.2	A levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban a K_{ATP} csatorna aktivációja döntő szerepet játszik.....	63
6.4	Az eredmények jelentősége a gyakorlati életben.....	65
7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	67
8	SUMMARY	68
9	GYAKRAN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	69
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	71
10.1	A disszertáció alapját képző közlemények jegyzéke	71
10.2	Egyéb közlemények jegyzéke	72
10.3	Hivatkozott közlemények jegyzéke	73
11	TÁRGYSZAVAK.....	81
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	81
13	FÜGGELÉK	82

1 BEVEZETÉS

A modern aneszteziológiai és intenzív terápiás szerek és technikák segítségével ma már olyan betegeket is sikerrel kezelhetünk, akikről egy-két évtizede még lemondott volna az orvostudomány. A műtetre kerülő betegek átlagéletkora és társbetegségeik száma egyre nő, így az aneszteziológusok számára e betegcsoport sikeres kezelése egyre komplexebb kihívást jelent.

A szívbeteg anesztéziájának módja és az ezt követő intenzív ellátás alapvető fontosságú a fokozott rizikójú betegek túlélése szempontjából.

Az utóbbi években az intenzív osztályokon ezért egyre inkább biztonságos, a korábbiaknál hatékonyabb anesztetikus hatású ágenseket igyekeznek alkalmazni, miközben a szívelégtelenség kezelését és a potenciális kardioprotekciót is szem előtt tartják.

Az első nemzetközi konszenzus konferencián Milánóban 2010-ben a kardiovaszkuláris anesztézia és intenzív ellátás vonatkozásában az intravénás anesztéziával összehasonlítva az inhalációs anesztetikumok használatát potenciálisan kedvezőbbnek találták a túlélésre, valamint a pozitív inotróp hatású levosimendan alkalmazását is javasolták a perioperatív időszakban [Riha és mtsai 2012].

Ahhoz, hogy megértsük az új irányelvek tudományos hátterét, a fent említett gyógyszerek mikrocirkulációban játszott szerepének pontos ismerete szükséges. A perifériás ellenállás szabályozásán keresztül változhat a keringési rendszer egészének hemodinamikája (makrocirkuláció), és a szöveti perfúziót, oxigenizációt biztosító mikrocirkuláció is.

A rezisztencia erek a vazodilatáció és vazokonstrikció dinamikus egyensúlyának fenntartása révén biztosítják az értónust a folyamatosan változó élettani körülmények között.

A rezisztencia erek átmérőjét összetett mechanizmusok szabályozzák. Az elmúlt évtizedek intenzív kutatásai révén ma már tudjuk, hogy ebben a szabályozásban egyrészt az ér endotélium és az alatta fekvő simaizomsejt között zajló biológiai jelátviteli folyamatok, másrészt az egyes ingerek hatására a szövetekben lokálisan felszabaduló vazoaktív anyagok vesznek részt. Ezen kapcsolatok léte motivált a munkám első részében

melyben azt kutattam, hogy a harántcsíkolt izmokban található rezisztencia erek értónusának fenntartásában mely ioncsatornák vesznek részt.

Az aneszteziológiai-intenzív terápiás gyakorlatban alkalmazott szerek közül több is rendelkezik erőteljes vazóaktív hatással, jóllehet alkalmazásuk elsődleges indoka nem ez. A jelenleg használt volatilis anesztetikumok csökkentik a vaszkuláris rezisztenciát, de a hatásmechanizmus még nem egyértelműen tisztázott [Akata 2007]. Azt már tudjuk, hogy az inhalációs anesztetikumok egyrészt gátolják az endotélium-függő vazodilatációt *in vitro* [Aguirre és mtsai 2016], ugyanakkor fokozzák az endotéliumtól független vaszkuláris simaizom relaxációt. Utóbbi feltételezett útja az intracelluláris Ca^{2+} elérhetőségének és a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} iránt mutatott szenzitivitásának csökkentése [Akata 2007, Villeneuve és mtsai 1991]. Az egymást kiegészítő hatások összességében az értónus elvesztését eredményezhetik. Egyes szerzők véleménye szerint az endotélium-függő vazodilatáció gátlás hatásmechanizmusa altatószerenként is különböző lehet [Nakamura és mtsai 1994]. Az altatószerek rezisztencia erekre kifejtett *in vivo* hatásról azonban még igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Dolgozatom második részében végzett kísérleteim ezért erre a területre fókuszáltak.

Kutatásaim harmadik részében a kardiológiai intenzív terápiában alkalmazott levosimendan ((-)-0-ciano-N-{4-[(4R)-4-metil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridazin -3-il]fenil}metánkarbohidrazonoil-cianid) mikrocirkulációra kifejtett hatását vizsgáltam *in vivo*. A pozitív inotróp hatású kalcium érzékenyítő levosimendant a dekompenzált szívelégtelenség kezelésére fejlesztették ki. Az adrenerg receptorokon ható inotróp szerekkel szemben a levosimendan úgy fejti ki pozitív inotróp hatását, hogy ez nem jár fokozott oxigénfelhasználással. A levosimendan a perifériás artériákon és vénákon erőteljes vazodilatációt okoz (inodilátor). Előnye, hogy béta-blokkoló kezelés mellett is alkalmazható, mivel hatása a béta-adrenerg receptoroktól független. Mindezen tulajdonságai alapján az Európai Kardiológiai Társaság ajánlottnak tartja a szer alkalmazását súlyos krónikus szívelégtelenség akut dekompenzációja esetén [Ponikowski és mtsai 2016, Swedberg és mtsai 2005].

Ahhoz, hogy a levosimendan a klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazhatóvá váljon, elengedhetetlen feltétel volt a szer pontos hatásmechanizmusának ismerete *in vitro* és *in vivo*. Ennek céljából intenzív kutatómunka indult az elmúlt évtizedekben. Ma már ismert, hogy a levosimendan farmakokinetikája komplex, melynek oka részben az,

hogy a szervezeten belüli lebomlása során egy hosszú féléletidejű aktív metabolit, az OR-1896 ([N-(4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)phenyl]acetamide(-) enantiomerje) is keletkezik [Erdei és *mtsai* 2006]. Komplexitásának másik oka, hogy egyidejűleg több molekuláris célponttal is rendelkezik a kardiovaszkuláris rendszeren belül [Papp és *mtsai* 2012].

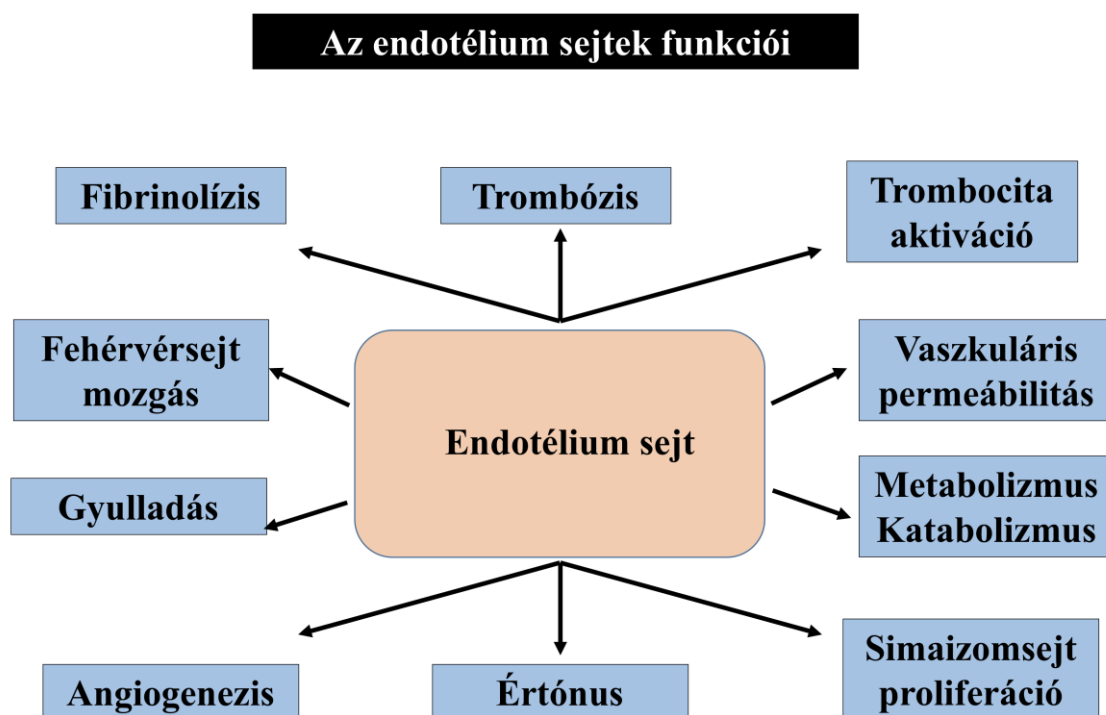
Jelen munkámban a levosimendan és metabolitja, az OR1896 vazoaktív tulajdonságait hasonlítottam össze patkány cremaster izom rezisztencia erein *in vivo* körülmények között. Korábbi kutatások alapján már tudtuk, hogy a fent említett vegyületek *ex vivo* döntően az ATP szenzitív K^+ (K_{ATP}) csatornák aktiválása révén fejtik ki értágító hatásukat, bár a vazodilatációban más típusú K^+ csatornák is részt vesznek, fajtól, értípustól és érátmérőtől függő arányban [Erdei és *mtsai* 2006, Hohn és *mtsai* 2004, Kaheinen és *mtsai* 2001, Pataricza és *mtsai* 2000, Pataricza és *mtsai* 2003]. Munkánk harmadik fejezete ezért arra irányult, hogy kimutassuk és összehasonlítsuk a levosimendan és az OR-1896 mikrovaszkuláris hatását *in vivo*, és feltárjuk a K_{ATP} csatornák szerepét a fenti folyamatban. Ezzel a munkával az irodalomban e téren fellelhető még hiányos adatokat sikerült teljesebbé tennünk.

Eredményeim segítenek megérteni a mikroerek szintjén zajló szabályozási folyamatokat. Hozzájárulnak ahhoz, hogy átfogóbb képet kapjunk az alkalmazott gyógyszerek hatásmechanizmusáról. Mindezen ismeretek iránymutatóak lehetnek további kísérletek tervezése során, illetve lehetőséget biztosíthatnak újabb terápiás eljárások kialakításához.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az endotélium és a simaizomsejtek szerepe a mikrocirkuláció szabályozásában

Az érfalat bélelő endotélium sejtek által alkotott endotéliumot az 1970-es évekig egy egyszerű mechanikai barrierként képzelték el. Azóta bebizonyosodott, hogy szerepe ettől sokkal összetettebb. Számos kiemelt jelentőségű funkciót lát el: szabályozza az értónust, meghatározó szerepet játszik többek között a vaszkuláris permeabilitásban, a trombocita aggregációban és a véralvadásban, az immunológiai és gyulladásos reakciókban, az angiogenezisben, a metabolikus folyamatokban és az endokrin szabályozásban is (1. ábra)



1. ábra. Az endotélium sejtek funkciói. A nyilak az endotélium sejtek ismert funkcióira mutatnak. Az összefüggések részletei a vonatkozó szövegben találhatóak. Feletou 2011 alapján (Feletou 2011).

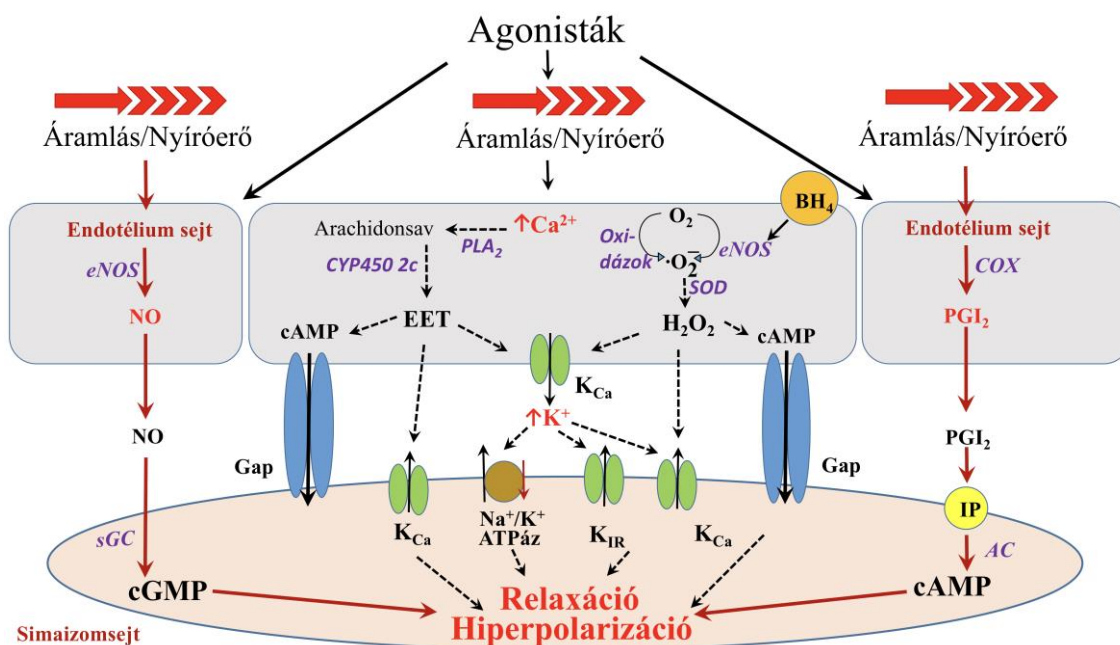
Mivel az artériás, vénás és nyirokrendszer endotélium felülete összesítve mintegy 1000 m², az érpályán belüli és az érfalon keresztül a szervezet többi sejtje felé történő anyag- és információcserében játszott szerepe egyedülálló. Az endotélium szerkezetét és funkcióját tekintve jelentős különbségeket mutat a fajok, a nem, az ér típusa, szervezeten

belüli lokalizációja és az oszlási fa szerinti elhelyezkedése alapján. Ugyanaz a mechanizmus csak ugyanannak a fajnak ugyanolyan típusú, ugyanolyan szervből származó, az oszlás szerint is közelálló elhelyezkedésű ereiben megy végbe biztosan ugyanúgy. Ez a felismerés különösen nehézé teszi működésének kísérletek révén történő megfigyelését. Mindezek ellenére az elmúlt két évtizedben az élettani kutatások központjában állt, melynek hatására lépésről lépésre bontakozott ki a szabályozási folyamatok igen összetett képe. Azonban sok kérdésre még ma sem tudjuk a választ [Feletou 2011, Feletou 2011].

Az endotélium sejtek és az alattuk elhelyezkedő simaizomsejtek szoros egységet alkotnak. Kölcsönhatásuk eredménye a kisebb arteriák és arteriolák (un. rezisztencia erek) által létrehozott vazotónus, mely meghatározza a lokális, a szervi és a generalizált vérátáramlást. Egymásra utaltságukat bizonyítja, hogy az endotéliumtól megfosztott erek átmérője szignifikánsan kisebb, mint ugyanezeknek az ereknek az átmérője ép endotélium mellett [Furchgott és Zawadzki 1980]. Az endotélium változatos mechanizmusokon keresztül képes az alatta fekvő simaizom működését befolyásolni: közvetlen kapcsolat révén (pl. gap junction) az alatta fekvő simaizommal, illetve relaxációt/konstriktiót kiváltó anyagok szintézisével és kibocsátásával, ilyenek pl. a nitrogén-monoxid (NO), az arachidonsav egyes lebomlási termékei, fehérjék (pl. endothelin), purinszármazékok, adenzin, reaktív oxigén vegyületek és egyes vazóaktív hormonok, pl. az angiotenzin II [Schalkwijk és Stehouwer 2005]. Ahhoz, hogy az endotélium a keringés lokális szabályozásában részt vehessen, elengedhetetlen a mikroerek szenzoros funkciója, mellyel a vérkeringés helyi eltéréseit az endotélium membrán receptor függő, vagy attól független módon érzékeli [Gibbons 1997]. Ezáltal képes az endotélium az adott szövet vagy szerv vérátáramlását a pillanatnyi lokális igényeknek megfelelően alakítani, a generalizált értónustól függetlenül. Endotélium diszfunkció során ez az egyensúly károsodik, és a vazokonstriktív vagy dilatatív hatású anyagok szintézisének vagy kibocsátásának zavarán keresztül kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulását segítheti elő (pl. hipertónia, arterioszklerózis, kardiovaszkuláris öregedés) [Aguirre és mtsai 2016].

Az endotélium által kiváltott vazodilatáció három fő útvonalon mehet végbe: a NO, a prosztaciklin és az endotéliumból származó hiperpolarizációs faktor (EDHF) által kiváltott módon (2. ábra)

Dolgozatomban e három mechanizmus közül a NO és az EDHF által közvetített vazodilatációt vizsgáltam a prosztaciklin útvonal gyógyszeres gátlása mellett. Ezért ezt a két útvonalat részleteztem a következő fejezetekben a rendelkezésre álló szerteágazó irodalmi adatok összesítése révén.



2. ábra. Az endotélum által közvetített relaxáció/dilatáció útvonalai. Az agonisták (bradikinin, acetilkolin) vagy a véráramlás okozta nyíróerő aktiválja az endoteliális NO szintetáz (eNOS) és ciklooxygenáz (COX), mellyel kiváltja a nitrogén monoxid (NO) és a prosztaciklin (PGI_2) közvetített vazodilatációt. A harmadik, ún. EDHF útvonal több mechanizmus révén is létrejöhet. Az agonisták vagy a nyíróerő hatására megemelkedő intracelluláris Ca^{2+} aktiválja a foszfolipáz A2-t (PLA_2), így serkentve az arachidonsav termelést. Ez utóbbit a citokróm P450 2C enzim (CYP450 2c) metabolizálja epoxieikozatrién savvá (EET), mely serkenti a kalcium aktiválta K^+ csatornák (K_{Ca}) működését mind az endotélum, mind a simaizomsejt felszínén. Az EET-k közvetlenül aktiválhatják a gap junctionokat is (Gap). Az interstícium K^+ szintjének emelkedése a simaizomsejtek felszínén elhelyezkedő K_{Ca} , a befelé egyenirányító K^+ csatornák (K_{IR}), vagy a Na^+/K^+ ATPáz aktivációja révén a sejt hiperpolarizációjához vezet, és az izom elernyed. Az eNOS hatására a tetrahydrobiopterin (BH_4) kofaktor és oxidázok közreműködésével oxigénből (O_2) reaktív szuperoxid (O_2^-) képződik, mely szuperoxid-dizmutáz (SOD) jelenlétében H_2O_2 képződést eredményez. A H_2O_2 szintén a simaizom hiperpolarizációját váltja ki, mivel aktiválja az endotélum és a simaizomsejt felszínén lévő K_{Ca} csatornákat, valamint közvetlenül serkenthetik a gap junctionokat is. AC: adenilcikláz, cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát, cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát, sGC: szolubilis guanilát cikláz, NO: nitrogén-monoxid, IP: prosztaciklin receptor

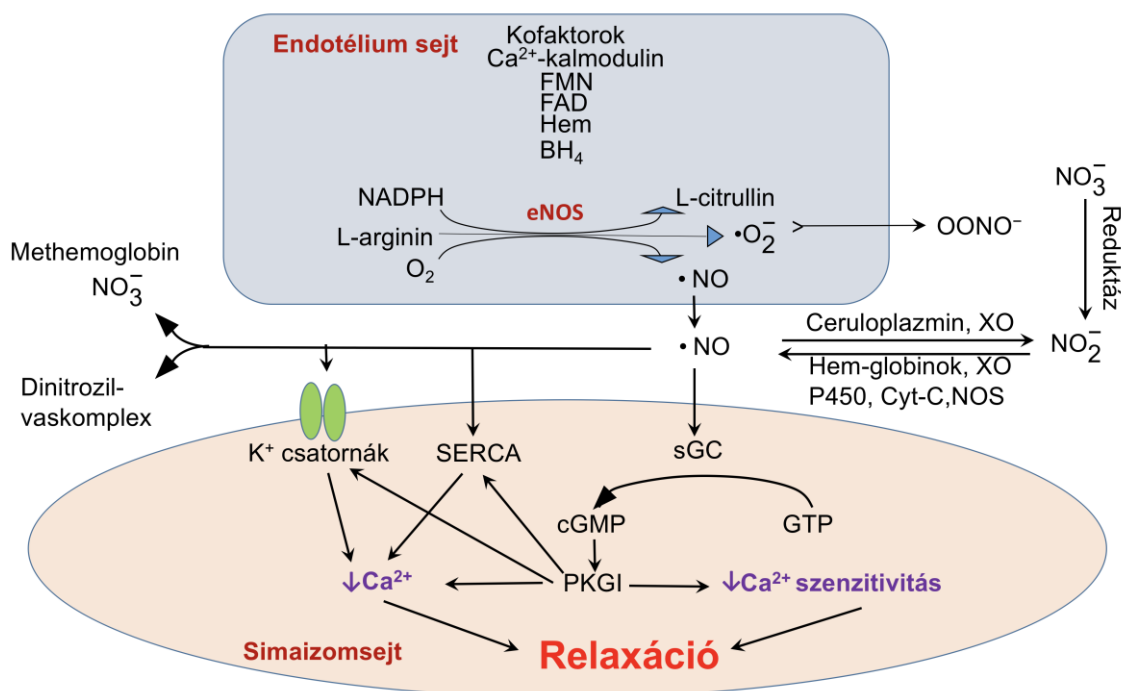
2.1.1 A NO keletkezése és szerepe a vazodilatációban

Furchgott és Zawadzki írta le először, hogy az acetilkolin csak akkor képes vazodilatációt létrehozni az érpreparátumban, ha az endotélium ép. Az ekkor még ismeretlen, endotélium eredetű értágító anyagot EDRF-nek (endotélium **der**ived **relaxing factor**) nevezték el [Furchgott és Zawadzki 1980]. Furchgott és Ignarro, 1986-ban egymástól függetlenül azonosították az EDRF-et, mely nem más, mint a rövid életű, kis molekulású, erősen lipidoldékony nitrogén-monoxid (NO). A NO által közvetített vazodilatáció az endoteliális NO szintetáz (eNOS) aktivációjával kezdődik (3. ábra). Ennek hatására L-argininből molekuláris oxigén felhasználásával L-citrullin és nitrogén oxid (NO) képződik [Palmer és *mtsai* 1988]. A NO ezután az endotélium alatt elhelyezkedő vaszkuláris simaizomsejtbe diffundálva aktiválja a szolubilis guanilát ciklázt, amely cGMP keletkezését katalizálja. Az így létrejött cGMP a vaszkuláris simaizomsejtekben döntően a cGMP dependens protein kináz I-t aktiválja (PKG I), amely két fő útvonalon keresztül vezet az intracelluláris Ca^{2+} szint csökkenéséhez. Egyrészt a PKGI a nagy konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált K^{+} csatornák (BK_{Ca} az egységesített nomenklatura szerint $\text{K}_{\text{Ca1.1}}$, www.guidetopharmacology.org) foszforilálásával növeli azok nyitási valószínűségét, ami a sejtmembrán hiperpolarizációjához, és ezen keresztül a feszültség kapuzott Ca^{2+} csatornák aktivitásának csökkenéséhez vezet. Emellett a PKGI-dependens szarko-endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) reguláció fokozza a Ca^{2+} visszavételezését az endoplazmatikus retikulum raktárba, ami szintén a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció csökkenéséhez vezet. A fentiek ill. a kontraktilis fehérjék PKGI-függő Ca^{2+} iránti érzékenysége csökkenése a simaizomsejt relaxációjához vezet. A NO azonban PKGI-től függetlenül is hat a SERCA-ra és a plazmamembrán K^{+} csatornáira (BK_{Ca} , K_{V} , K_{ATP} , K_{IR}), ezáltal is segítve a simaizom elernyedését [Hofmann és *mtsai* 2006].

A NO univerzális szerepét szerteágazó irodalom igazolta. Az endotéliumhoz köthető eNOS mellett megkülönböztetik a kóros állapotok (pl. szepszis) során képződő indukálható NO szintetázt (iNOS), és a döntően a neuronok tevékenységéhez köthető, idegi eredetű NO szintetázt (nNOS). A folyamat komplexitására utal, hogy mindhárom forma jelen lehet bármely szövetben, és az egyik alcsoport hiányzó működését a többi kompenzálhatja. Genetikailag módosított, iNOS hiányos egerekben hiányzik a szepsziszre adott hipotóniás válaszreakció [Gross és *mtsai* 1996]. Ha mindhárom NOS izomer hiányzik génmódosított egerekben, súlyos, korai generalizált atherosclerosis fejlődik ki,

spontán szívinfarktus és hirtelen szívhalál is megfigyelhető [Nakata és *mtsai* 2008]. Az értónus fenntartásában azonban döntő szerepe az eNOS-nak van.

NO keletkezhet azonban a NOS rendszer részvétele nélkül is (3. ábra). Hipoxiás körülmények között a hem-fehérjék NO-t képeznek a környezetükben lévő nitrtekből, melyeknek hatására értágulat jön létre [van Faassen és *mtsai* 2009]. Mindemellett a xantinoxidáz a citokróm P450 monooxygenáz, a citokróm C is képes nitrit redukálásként NO szintézisre. A NO ugyan szabadgyökként rövid élettartammal rendelkezik, de bebizonyosodott, hogy képes a sejtekben raktározódni és hosszabb hatást kifejteni. A NO azonban nem csak az értónus szabályozásában fontos mediator. Az elmúlt évek kutatásai bebizonyították szerepét a trombocita aggregáció gátlásában, így a vérrögképződés megelőzésében, a makrofág és monocita adhézio gátlásán keresztül a gyulladásos válaszreakció csökkentésében, az érfali simaizomsejtek növekedésében és migrációjában [Caballero 2003]. Ez rávilágít, hogy az értónus szabályozása mellett a NO szerepe döntő a kardiovaszkuláris homeosztázis biztosításában. Termelődésének csökkenése, vagy funkcionális károsodása az endotélium diszfunkció során kimutatható, így központi szerepe a kardiovaszkuláris megbetegedések mindegyikében nyomon követhető [Donato és *mtsai* 2015].



3. ábra. A NO bioszintézise és hatása a vaszkuláris simaizomsejtre. A NO szintézise L-argininből, a feltüntetett kofaktorok segítségével az endoteliális nitrogén-oxid szintetáz (eNOS) rendszer által, valamint a NOS-tól függetlenül is bekövetkezhet. A NO egy reaktív szabadgyök, mely szuperoxid anionnal ($\bullet O_2^-$) reagálva peroxynitrit ($OONO^-$) képez, vagy az oxihemoglobin által inaktiválódik, miközben nitrát (NO_3^-) és methemoglobin képződik. A NO-ból is képződhet nitrit (NO_2^-), akár oxidizáció révén, akár enzimatis úton ceruloplazmin által. Fordítva, a hem- fehérjék, a xantin-oxidáz (XO), a citokróm P450 monooxygenáz (P450), a citokróm C (Cyt C) és az eNOS is fellephet reduktázként és létrehozhat NO-t. A NO célpontjai a simaizomsejtben: aktiválja a szolubilis guanilát ciklázt (sGC), amely cGMP keletkezését katalizálja. Ez döntően a cGMP dependens protein kináz I-t aktiválja (PKGI), amely két fő útvonalon keresztül vezet az intracelluláris Ca^{2+} szint csökkenéséhez. Egyrészt a PKGI a nagy konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák foszforilálásával növeli azok nyitási valószínűségét. Emellett a PKGI-dependens szarko-endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) reguláció fokozza a Ca^{2+} visszavételezését az endoplazmatikus retikulum raktárba, ami szintén a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció csökkenéséhez vezet. A fentiek ill. a kontraktilis fehérjék PKGI-függő Ca^{2+} iránti érzékenység-csökkenése a simaizomsejt relaxációjához vezet. A NO azonban PKGI-től függetlenül is hat a SERCA-ra és a plazmamembrán K^+ csatornáira, ezáltal is segítve a simaizom elernyedését.

2.1.2 Az EDHF szerepe az értónus szabályozásában

2.1.2.1 EDHF: A fogalom fejlődése az elmúlt évtizedekben

Az endotélium és az alatta fekvő simaizomsejt kölcsönhatását kutatók számára korán bebizonyosodott, hogy a NO és prosztaciklin útvonalak gátlása után is megfigyelhető a vaszkuláris simaizomsejtek endotéliumtól-függő hiperpolarizációja [De Mey és mtsai 1982]. Ezt a hatást akkor még egy azonosításra váró, az érhártya által kibocsátott faktornak tulajdonították, melyet ezért endotélium eredetű hiperpolarizáló faktornak (endothel derived hyperpolarizing factor- EDHF) neveztek el. A név először 1987-ben hangzott el egy Melbourne-ben rendezett konferencián. Chen és munkacsoportja demonstrálták első alkalommal, hogy a hiperpolarizációt a simaizomsejtek K^+ csatornáinak megnyílása okozza [Chen és mtsai 1988].

A következő jelentős előrelépés a kutatásokban 1994-ben következett be. Ekkor Waldron és Garland azt feltételezték, hogy a BK_{Ca} (nagy konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák, egységesített nomenklatúra szerint $K_{Ca1.1}$) és a SK_{Ca} (kis konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák, az egységesített nomenklatúra szerint $K_{Ca2.x}$) együttes jelenléte szükséges a simaizomsejteken az EDHF által mediált hiperpolarizáló hatás kiváltásához [Waldron és Garland 1994]. Ekkor még nem volt ismert, hogy a charybdotoxin nem csak a BK_{Ca} , de az IK_{Ca1} csatornákat (intermediér konduktanciájú Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák, az egységesített nomenklatúra szerint $K_{Ca3.1}$) is gátolni képes. 1998-ban Edwards és munkatársai írták le először, hogy a hiperpolarizációért valójában az IK_{Ca} és a SK_{Ca} csatornák a felelősek, melyek az endotélium sejten helyezkednek el, nem a miocitákon. Feltételezték, hogy a vérben keringő egyes agonisták (pl. acetilkolin, bradikinin, szubsztrát P) hatására ezek a csatornák aktiválódnak. Az „EDHF” elgondolásuk szerint valójában az endotélium sejtekből így kiáramló K^+ lehet, mely a mioendoteliális rés K^+ koncentrációjának emelése révén a simaizomsejteken található Na^+/K^+ -ATP-áz és a befelé egyenirányító K^+ csatorna (K_{IR}) aktiválásával az alatta fekvő simaizomsejteket hiperpolarizálja [Edwards és mtsai 1998].

Ezt követően további intenzív kutatások folytak különböző állatmodelleken. Ezek eredményeként általánosságban elmondhatjuk, hogy a fajtól, az értípustól és az alkalmazott stimulustól függően számos endotéliumból felszabaduló faktor képes az „EDHF” hatás kiváltására, (NO, K^+ , H_2O_2 és más reaktív oxigén molekulák, az arachidonsav lebomlási termékei pl. prosztaciklin, epoxieikozatrién sav, lipoxigenáz

metabolitok, stb, ld. 2. ábra) [Busse és mtsai 2002, Feletou és Vanhoutte 2006, Fleming 2004].

Az így szerzett ismeretek birtokában, az utóbbi években már nem korszerű az EDHF elnevezés használata. Helyette a nem-NO nem-PGI₂ elnevezést javasolják, illetve a már azonosított mediátorok név szerinti alkalmazását preferálják [Feletou és Vanhoutte 2006]. Az elmúlt évtizedek hagyományai azonban még tovább élnek, az EDHF elnevezés változatlanul használatban van, természetesen ma már gyűjtőfogalomként.

2.1.2.2 Az EDHF hatás útvonalai. A K⁺ csatornák különböző típusainak jelentősége az EDHF válaszreakciókban

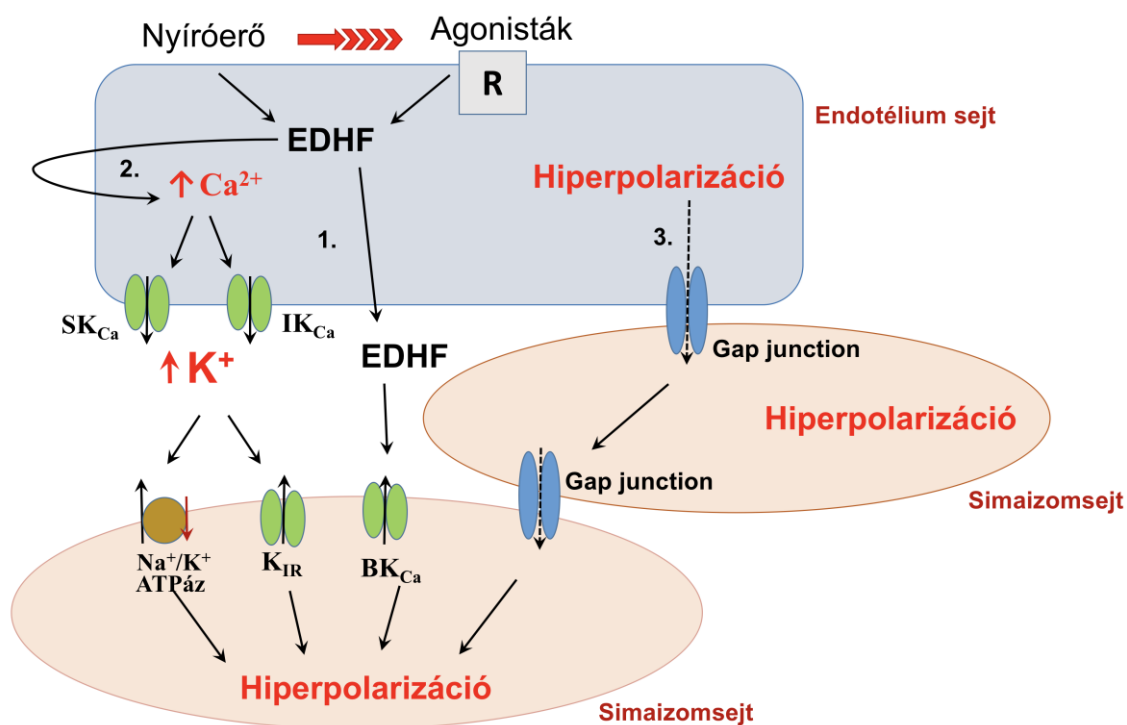
Bár az EDHF hatásmechanizmusa még ma sem egyértelműen tisztázott, a kutatások révén az EDHF hatásának három alapvető útvonala körvonalazódik (4. ábra) [Bellien és mtsai 2008]

Az agonista (acetilkolin, bradikinin vagy szubsztrát P) kötődése az endotélium sejthez, valamint az érfalra ható nyíróerő fokozódása váltja ki az EDHF termelődését. A simaizomsejt hiperpolarizációja ezután három lehetséges mechanizmus révén valósulhat meg:

1./ Az EDHF passzívan kidiffundál az endotélium sejtéből, majd a simaizomsejt felszínén lévő BK_{Ca} csatornákat aktiválja. Ez a következményes K⁺ kiáramlás révén az izomsejt hiperpolarizációjához vezet.

2./ Az ún. klasszikus útvonal, melynek során az EDHF hatására az endotélium sejt intracelluláris Ca²⁺ koncentrációja megemelkedik, és az IK_{Ca} és a SK_{Ca} csatornák aktivációja révén az endotélium sejt hiperpolarizálódik. Az így kiáramló K⁺ a mioendoteliális résen áthaladva az alatta elhelyezkedő simaizomsejt felszínén található K_{IR} csatornák aktivációja révén további K⁺ kiáramlást hoz létre. Az így kialakuló hiperpolarizációhoz hozzájárul a Na⁺/K⁺ ATP-áz aktivitásának fokozása, és a pumpa elektrogén természetéből következő hiperpolarizáció (3Na⁺ ki, 2K⁺ be, nettó + töltés vesztes) telítése. A folyamat következtében a simaizomsejt hiperpolarizálódik.

3./ A harmadik útvonal során a 2. pontban létrejött endotélium hiperpolarizáció a mioendoteliális gap junction-ok révén közvetlenül, elektromosan tevődik át az izomsejtre, kiváltva annak hiperpolarizációját.



4. ábra. Az EDHF által közvetített hiperpolarizáció fő útvonalai. Az EDHF termelődését az agonisták (pl. acetilkolin, bradikinin, szubsztrát P) receptorhoz kötődése és az érfalra ható erősödő nyíróerő váltja ki. Ezután három fő útvonalon keresztül hiperpolarizálódhat a vaszkuláris simaizomsejt: 1.: az EDHF passzív diffúzióval jut az endotélium sejtéből a simaizomsejt felszínéhez, ahol a nagy konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (BK_{Ca}) aktiválásával K^+ lép ki a sejtéből, mely a simaizomsejt hiperpolarizációját okozza, 2.: az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése az EDHF autokrin hatására a közepes konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (IK_{Ca}), és az alacsony konduktanciájú Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna (SK_{Ca}) csatornák aktivációját okozza, következményes K^+ kiáramlással és az endotélium sejt hiperpolarizációjával, A mioendoteliális részen felszaporodó K^+ működésbe hozza a simaizomsejt felszínén található befelé egyenirányító K^+ csatorna (K_{IR}) csatornákat, ezzel további K^+ kiáramlást hoz létre. Az így kialakuló simaizomsejt hiperpolarizációhoz hozzájárul a Na^+/K^+ ATP-áz aktivitásának fokozódása is. 3.: a 2. pontban létrejött endotélium sejt hiperpolarizáció a mioendoteliális gap junction-ok révén közvetlenül, elektromosan tevődik át az izomsejtre, kiváltva annak hiperpolarizációját.

Bármely mechanizmussal jön létre a simaizomsejt hiperpolarizációja, ez a feszültség kapuzott Ca^{2+} csatornák nyitási valószínűségének csökkentése révén a citoszolikus Ca^{2+} szintet csökkenti és a simaizomsejt elernyedését váltja ki.

Bár az EDHF-hez köthető relaxáció minden faj minden értípusában fellelhető, Nagao és munkacsoportja kimutatta, hogy szerepe és jelentősége növekszik az érátmérő csökkenésével [Nagao és mtsai 1992].

2.1.3 Az érfal relaxáció és az extracelluláris K^+ koncentráció összefüggése. A K_{IR} csatornák jelentősége

A vaszkuláris simaizom (VSM) tónusát számos celluláris szintű mechanizmus befolyásolja, melyek közül a membránpotenciál szabályozása kiemelkedő szerepet tölt be. A VSM membránpotenciálját alapvetően a K^+ csatornák szabályozzák [Nelson és Quayle 1995].

Az extracelluláris K^+ lokális emelkedése vazodilatációhoz vezethet, ezáltal fokozza a helyi vérátáramlást és az oxigén leadást a szövetek felé [Armstrong és mtsai 2007]. Az extracelluláris K^+ lokális emelkedését a fokozott izommunka [Wilson és mtsai 1994], az idegrendszerben a neuronok aktivitása [Chrissobolis és Sobey 2003, Paulson és Newman 1987] egyaránt kiválthatja. 1998-ban Edwards és munkatársai új mechanizmusát közölték a helyi K^+ emelkedésnek. Mint fentebb már részleteztem, az endotélium sejtekből agonisták (itt acetilkolin) hatására K^+ szabadul fel és jut a mioendoteliális résbe, ezzel bizonyítva, hogy a K^+ maga is egy endotélium eredetű hiperpolarizáló faktor [Edwards és mtsai 1998].

A befelé egyenirányító K csatornák (K_{IR}) az ioncsatornáknak egy nagy családját alkotják, melybe funkcionális felosztásuk szerint beletartoznak a klasszikus K_{IR} csatornák ($\text{K}_{\text{IR}2.\text{x}}$), a G-protein-kapuzott K_{IR} csatornák ($\text{K}_{\text{IR}3.\text{x}}$), a K_{ATP} csatornák ($\text{K}_{\text{IR}6.\text{x}}/\text{SURx}$), és az egyéb K_{IR} csatornák ($\text{K}_{\text{IR}1.1}$, $\text{K}_{\text{IR}4.\text{x}}$, $\text{K}_{\text{IR}5.\text{x}}$, $\text{K}_{\text{IR}7.\text{x}}$).

A K_{IR} csatornák elnevezése a klasszikus élettani-biofizikai kísérletekből adódik, ahol azt mutatták ki, hogy a csatornákon befelé folyó áram nagyobb, mint a kifelé folyó áram. Ez az elnevezés azonban félrevezető, ugyanis élettani szempontból legjelentősebb az a kifelé folyó K^+ áram, ami a K^+ egyensúlyi potenciáljától pozitívabb membránpotenciálokon

folymat át a csatornán. A K_{IR} csatorna ezen tulajdonsága felelős a disszertáció szempontjából egyik nagyon lényeges paradox hatás magyarázatáért. Régóta ismert, hogy az extracelluláris K^+ koncentráció kismértékű emelkedése a várakozásoktól eltérően nem VSM depolarizációt és érösszehúzódot, hanem hiperpolarizációt és ezáltal elernyedést okoz egyes erekben. Ennek egyik kulcsa az, hogy az extracelluláris K^+ koncentráció növelése fokozza a K_{IR} csatornák vezetőképességét, a másik kulcsa pedig az, hogy a VSM sejtek nyugalmi potenciálja a K^+ egyensúlyi potenciáltól jóval pozitívabb ($E_m \sim -45$ mV) [Knot és Nelson 1998]. Emiatt, ha a K_{IR} vezetőképesség jelentősen növekszik az E_m hiperpolarizáció irányába változik annak ellenére is, hogy a K^+ koncentráció növelése miatt az ion egyensúlyi potenciál pozitívabb irányba tolódik el (vö. Goldman-Hodgkin-Katz egyenlet, a nyugalmi potenciál K^+ permeabilitás és K^+ koncentráció függése) [Hibino és mtsai 2010]. A VSM hiperpolarizációja az izomsejtek elernyedéséhez és vazodilatációhoz vezet, ugyanis hiperpolarizált membrán mellett bezáródnak azok a feszültség-kapuzott Ca^{2+} csatornák, amelyek a izom összehúzódotásáért felelősek.

2.2 Egyes anesztetikumok hatása a mikrocirkulációra

Az *in vivo* körülmények között végzett kísérletek mindegyikét valamilyen anesztetikum alkalmazása mellett valósítják meg. Ez azonban óhatatlanul felveti a kérdést: lehet-e befolyásoló szerepük a különböző anesztetikumoknak a kísérleti modellre? Jelen esetben, arra kerestük a választ, hogy befolyással lehet-e az anesztetikum választás a mikrocirkulációra, a rezisztencia erek működésére?

Különböző anesztetikumokat a XIX. század közepe óta használnak műtéti érzéstelenítésre. Az újabb intravénás és inhalációs ágensek biztonságos használata a műtéti technikák robbanásszerű fejlődését eredményezte. Azonban az anesztetikumok molekuláris szintű hatásmechanizmusáról még keveset tudunk. A rendelkezésre álló kísérletes adatok szórványosak, gyakran ellentmondásosak. Különösen igaz ez az *in vivo* nyert ismeretekre.

Alaputatások bizonyították, hogy egyes általános- és helyi érzéstelenítő szerek markánsan befolyásolják az endotélium sejtek működését aerob és iszkémia-reperfúziós körülmények között [de Klaver és mtsai 2003, Julier és mtsai 2003]. Ezért, az anesztetikumok kardiovaszkuláris hatásainak kutatása során az endotélium a figyelem középpontjába került.

2.2.1 *A halogénezett anesztetikumok hatása az endotélium-függő vazodilatációra*

A jelenleg használt volatilis anesztetikumok csökkentik a vaszkuláris rezisztenciát, de a hatásmechanizmus még nem egyértelműen tisztázott [Akata 2007]. A kísérletek nem igazolták azt a korábbi hipotézist, mely szerint az anesztetikumok hatására az endotélium sejtek NO kibocsátása fokozódna [Blaise és mtsai 1997]. Ugyanakkor izolált aorta gyűrűn az agonisták által kiváltott endotélium-függő relaxáció gátlását figyelték meg halogénezett inhalációs anesztetikumok jelenlétében [Kirstetter és mtsai 1997, Uggeri és mtsai 1992]. Ezen ismeretek birtokában a ma körvonalazódó koncepció szerint a volatilis anesztetikumok gátolják ugyan az endotélium-függő vazodilatációt, ugyanakkor fokozzák az endotéliumtól-független vaszkuláris simaizom relaxációt. Ennek feltételezett útja az intracelluláris Ca^{2+} elérhetőségének és a kontraktilis fehérjék Ca^{2+} -szenzitivitásának csökkentése [Akata 2007, Villeneuve és mtsai 1991]. Ez a két, egymást kiegészítő hatás összességében az értónus elvesztését eredményezheti.

Érdekes módon az izofluránról az bizonyosodott be, hogy bár egyes erekben, pl. izolált sertés koronária mikroerekben, a kiváltott vazodilatációért döntően endotélium-függő mechanizmus felelős, abban a simaizomsejteken található ATP szenzitív K^+ csatorna aktivációja is szerepet kaphat [Gamperl és mtsai 2002]. Johns és munkatársai kísérletükben ugyanakkor azt bizonyították, hogy bár a halotán és az izoflurán nem voltak hatással a tenyésztett VSM sejtek cGMP termelésére, azonban endotélium sejtek jelenlétében a cGMP képződés NO-dependens gátlása alakult ki [Johns és mtsai 1995]. Mindezek mellett az EDHF által közvetített válaszok gátlását is megfigyelték volatilis anesztetikumok jelenlétében [Iranami és mtsai 1997]. A leírt hatásokért, legalábbis részben, az inhalációs ágenseknek közvetlenül az endotélium sejtek K^+ csatornáira és/vagy a gap junction-okra gyakorolt hatását teszik felelőssé [Beny és Pacicca 1994, Namba és mtsai 2000]. A fent leírt kutatások többsége mégis inkább az endotélium-függő vazodilatáció halogénezett inhalációs anesztetikumok okozta gátlását támasztja alá [Aguirre és mtsai 2016].

A halogénezett inhalációs anesztetikumoknak számos egyéb tulajdonságát bizonyították az elmúlt években: markáns antiinflammációs hatásuk van, és védik az endotéliumot az iszkémia-reperfúziós károsodástól. Figyelemre méltó, hogy utóbbi hatásuk tartós, az expozíció idejét messze meghaladó.

Újabb kutatások egyes halogénezett anesztetikumok (szevoflurán) szerepét mutatták ki bizonyos endotélium eredetű progenitor sejtek fokozott proliferációjában is. Negatívum, hogy ezeknek az endotélium eredetű tumorsejteknek a fokozott növekedésével azok metasztázis képző hajlamát is fokozhatják [Enlund és mtsai 2014].

Az inhalációs anesztetikumok normál körülmények között nem befolyásolják az erek permeabilitását. Azonban egyes traumás körülmények hatására az izoflurán és dezflurán alkalmazását követően a tüdő és agyi erek permeabilitásának fokozódását figyelték meg [Hu és mtsai 2006, Thal és mtsai 2012].

A fenti jelenségek *in vivo*, a klinikai gyakorlatban betöltött szerepének tisztázásához még további vizsgálatok szükségesek.

2.2.2 Egyéb anesztetikus ágesek hatása az értónusra

A kísérleteinkben alkalmazott egyéb anesztetikumok (ketamin, pento-barbitál) valószínűleg szintén befolyásolják az értónust, bár ebben az endotélium szerepe még ma sem tisztázott. A ketamin fokozza az erek tónusát, melyet elsősorban katekolamin felszabadítás révén ér el, bár *in vitro* körülmények között endotélium-függő vazodilatáció gátlást is kimutattak (a NO és EDHF mechanizmusok gyengítése révén) [Ogawa és mtsai 2001]. A ketamin hatása elsősorban az R(-) sztereoizomernek tulajdonítható.

2.3 A levosimendan és metabolitjának (OR-1896) vazoaktív tulajdonságai *in vivo*

A Ca^{2+} -érzékenyítő pozitív inotróp hatású levosimendant a dekompenzált szívelégtelenség kezelésére fejlesztették ki. Klinikai alkalmazásának másfél évtizede alatt számos tapasztalat gyűlt össze. Az adrenerg receptorokon ható inotróp szerekkel szemben a levosimendan úgy fejti ki pozitív inotróp hatását, hogy ez nem jár fokozott oxigén felhasználással. Egyidejűleg a perifériás ereken (artériák és vénák) erőteljes vazodilatációt okoz (inodilátor). Mivel hatása a béta-adrenerg receptoroktól független, béta-blokkoló kezelés mellett is alkalmazható. Mindezen tulajdonságai alapján az Európai Kardiológiai Társaság indokoltnak tartja a szer alkalmazását súlyos krónikus szívelégtelenség akut dekompenzációja esetén [Swedberg és mtsai 2005]. A korai tanulmányok megerősítették a levosimendan terápia kedvező hatását mind a dekompenzált szívelégtelenség kezelésében (LIDO) [Follath és mtsai 2002], mind az akut miokardiális infarktust követő szívelégtelenség mérséklésében (RUSSLAN)

[Moiseyev és mtsai 2002], az elvárt eredményeket azonban a kritikus állapotú betegek csoportjában végzett nagy nemzetközi tanulmányok nem tudták egyértelműen igazolni (SURVIVE [Mebazaa és mtsai 2007] és REVIVE [Packer és mtsai 2013]). Bár számos meta-analízis mutatott a levosimendan terápia hatására szignifikáns mortalitás csökkenést [Belletti és mtsai 2015, Landoni és mtsai 2012], ugyanakkor további klinikai hatástanulmányok szükségesek a biztonságosság és klinikai hatásosság bizonyítására kritikus állapotú betegek esetében [Pierrakos és mtsai 2014].

Ahhoz, hogy a levosimendan a klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazhatóvá váljon, elengedhetetlen a hatásmechanizmusának részletes ismerete *in vitro* és *in vivo*. Ennek felderítése céljából intenzív kutatómunka indult az elmúlt évtizedekben, melynek eredményeként ma már széles körű ismeretekkel rendelkezünk a levosimendan celluláris szintű kardiovaszkuláris hatásairól. Ma már tudjuk, hogy a levosimendan hatása komplex, egyrészt mert a hatás fenntartásában egy hosszú féléletidejű lebomlási termék, az OR1896 (a [N-(4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-methyl-6-oxo-3-pyridazinyl)phenyl] acetamide (-) enantiomerje) is részt vesz, másrészt mivel több molekuláris célponttal is rendelkezik a kardiovaszkuláris rendszeren belül (1. táblázat).

1. táblázat. A levosimendan három fő hatásmechanizmusa

	Pozitív inotróp Hatás	Vazodilatáció	Kardioprotektív hatás
Sejt szintű célpont	szívizomsejtek	vaszkuláris simaizomsejtek	szívizomsejtek
Sejten belüli célpont	miofilamentumok	szarkolemma	mitokondrium
Molekuláris célpont	Troponin C molekula kalciummal telített formája	ATP-szenzitív K ⁺ csatornák	ATP-szenzitív K ⁺ csatornák
Molekuláris mechanizmus	Ca ²⁺ -érzékenyítés	Hiperpolarizáció	Mitokondrium védelme iszkémia-reperfúzió során

Ezzel az összetett hatással magyarázható az a tény, hogy a levosimendan pozitív inotróp hatása mellett erélyes vazodilatátor és kardioprotektív szerepet is betölt [Papp és mtsai 2012].

A levosimendan egy Ca²⁺-érzékenyítő molekula, mely pozitív inotróp hatását főleg a szívizomsejtek vékony filamentumaiban található, Ca²⁺ érzékeny troponin C molekuláihoz (cTnC) való kötődéssel éri el. Ezzel egyidejűleg azonban erőteljes

perifériás értágulatot is létrehoz, mind az artériás mind a vénás oldalon, beleértve a szív koszorúereit is [Michaels és mtsai 2005]. Korábbi, izolált patkány vázizom- és koronária ereken végzett tanulmányok igazolták, hogy a rövid életidejű levosimendan hosszú távú kardiovaszkuláris hatásaiért az OR-1896 nevű metabolitja felelős [Erdei és mtsai 2006].

Az értágulat kialakításában a K_{ATP} csatornák játszanak kulcsszerepet, bár más K^+ csatornák is részt vehetnek a vazodilatáció létrejöttében (pl. BK_{Ca} és/vagy feszültségfüggő K^+ csatornák) [Erdei és mtsai 2006, Hohn és mtsai 2004, Kaheinen és mtsai 2001, Pataricza és mtsai 2000, Pataricza és mtsai 2003]. A különböző K^+ csatornák szerepe a levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban az *in vitro* vizsgált nagy átmérőjű érpreparátumokon nagymértékben függött az adott ér típusától, méretétől, illetve attól is, hogy milyen fajból származott. Példaként említhető, hogy a sertés és patkány epicardiális koszorúerből nyert preparátumban döntően a feszültségfüggő és BK_{Ca} csatornák játszottak szerepet a levosimendan és OR-1896 által közvetített értágulatban [Erdei és mtsai 2006, Pataricza és mtsai 2003]. Ezzel ellentétben a tengerimalac koszorúeréből [Kaheinen és mtsai 2001], a humán véna saphenából [Hohn és mtsai 2004], a macska pulmonális rendszeréből [De Witt és mtsai 2002], vagy a patkány vázizomból [Erdei és mtsai 2006] előállított preparátumokon ugyanezen vegyületek a K_{ATP} csatornák aktiválása révén okoztak vazodilatációt.

Szemben az irodalomban fellelhető, viszonylag gazdag *in vitro* szerzett ismeretanyaggal, az *in vivo* kísérletes eredmények igen szegényesek. Banfor és Segreti az élő patkányok levosimendannal vagy OR-1896-al való infundálását követő hemodinamikai paraméter változások alapján feltételezték, hogy a szisztémás vaszkuláris rezisztenciában bekövetkezett erőlyes csökkenés döntően a rezisztencia erek szintjén bekövetkező vazodilatáció következménye lehet [Banfor és mtsai 2008, Segreti és mtsai 2008]. Azonban ezt *in vivo* körülmények között korábban még senki sem bizonyította.

Jelen kísérletes munkánkban ezért arra törekedtünk, hogy a levosimendan és az OR-1896 mikrocirkulációban betöltött szerepét jellemezzük *in vivo* kísérletes körülmények között. Ehhez a patkány cremaster izmának negyedrendű arterioláit (átmérő kb. 20 μm) vizsgáltuk *in vivo* videomikroszkópiával. A növekvő koncentrációban topikusan alkalmazott levosimendan és OR-1896 hatására létrejövő érátmérő változásokat összehasonlítottuk a két szer esetében. Mivel korábbi *in vitro* kísérletek a patkány

vázizomzatban a K_{ATP} csatornák szerepét igazolták a létrejövő érválaszban [Erdei és mtsai 2006], így kísérleteink egy részében ezeket a csatornákat előzetesen blokkoltuk.

2.4 A cremaster preparátum humán mikrocirkuláció relevanciája

In vivo mikrocirkulációs kísérleteket terveztünk, ezért olyan preparátumot választottunk, ahol a preparátum vékony, jól vaszkularizált és intakt ér-idegellátás mellett mikroszkóp alatt a hosszú, 5-6 órás kísérletek során jól vizsgálható. Erre az irodalmi adatok szerint egér, patkány cremaster izmot, hörcsög pofaizmot használnak. Ma már elérhető humán mikrocirkulációs vizsgálati technika is sublinguális mikroszkópos kamera segítségével [Massey és Shapiro 2016]. Ennek segítségével meghatározták a human mikrocirkulációban résztvevő erek méretét is. Az általunk a kísérletek során használt 20-30 μm -es erek a közepes méretű erek kategóriájába tartoznak (prekapilláris arteriolák és posztkapilláris vénák, 20-50 μm). A preparátumon vizsgált erek méretüket tekintve megfelelő analógiát jelentettek a human mikrocirkuláció hasonló méretű arterioláival. Természetesen a funkcionális különbségeket, melyek az eltérő faj, illetve az eltérő szövet (vázizom ill. sublinguális mucosa) okozta, nem volt módunkban vizsgálni, így eredményeink csak fokozott óvatosság mellett általánosíthatók. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a bradikinin a disszertációban használt koncentráció tartományban (10^{-10} - 10^{-6} M-ig) értágulatot okoz human arteriolákban (pl. [Feng és mtsai 2017] és [Honing és mtsai 2000]). Ugyanez igaz acetilkolinra is (pl. [Kellogg és mtsai 2005] és [Wilson és mtsai 2016]). Ebből a szempontból tehát relevánsak lehetnek a patkány cremaster izom erezetén végzett kísérletek. Természetesen az ioncsatorna és receptor összetétel különböző lehet az egyes fajokban.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. *Célunk volt a K_{IR} csatornák szerepének feltérképezése patkányok cremaster izmának rezisztencia arterioláiban in vivo.* A patkány cremaster izom preparátumot széles körben alkalmazzák in vivo mikrocirkulációs vizsgálatokhoz. Nem volt még ismert a kísérletek elvégzésének időpontjában, hogy a mérsékelt külső K^+ koncentráció emelkedés milyen mechanizmussal okoz vazodilatációt a preparátum rezisztencia ereiben. Kísérleteink során feltételeztük, hogy a folyamatban a befelé egyenirányító kálium csatornák (K_{IR}) szerepet játszhatnak, azonban a csatornák jelenlétét addig senki sem igazolta a preparátumon, in vivo. Célunk ezért az volt, hogy a K_{IR} csatorna specifikus gátlásával bizonyítsuk ezen csatornák szerepét a mérsékelt K^+ koncentráció emelkedés által kiváltott vazodilatációban a patkány cremaster izom rezisztencia arterioláiban in vivo.

2. *Vizsgálni kívántuk azt a feltételezést, miszerint különböző anesztetikus ágensek eltérő módon befolyásolják a mikrocirkulációt a fenti állatkísérletes modellben.* Az in vivo kísérletek elvégzéséhez a kísérleti állatok altatása szükséges. Ezért lehet fontos annak tisztázása, hogy lehet-e az anesztetikus ágens megválasztásának (izoflurán, halotán, ketamin) befolyásoló szerepe a mikrocirkulációra a kísérletes modellekben. Feltételezésünk szerint a különböző anesztetikumok eltérő módon befolyásolhatják a NO és EDHF útvonalakat az agonisták (acetilkolin, bradikinin) által kiváltott endotélium-függő vazodilatációban. Célul tűztük ki ezen hipotézis kísérletes igazolását patkány cremaster izom preparátumon in vivo.

3. *Karakterizálni kívántuk a levosimendan és az OR-1896 mikrocirkulációra kifejtett hatását a patkány cremaster izmán in vivo, bizonyítva ezzel ezen ágensek vazodilatatív hatását.* Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a Ca^{2+} -érzékenyítő levosimendan és az OR-1896 nevű hosszú hatású metabolitja a rezisztenciaereknél nagyobb átmérővel rendelkező ereken potens vazodilatátorok, mely reakcióban a K_{ATP} csatornák vezető szerepe körvonalazódott ex vivo. Jelen munkánkban feltételeztük, hogy ezen vazoaktív ágensek a K_{ATP} csatornák aktivációján keresztül fejtik ki hatásukat a mikrocirkulációban vezető szerepet játszó rezisztencia erekre in vivo körülmények között is. Célul tűztük ki a fenti állítás igazolását. Ezzel első alkalommal szeretnénk volna bizonyítani a levosimendan és az OR-1896 mikrocirkulációban betöltött szerepét (a patkány cremaster izom preparátumon) in vivo.

4 ANYAGOK és MÓDSZEREK

4.1 A kísérletes modell leírása

Kísérleteinkben *in vivo* szándékoztuk megfigyelni a különböző ágensek vazodilatációs hatását. Ehhez patkányokat használtuk. Az állatokat különböző anesztetikumokkal (lásd később) elaltattuk, majd a bal cremaster izmot intakt ér-idegellátás mellett átlátszó platformon terítettük szét. Az így kapott hártavékony izompreparátum kiválóan vizsgálható mikroszkóp alatt [Baez 1973]. A mikroszkóphoz csatlakoztatott videokamera segítségével a kísérlet képanyagát szalagra rögzítettük, majd később a felvételt visszajátszottuk, és az érátmérő változásokat 30 másodpercenként lemértük.

4.2 Állatok és anyagok

Állatkísérleteink során az Állatkísérletes Etikai Bizottság által jóváhagyott protokollt követtük. Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk. Súlyuk 200g-300g között változott. Az állatokat 12 órás váltakozásban megvilágított és sötét környezetben tartottuk, ezzel utánozva a természetes napszaki ritmust, miközben korlátlan mennyiségben fogyaszthattak standard szilárd táplálékot és vizet. A kísérleteket egy éjszakai éheztetést követően végeztük. Az állatokat ezután ketaminnal, halotánnal, izofluránnal vagy nátrium-pentobarbitállal altattuk el. A kísérlet végén 150mg/kg nátrium-pentobarbitállal végeztünk eutanáziát.

4.3 A patkányok anesztéziája és monitorozása

Kísérleteink első részében a K^+ koncentráció emelkedés okozta vazodilatáció hatásmechanizmusát kutattuk. Ehhez halotán anesztéziát alkalmaztunk. Az anesztézia indukciójához az állatokat egy, az adott altatógázzal átáramoltatott zárt kamrába helyeztük. A friss gáz áramlását úgy szabályoztuk, hogy a CO_2 akkumulációját megelőzzük. A narkózis beállása után az altatószer-levegő keveréket egy speciálisan kialakított orrmaszkon keresztül adagoltuk tovább az állatoknak, majd a trachea kanülálása után az altatószer intratracheális adagolására tértünk át (FiO_2 30%, halotán 1.2 térf.‰: 1 MAC)). Ehhez a patkányokat 1 mg/kg pancuronum segítségével relaxáltuk, majd gépi lélegeztetést alkalmaztunk. A carotis artéria kanülálása után a vérnyomást folyamatosan, invazív úton monitoroztuk. A PaO_2 és $PaCO_2$ élettani szintjének ellenőrzésére artériás vérgáz analízist végeztünk (~100 és ~35 Hgmm). Ezután a juguláris

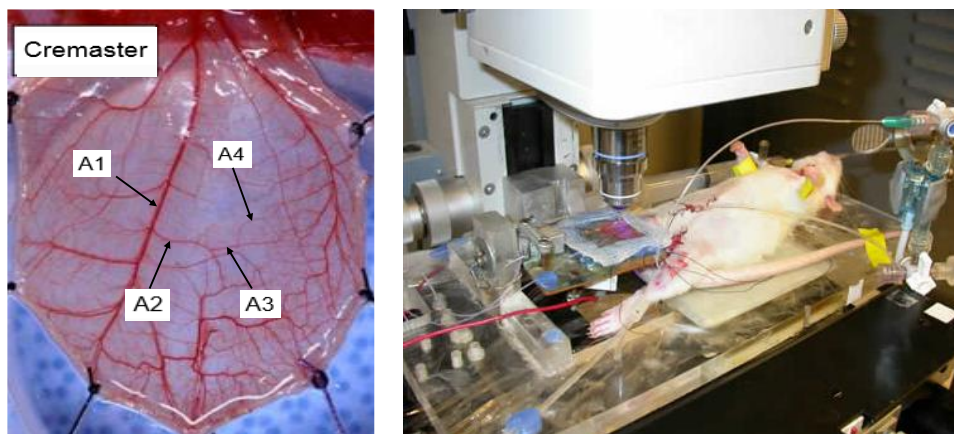
vénába vezetett kanülön át 1 ml/óra dózisban fiziológiás sóoldattal perfundáltuk az állatokat a megfelelő hidrátsági állapot fenntartása céljából. A testhőmérsékletet fűtőpad segítségével 37 °C -38 °C-között tartottuk.

Kísérleteink második részében a különböző anesztetikumok jelenlétében tanulmányoztuk a NO és az EDHF mediált vazodilatáció hatásmechanizmusát. Ezekben az állatokat ketaminnal, halotánnal vagy izofluránnal anesztetizáltuk. Az izoflurán anesztézia során az eljárás rendje azonos volt a fent részletezett halotán anesztéziánál leírtakkal. Az izoflurán fenntartó koncentrációja 1.4 térf % volt (1 MAC). A ketamin anesztézia indukciójára 150mg/kg intraperitoneálisan injektált ketamint használtunk, majd az anesztéziát a szer 1,5mg/kg/min dózisú folyamatos intravénás adagolásával tartottuk fenn. A fent említett dózisok az irodalmi adatok szerint közel azonos mélységű, közepesen mély altatást biztosítottak patkányokban [Eger és Johnson 1987].

Kísérleteink harmadik részében a levosimendan és aktív metabolitja mikrocirkulációra kifejtett hatását tanulmányoztuk. Ehhez nátrium-pentobarbitallal altattunk. 50mg/kg indukciós dózis szubkután alkalmazását követően a megfelelő mélységű anesztéziát az indukciós dózis 20%-ának 30-45 percenként szubkután ismétlésével tartottuk fenn. Ezután légútbiztosítás céljából a tracheát kanüláltuk, majd az állatokat fűtőpadra helyeztük.

4.4 A cremaster preparátum készítése

A cremaster izompreparátum elkészítéséhez mindegyik kísérletünkben azonos technikát alkalmaztunk. A bal cremaster izom feltárásához a scrotumot a középvonalban felnyitottuk, az irodalomban korábban ismertett technikának megfelelően [Baez 1973]. Az állatot háton fekvő helyzetben egy fűtött padra helyeztük, az izmot pedig, az érzéidegellátást érintetlenül hagyva egy fűtött, átlátszó platformon terítettük ki. Ezután az állatot egy mikroszkóp állványán rögzítettük, és az izomra folyamatos 2ml/perc áramlási sebességgel melegített Krebs puffer oldatot juttattunk. A Krebs puffer összetétele: 132 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄ és 2 mM CaCl₂ volt. A Krebs puffert előzetesen 95% N₂/5% CO₂ gáz keverékével áramoltattuk át. Ennek célja egyrészt az állandó pCO₂ fenntartása volt, másrészt annak biztosítása, hogy a szövetek oxigénellátása csak az érpályán keresztül mehessen végbe. Az eljárás révén a felületi O₂ tenzió hasonlóvá vált az élettani körülmények között az izomban találhatóéhoz, így



5. ábra. A cremaster preparátum. Az ábra bal oldalán a preparátum intravitális video mikroszkópos képe látható, a különböző rendű arteriolákat nyilak jelzik. Az ábra jobb oldala a kísérleti állat elhelyezését mutatja az *in vivo* videomikroszkópos rendszerben.

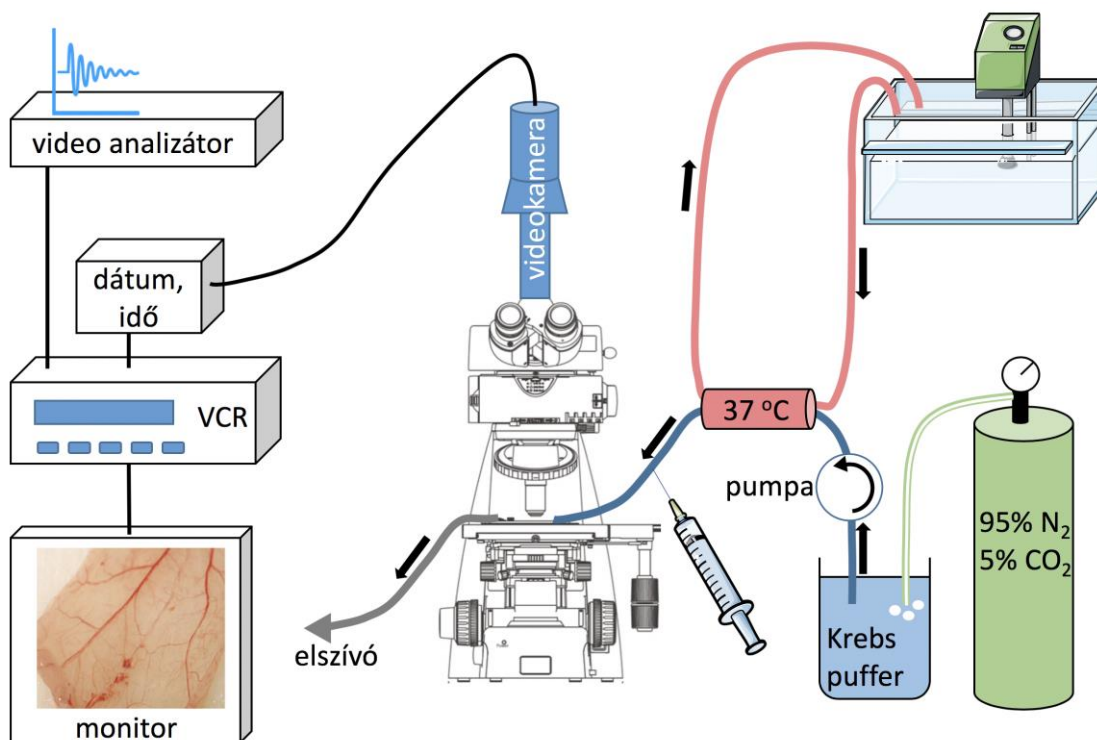
megelőzhető volt a külső levegőből származó oxigén okozta érösszehúzódnás a mikroerek szintjén [Duling 1972, Duling 1973]. A preparátum elkészítését követően min. 30 percig áramoltattuk a Krebs puffert, időt hagyva az ekvilibrium létrejöttéhez mielőtt elindítottuk a kísérleti protokollt.

A mérésekhez az artériákat oszlási rendjüknek megfelelően kategorizáltuk. A cremaster izom vérellátását egy ellátó artéria biztosítja, mely elágazódik. A fő artériát első rendű (A1), majd az ebből származó kisebb ereket a további oszlásoknak megfelelően másod- (A2), harmad- (A3) és negyedrendű érként azonosítottunk. Kísérleteinkben negyedrendű ereket (arteriolákat) használtunk (5. ábra). Ezek átmérője 20-30 μ m volt. Mivel minden oszlás után módosul egy kissé az érfal szerkezete (döntően a simaizom réteg vékonyodik), valamint a vazoaktív stimulusokra is eltérő reakciót adhatnak az oszlási fának megfelelően, [Feletou 2011], ezzel a módszerrel tudtuk megelőzni az érfal szerkezeti eltéréseiből adódó esetleges téves következtetések levonását.

4.5 Az intravitalis videomikroszkópia

Az első két kísérletsorozatban az ereket egy, a mikroszkóphoz csatlakoztatott, nagy felbontású kamera segítségével követtük (Microimage Video CA2063). A képet monitoron jelenítettük meg (Sony PVM-1343MD) és folyamatosan videószalagra rögzítettük (Panasonic AG1970). A kiértékeléshez a felvételt a monitoron visszajátszottuk és az érátmérőket egy video analízátor segítségével (Boeckeler VIA-150), minden ágens alkalmazása során, ill. azt követően 30 másodpercenként mértük.

A harmadik kísérletsorozatban Nikon Eclipse, FN1 mikroszkópot használtunk és a folyamatokat egy CCD kamera segítségével videószalagra rögzítettük. A belső érátmérőket videocaliper (mérce) segítségével analizáltuk (Colorado Instruments, USA). A 6. ábra az intravitális videomikroszkópia sematikus rajzát mutatja.



6. ábra. Az intravitális mikroszkópia vázlatos rajza. Az ábrán az *in vivo* videomikroszkópia kísérletes elrendezésének sematikus rajza látható. Főbb elemei a gázzal átbuborékolgatott Krebs puffer tartály, a pumpa, a hőcserélő, mely a folyadék hőmérsékletét 37 °C-ra állította be, mielőtt az a tárgasztalon lévő preparátumot elérte. A mikroszkóp képét videokamera segítségével analóg mágnesszalagon rögzítettük pontos időjelekkel együtt. A tárolt adatokat off-line video analízátorral értékeltük ki. A fecskendő a vazoaktív ágensek adagolásának módját szemlélteti.

4.6 Az agonisták által kiváltott válaszreakciók jellemzése

Preparátumunként egy eret választottunk, amelyen az agonisták által kiváltott válaszreakciót a következők szerint vizsgáltuk:

A sebészeti preparálás után az izmot 30-60 percen keresztül a fent említett Krebs oldattal áramoltattuk át, az ekvilibrium elérése céljából. Az állat vitális paramétereit rögzítettük és élettani körülmények között tartottuk (folyamatos intraarteriális vérnyomásmérés, vérgáz analízis).

Ezután a kiválasztott ér reakcióképességét 100 μ M adenozin (ADO) adásával teszteltük. Az adenozin által kiváltott vazodilatáció ismereteink szerint endotéliumtól független útvonalon valósul meg, és ezt a véleményt a későbbi kutatások többsége is alátámasztotta [Sato és mtsai 2005]. Ezért ezt a reakciót kontrollként alkalmaztuk. Amelyik ér nem reagált min. 50%-os dilatációval a kezdeti érátmérőhöz képest, a későbbiekben azt nem használtuk. Az ADO-t Krebs pufferben hígítottuk a megfelelő koncentrációjúvá, és az izmot felülről mosó Krebs oldathoz adtuk egy oldalról becsatlakozó porton keresztül, 1 percen át. Az érátmérőket 30 másodpercenként lemertük. Az egyes gyógyszerek adása között 10 perc telt el. Ez elegendő időnek bizonyult ahhoz, hogy a válaszreakció végbe menjen, és az izom felvegye az egyensúlyi helyzetet. Ha több agonistát alkalmaztunk akkor az agonistának minden koncentrációját random sorrendben adtuk a mintához.

4.7 A kísérleti protokollok

4.7.1 A K_{IR} csatorna jelenlétének bizonyítása a cremaster izomban, szerepe a K^+ indukált vazodilatációban

Kísérleteink első részében a K^+ okozta vazodilatáció mechanizmusát vizsgáltuk. Ennek során az ADO válaszreakció kiváltása után az áramló Krebs puffert megnövelt K^+ koncentrációjú oldatra cseréltük. Ehhez a normál Krebs oldat NaCl tartalmának megfelelő hányadát helyettesítettük KCl-al, a kívánt K^+ koncentráció elérése céljából. A kontrollként használt, normál 5 mM mellett 10 és 60 mM K^+ koncentrációjú oldatokat használtunk. Az egyes oldatokat random sorrendben alkalmaztuk minden kísérlet során, hogy megelőzzünk bármilyen szisztematikus hiba lehetőséget, amely egy meghatározott sorrend szerinti alkalmazásból adódhatott volna. A megfigyelt ér átmérőjét 10 percen át monitoroztuk. Megfigyeléseink alapján az érátmérő 5 perc alatt felvette a végleges

méretét egy-egy új koncentrációjú oldat alkalmazását követően, így a közölt adataink a második 5 perc alatt észlelt átlagos átmérőt jelenítik meg, egy-egy adott koncentrációjú oldat esetén. Miután a vizsgálatban szereplő mindkét, megnövelt K^+ koncentrációjú oldattal elvégeztük a mérést, az izmot ismét normál (5 mM K^+) Krebs oldattal mostuk tovább, amelyhez azonban az alább részletezett K^+ csatorna gátló szerek egyikét adtuk hozzá: 1 μ M glibenclamid, 100 nM iberiotoxin (IbTX), vagy 50 μ M $BaCl_2$. Ebben a koncentrációban a fent említett ágensek az irodalmi adatok szerint rendre a K_{ATP} , a $K_{Ca1.1}$ és a K_{IR} csatornák specifikus blokkolói [Nelson és Quayle 1995]. 30 perc ekvilibrium után megismételtük a méréseinket a mérsékelt (10 mM) K^+ koncentrációjú oldat alkalmazásával, a K^+ csatorna inhibitor jelenlétében. Állatonként csak egy inhibitort alkalmaztunk. Minden állatot önmaga kontrolljaként használtunk a különböző koncentrációjú K^+ oldatok által kiváltott érválaszok vizsgálatánál, ill. az inhibitor jelenlétében és anélkül mért érválaszok összehasonlításában.

4.7.2 Egyes anesztetikumok befolyásoló szerepe a NO és az EDHF útvonalakra az agonisták által kiváltott vazodilatáció során cremaster izompreparátumban

Kísérleteink második részében arra kerestük a választ, hogy befolyással lehetnek-e az anesztetikus ágensek az agonisták által létrehozott vazodilatációra, és ha igen, ebben NO vagy EDHF típusú mechanizmusok játszanak-e döntő szerepet. Az állatok mindegyikét indometacinnal kezeltük a cremaster preparátum elkészítése után (5mg/kg, intravénásan). Ez a dózis az irodalmi adatok alapján hatékonyan gátolta a prosztaglandin szintézist patkányokban [Kaley és mtsai 1989]. Mivel a prosztaglandinok szerepe ismert volt az endotélium-függő érválaszok kiváltásában, szintézisének blokkolása elengedhetetlen volt a másik két útvonal (NO, EDHF) tanulmányozásához.

4.7.2.1 A NO szerepének vizsgálata a fenti modellben

A NO szerepének vizsgálatához minden egyes anesztetikus ágens alkalmazása esetén az állatokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoport az indometacin kezelés után NOS inhibitorként intravénás N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) terápiában részesült (3mg/kg/min, 100 mg/kg 30 perc alatt), míg a másik, kontrollként szereplő csoport ekvivalens mennyiségű intravénás fiziológiás NaCl oldatot kapott (1ml/óra). Erre azért volt szükség, mert a kísérlet időtartama meghaladta volna a preparátum általunk tapasztalt stabilitási idejét (kb. 5-6 óra), ha ugyanazon az állaton végezzük a kontroll és L-NMMA gátlás mellett a kísérleteket. Mivel ennek következtében a kontroll és teszt

állatok végül különbözőek voltak, eredményeink nélkülözik az ugyanazon az éren L-NMMA jelenlétében és anélkül létrehozott válaszreakciók összehasonlíthatóságát.

Ezután került sor az endotéliumtól függő vazodilatációt kiváltó bradikinin (BK, 1-100 nM) és acetilkolin (ACh, 10 nM-10 μ M) hatásának vizsgálatára. Az agonisták megfelelő koncentrációjú oldatát Krebs pufferben állítottuk elő és ugyanúgy juttattuk az izom felületére, mint azt korábban az ADO esetében részleteztük (ld. 4.6 fejezet). Az érátmérőket a szer adagolása előtt, közben, és utána is rögzítettük. Az agonisták alkalmazási sorrendje koncentrációt és ágenst tekintve is véletlenszerű volt. Két agonista adása között legalább 10 perc telt el, az ér átmérője minden esetben visszatért a kiindulási szintre, mire a következő szertadtuk. Az artériák átmérőjének változását a kiindulási érték százalékában fejeztük ki. A dózis-hatás görbéket az adott koncentrációjú agonisták által kiváltott válaszok átlagaként tüntettük fel. Az adenosin és az acetilkolin esetében a maximális vazodilatáció a 90. másodpercben, míg a bradikinin esetén a 120. másodpercben jött létre. A kísérleteket ketamin, halotán és izoflurán anesztézia alkalmazása során megismételtük.

4.7.2.2 Az EDHF szerepének vizsgálata

Az EDHF kísérleteink idején még azonosításra váró, olyan ismeretlen faktor volt, mely az endotélium sejtéhez kötődő agonista hatására „felszabadulva” az alatta elhelyezkedő simaizomsejt hiperpolarizációját és így relaxációját okozza. Feltételezték, hogy az extracelluláris $[K^+]$ jelentős emelése (≥ 20 mM) megszünteti vagy jelentősen csökkenti az EDHF résztvételét az agonisták által közvetített vazodilatációban [Adeagbo és Triggle 1993, Nagao és Vanhoutte 1991, Vicaux és *mtsai* 1994]. Ezek alapján kísérleteinkben a magas koncentrációjú (20 mM) K^+ oldatot az EDHF útvonal gátlása céljából használtuk.

Ebben a kísérletsorozatban az előző fejezetben leírt preparátumot használtuk. Miután a normál (5 mM) K^+ koncentrációjú puffer jelenlétében elvégeztük a fenti kísérleteket, a magas (20 mM) K^+ koncentrációjú pufferre váltottunk. Az oldat cseréje után 30 percig vártunk az új egyensúlyi helyzet kialakulására, mielőtt az első agonista hatását vizsgáltuk volna. Az agonistákat itt is random sorrend szerint alkalmaztuk, az előző fejezetben leírt módszert követve. Artériás vérgáz vizsgálataink alapján a K^+ koncentráció emelése 5 mM-ról 20 mM-ra az izom felszínét mosó pufferben nem emelte szignifikánsan a szérumban K^+ koncentrációt. 5 mM és 20 mM K^+ koncentráció esetén ennek értéke rendre $3,8 \pm 0,21$ mmol/l volt a normál puffer jelenlétében és $4,65 \pm 0,45$ mmol/l volt 3 órával a

magas $[K^+]$ oldat elindítása után ($n=4$). A puffer váltás nem okozott szisztémás vérnyomás változást.

4.7.2.3 Az NO és EDHF rendszer együttes gátlásának vizsgálata

A NO és EDHF útvonal együttes gátlásakor először intravénás L-NMMA-t alkalmaztunk az NO rendszer gátlására (30 perc ekvibráció), ezt követően került sor az ACh vagy BK hatásának az elemzésére (bradikinin (BK, 1-100 nM) és acetilkolin (ACh, 10 nM-10 μ M)), majd ezt követően 20 mM K^+ koncentrációjú módosított Krebs puffer szuperfúziójára váltottam. Újabb 30 perc ekvibrációt követően történt a magas K^+ koncentráció (20 mM) melletti ACh vagy BK koncentráció sor alkalmazása (bradikinin (BK, 1-100 nM) és acetilkolin (ACh, 10 nM-10 μ M)).

4.7.3 *A K_{ATP} csatorna szerepének kimutatása a levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban*

Kísérleteink harmadik részében a levosimendan és aktív metabolitja mikrocirkulációra kifejtett hatását tanulmányoztuk. Ehhez pentobarbital anesztéziát alkalmaztunk. A korábbiakban részletezett módon elkészült preparátumokat itt is 30 percen keresztül pihentettük, az egyensúlyi állapot elérése céljából. Ezután acetilkolin (1 μ M) és adenzin (10 μ M) izomfelszínre juttatásával teszteltük az ér reakcióképességét. Az átmérőket ebben a kísérletsorozatban abszolút értékben prezentáltuk. A kiváltott érátmérő változást folyamatosan rögzítettük, majd az eredmények értékelése során az ér maximális dilatációjakor mért értéket használtuk.

4.7.3.1 A levosimendan és az OR-1896 által kiváltott vazodilatáció vizsgálata

Kísérleteink első részében a levosimendan, és aktív metabolitja, az OR-1896 által kiváltott vazodilatációt vizsgáltuk a fenti kísérletes modellen. Ehhez a cremaster izom felszínére a korábbiakban ismertetett módon változó koncentrációjú (1 nM – 100 μ M) levosimendan oldatot vagy 1 nM – 100 μ M koncentrációjú OR-1896-ot (bólusonként 0,1 ml térfogatban) juttattunk. Az érátmérő változásokat későbbi analízis céljából rögzítettük.

4.7.3.2 A K_{ATP} csatorna szerepének bizonyítása a levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban

A második kísérlet sorozat arra irányult, hogy megvizsgáljuk, szerepet játszanak-e a K_{ATP} csatornák a levosimendan és aktív metabolitja által okozott érválaszban a fenti kísérletes modellben. Először a K_{ATP} csatornákat nyitó pinacidil különböző koncentrációjának (1 nM – 10 μ M) hatását rögzítettük, majd megismételtük a vizsgálatot a K_{ATP} csatornák szelektív gátlószerének, a glibenclamidnak a jelenlétében is (5 μ M koncentrációban a pufferhez adva 30 percen át). Ezt követően vizsgáltuk a levosimendan (1 nM – 100 μ M) vagy az OR-1896 (1 nM – 100 μ M) hatását glibenclamid nélkül és annak jelenlétében.

A levosimendant, az OR-1896-t, a pinacidilt és a glibenclamidot dimethyl-sulfoxidban (100 mM törzsoldat) oldottuk, melyet etanolban hígítottunk tovább. Az oldatokat a kísérlet napján frissen készítettük.

4.8 Anyagok

Minden vegyszert a SigmaChemical (St. Louis, MO, USA) biztosított, kivéve a következőket: a halotán és ketamin a Halocarbon Laboratories (River Edge, NJ, USA)-tól származott, az izoflurán és a pancuronium bromide a Gensia Pharmaceuticals (Irvine, CA, USA) terméke, az adenosin a Research Biochem. Inc (Natick, MA, USA) terméke volt, az indometacin, acetilkolin, és a bradikinin a Cyclops Biochemicals-tól (Salt Lake City, UT, USA) az L-NMMA a Parke Davis-tól (Morris Plains, NJ, USA). A levosimendan és az OR-1896 az Orion Pharma-tól származott (Espoo, Finland).

4.9 Adatok értékelése, statisztikai módszerek

Első kísérlet sorozatunkban az adott K^+ koncentrációjú puffer indítása utáni 5-10. perc között rögzített átlagos érátmérőket $\pm$ SEM tüntettük fel ábráinkon. Az adatokat a GraphPad Prism program segítségével mutattuk be (itt az 2.0 verzió, San Diego, CA, USA). Az emelkedő K^+ koncentráció vagy az adenosin az arteriolák átmérőjére gyakorolt hatásának statisztikai elemzést ismételt méréses varianciaanalízis (Repeated measures ANOVA) felhasználásával végeztük, a statisztikailag szignifikáns csoportokat Dunnett-próba segítségével azonosítottuk. Az ugyanazoknál az állatoknál mért kezelés előtti és utáni eredményeket önkontrollos t-próba segítségével hasonlítottuk össze. Az értékeket szignifikánsan eltérőnek tekintettük, ha a $P < 0,05$ volt.

Második kísérlet sorozatunkban az arteriolák átmérőjének változását a kiindulási érték százalékában fejeztük ki. A dózis-hatás görbéket az adott koncentrációjú agonisták által kiváltott válaszok átlagában tüntettük fel. Az ábrákon a nyert adatok átlagértékei $\pm$ SEM láthatóak, a kísérletek számának feltüntetésével egyidejűleg. A csoport-átlagok statisztikai elemzéshez Student-féle t-próbát használtuk. Ahol több mint két kezelést hasonlítottunk össze, ott variancia analízist (ANOVA) végeztünk, a statisztikailag szignifikánsan különböző csoportokat a Student-Newman-Keuls-próba (SNK) segítségével azonosítottuk. Az értékeket szignifikánsan eltérőnek tekintettük, ha a $P < 0,05$ volt.

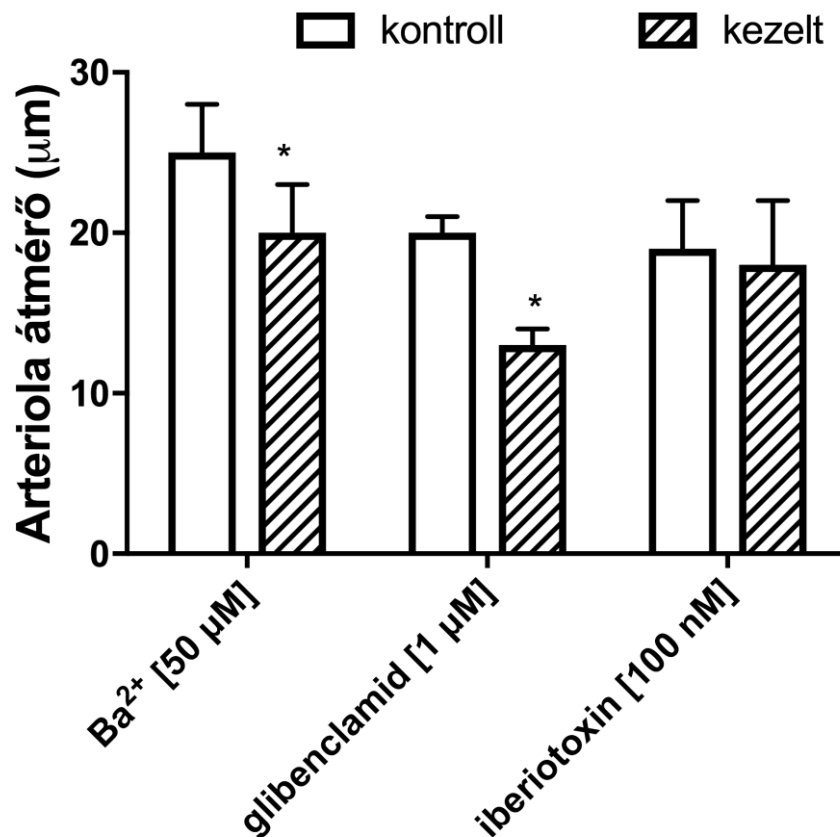
Harmadik kísérletünk során az érátmérőket abszolút értékben prezentáltuk. A kiváltott érátmérő változást folyamatosan rögzítettük. Az elemzés során a legnagyobb kiváltott választ használtuk fel. Az adatokat a korábbi kísérleteinkhez hasonlóan a GraphPad Prism program segítségével mutattuk be (itt az 5.0 verzió, San Diego, CA, USA). Az ábrákon a nyert adatok átlagértékeit $\pm$ SEM tüntettük fel. A statisztikai elemzést két faktoros ismételt méréses varianciaanalízis (two-way repeated measures ANOVA) segítségével végeztük el, melyet Bonferroni-féle post hoc próba követett. Az értékeket itt is $P < 0,05$ esetén tekintettük statisztikailag különbözőnek.

5 EREDMÉNYEK

5.1 K^+ csatornák részvétele az érátmáró szabályozásában normál extracelluláris K^+ koncentráció mellett

A kísérletek során ioncsatorna gátlók felhasználásával vizsgáltuk, hogy milyen K^+ csatornák vesznek részt az érátmáró szabályozásában normál (5 mM) extracelluláris K^+ koncentráció mellett. A normál K^+ koncentrációjú mosófolyadékhoz kísérletenként egyféle K^+ csatorna inhibitorát adtunk, a preparátumot 30 percig ekvilibráltuk a csatorna gátlószerrel. A viszonylag hosszú ekvilibrációra azért volt szükség, mert a gátlószereket nem az érpályába, hanem az izom felszínére juttattuk, így megfelelő időt kellett biztosítani ahhoz, hogy ezek eljuthassanak az izmon belül található erek endotélumjához és a vaszkuláris simaizomsejtekhez. Az inhibitor jelenlétében és anélkül mért érátmérőket a különböző K^+ koncentrációk esetén önkontrollos kísérletben hasonlítottuk össze. Kísérleteinkben az alábbi K^+ csatorna gátlószereket alkalmaztuk: 50 μ M $BaCl_2$ a K_{IR} csatornák, 1 μ M glibenclamid a K_{ATP} csatornák és 100 nM iberiotoxin a K_{Ca} csatornák (K_{Ca} 1.1) esetén [Nelson és Quayle 1995].

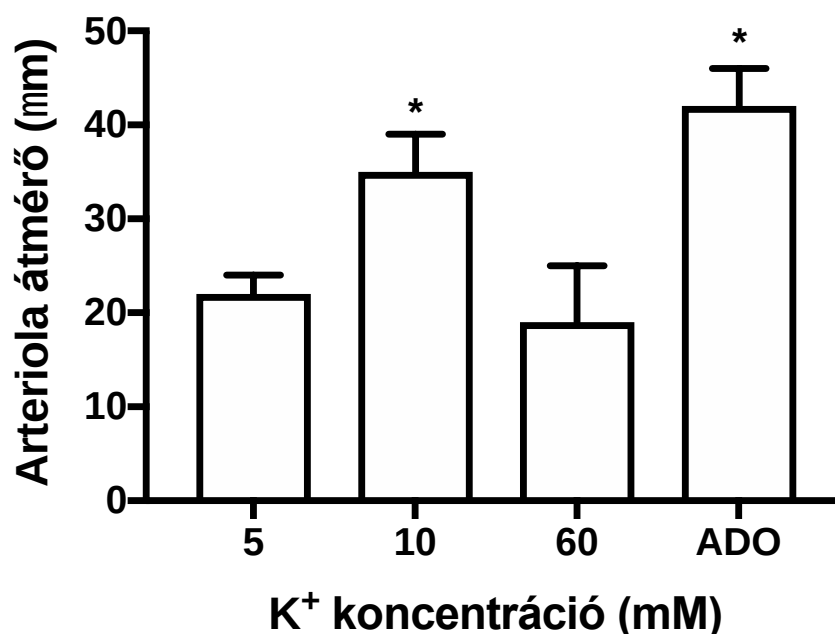
Normál mosófolyadék és K^+ koncentráció (5 mM) mellett az tapasztaltuk, hogy a K^+ csatorna gátlószer Ba^{2+} és glibenclamid alkalmazása után az erek nyugalmi átmérője szignifikánsan csökkent (6. ábra), ugyanakkor IbTX a nyugalmi értónust nem befolyásolta. A nyugalmi értónus változása nem volt hatással az ADO által kiváltott vazodilatációra, azaz egyik inhibitor jelenléte sem befolyásolta az ADO hatását (nincs feltüntetve), így az ADO alkalmazása egyszerűen kivitelezhető pozitív kontrollként szolgált a kísérletek során.



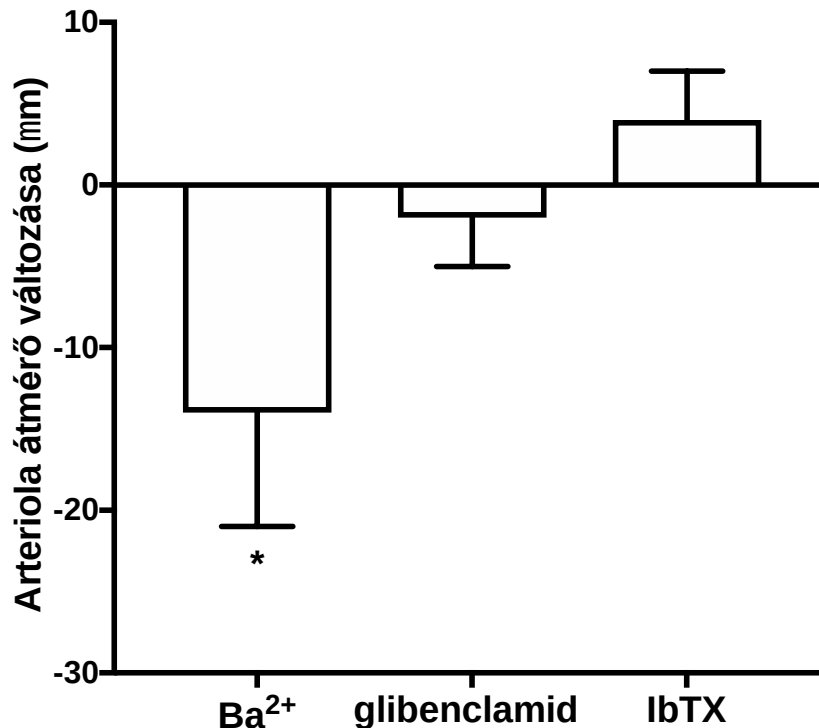
6. ábra. K⁺ csatorna gátlószerek hatása az arteriola átmérőre normál K⁺ koncentráció mellett. A bárium-klorid (n=6), a glibenclamid (n=4) és az iberiotoxin (n=4) hatása a cremaster izom negyedrendű arterioláinak nyugalmi átmérőjére (μm-ben feltüntetve). A * a szignifikáns különbséget jelöli (P<0,05) az inhibitor nélküli kontrollal összehasonlítva, önkontrollos próba).

5.2 A K^+ koncentráció emelkedéssel indukált vazodilatációban részt vevő K^+ csatornák vizsgálata.

Az altatott patkányok átlagos szisztolés vérnyomása 84 ± 3 Hgmm volt ($n=14$), és nem változott akkor, amikor adenzint vagy magas koncentrációjú K^+ oldatot (mosó puffer 60 mM K^+ koncentráció) juttattunk az izom felszínére. Az izomfelszínen alkalmazott lokális K^+ koncentráció mérsékelt növelése (mosó puffer 10 mM K^+ koncentráció) ugyanakkor vazodilatációt eredményezett (7. ábra). Ez összhangban állt a munkacsoportunk és más laboratóriumok által korábban leírt eredményekkel [Johnson és *mtsai* 1998, Lombard és Stekiel 1995, McCarron és Halpern 1990].



7. ábra. Az arteriola átmérő K^+ koncentráció függése. Patkány cremaster izom negyedrendű arteriolák átmérője (átlag $\pm$ SEM, $n=14$) különböző K^+ koncentrációjú mosópufferben és 100 μ M ADO (ADO) jelenlétében ($n=14$). Az ADO alkalmazása 5 mM K^+ koncentrációjú pufferben történt $*P < 0,05$ az 5 mM K^+ jelenlétében mért kontroll értékhez viszonyítva.



8. ábra. A K⁺ csatorna inhibitorok hatása 10 mM K⁺ által kiváltott vazodilatációra a cremaster izom negyedrendű arterioláiban. Az adatokat a gátlószer (50 μ M BaCl₂ n=6, 1 μ M glibenclamid n=4, 100 nM iberiotoxin n=4) jelenlétében, ill. anélkül mért érátmérők különbségeként tüntettük fel. Csak a BaCl₂ gátolta a mosó folyadék mérsékelten emelkedett (10 mM) K⁺ koncentrációja hatására létrejött értágulatot. A* a szignifikáns (P<0,05) eltérést mutatja (önkontrollos t-próba).

A 8. ábra a három K⁺ csatorna inhibitor hatását mutatja a mérsékelten emelkedett (10 mM) K⁺ koncentrációjú oldat által kiváltott vazodilatációra. Az oszlopok magassága az inhibitor nélkül mért, K⁺-indukált értágulatoktól való eltérést mutatja mikrométerben, a negatív érték azt mutatja, hogy az inhibitor jelenlétében csökkent a vazodilatáció. Egyedül a bárium-klorid jelenlétében tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a K⁺ indukált vazodilatációban a kontroll csoporttal összehasonlítva. A glibenclamid vagy az iberiotoxin jelenléte nem befolyásolta a mérsékelten emelkedett K⁺ koncentráció által létrejött arteriola tágulatot.

Fenti kísérleteinkből megállapítható hogy élettani körülmények között mind a K_{IR}, mind a K_{ATP} csatorna részt vesz a patkány cremaster izom negyedrendű arterioláiban a nyugalmi tónus kialakításában, valamint hogy a K_{IR} csatorna gátlásával megakadályozható a K⁺ koncentráció emelkedéssel indukált vazodilatáció.

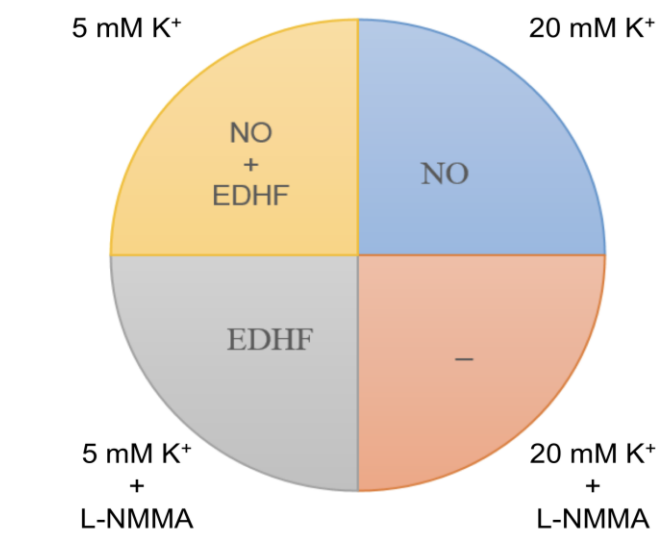
5.3 A különböző anesztetikumok szerepének vizsgálata az értónus szabályozásában

Az előzőekben bemutatott kísérleteinket *in vivo* végeztük. Ehhez elengedhetetlen volt valamely anesztetikum használata. Ez azonban újabb ismeretlen változót vitt az élettani folyamatok hátterének feltárásába, tovább komplikálva a multifaktoriális folyamatok megértését. Kísérlet sorozatunkban arra kerestük a választ, hogy két, az irodalmi adatok alapján endotélium közvetített vazodilatációt okozó agonista (acetilkolin, ACh és bradikinin, BK) alkalmazásakor létrejövő értágulatot befolyásolja-e az anesztetikum megválasztása, és ha igen, ez milyen mechanizmus eredményeként jön létre. A potenciális mechanizmusok azonosításához először azt kellett megvizsgálni, hogy az agonisták hiányában az érátmérő NOS- és EDHF-függő szabályozó folyamatait befolyásolják-e az anesztetikumok. A korábban említetteknek megfelelően a NOS-rendszert LNMMA-val, az EDHF-rendszert magas (20 mM) K^+ koncentráció alkalmazásával, mindkét rendszert pedig a kettő kombinálásával függesztettük fel. A négy kísérleti csoportot a 9. ábra szemlélteti. A prosztaglandin/prosztaciklin (PGI_2) közvetített vazodilatációt minden kísérletben gátoltuk intravénás indometacinnal.

5.3.1 A NOS útvonal gátlásának hatása az érátmérőkre különböző anesztetikumok használata mellett

A kísérlet sorozatot három különböző anesztetikum alkalmazása mellett végeztük el, a patkányokat izofluránnal, halotánnal, vagy ketaminnal altattuk. A preparátum sebészi előállítását és az indometacin intravénás beadását követően az izom felszínét 30 percen keresztül 5 mM K^+ tartalmú pufferrel mostuk. A kísérlet hossza miatt az L-NMMA-val kezelt és a kontroll méréseket nem ugyanazokon a preparátumokon végeztük. A 30 perc ekvilibrium után indítottuk az L-NMMA perfúziót, vagy a kontroll csoportban a volumenháztartás egyensúlyának fenntartása érdekében ugyanolyan sebességgel fizioológias sóoldatot adtunk. Újabb 30 perc ekvilibrium után (összesen 60 perc), rögzítettük a szisztolés vérnyomás adatokat (folyamatos invazív vérnyomás mérést alkalmazva). Az eredmények kiértékelésénél első lépésként a három alkalmazott anesztetikum szisztémás vérnyomásra gyakorolt hatásait hasonlítottuk össze (10. ábra, A panel), majd megnéztük, befolyással volt-e az anesztetikus ágens a vizsgált erek nyugalmi átmérőjére (10. ábra, B panel).

gátlók szerepe jelenlétében megmaradó mechanizmus



9. ábra. A kísérleti csoportok grafikus szemléltetése. Indometacint mindenhol alkalmaztunk. A körcikkekön kívül az egyes csoportokat, a körcikkekön belül pedig az adott csoportban megmaradó vazodilatációs mechanizmusokat tüntettem fel. Az 5 mM K⁺ csoportban nem volt gátlás (sárga, NO és EDHF is megmarad). Az 5 mM K⁺ + L-NMMA csoportban az L-NMMA gátolta az NOS-függő vazodilatációt (szürke, EDHF megmarad), a 20 mM K⁺ csoportban a magas K⁺ koncentráció az EDHF-függő vazodilatációt gátolta (kék, NO megmarad), a negyedik csoportban a magas K⁺ koncentráció + L-NMMA szerepeltek gátlószereként (piros, sem NO sem pedig EDHF nem marad).

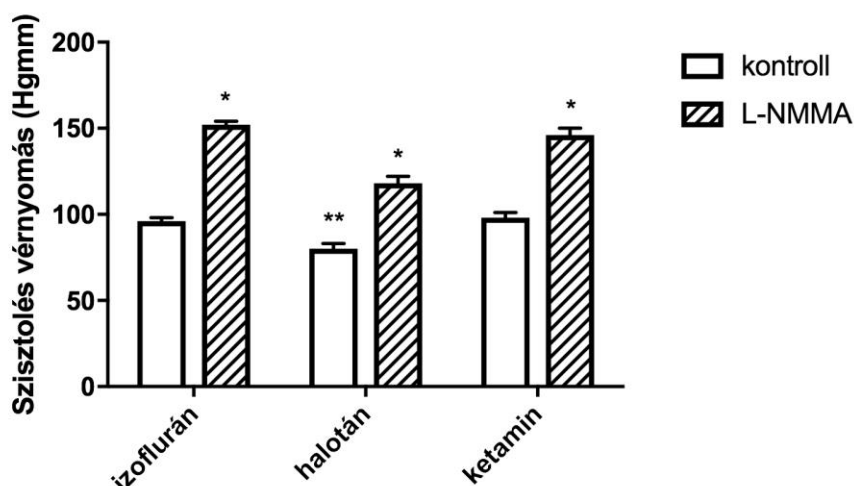
Halotán anesztézia alatt szignifikánsan alacsonyabb átlagos szisztolés vérnyomás értékeket mértünk (80 ± 3 Hgmm $n=14$), mint ketamin (98 ± 3 Hgmm $n=17$) vagy izoflurán (96 ± 2 Hgmm $n=12$) anesztézia során, egybevetően más korábbi eredményekkel (ANOVA és SNK, $P < 0,001$) [Seyde és Longnecker 1984]. A NOS rendszert gátló tulajdonságú L-NMMA alkalmazása statisztikailag jelentősen emelte az átlagos vérnyomást mind az izoflurán (152 ± 2 Hgmm $n=13$), mind a halotán (118 ± 4 Hgmm $n=12$) és a ketamin (146 ± 4 Hgmm $n=14$) anesztézia során (t-teszt, $P < 0,001$ mindegyik esetben). A jelenséget számos irodalmi adat alátámasztja [Rapoport 2014].

A vizsgált negyedrendű arteriolák átlagos nyugalmi átmérői (10. ábra, B panel) a preparátum elkészítése, és az összesen 60 perces ekvilíbrio után az izoflurán anesztézia során voltak a legnagyobbak (25 ± 1 μ m, $n=13$), ezt követte a halotán (21 ± 1 μ m, $n=16$),

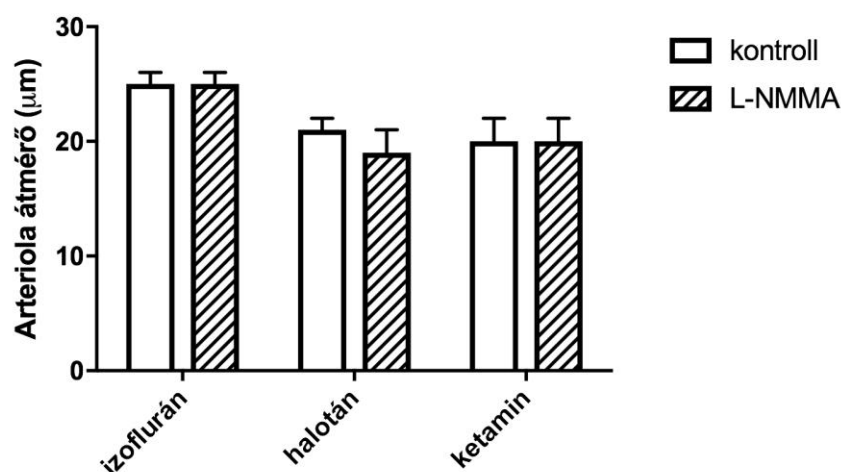
majd a ketamin anesztézia alatt mért átlagos érátmérő ($20 \pm 2 \mu\text{m}$, $n=17$). A különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($P=0,1$, ANOVA). Az erek reakcióképességét és a preparátum épségét az endotéliumtól független mechanizmussal dilatációt előidéző adenozin (ADO, $100 \mu\text{M}$) alkalmazásával ellenőriztük (ld. 12. ábra).

Az L-NMMA-vel kezelt állatoknál a nyugalmi érátmérők nem különböztek a kezeletlen (kontroll) csoportban mért értékektől egyik anesztetikus ágens használata során sem (izoflurán: $25 \pm 1 \mu\text{m}$, $n=14$, halotán: $19 \pm 2 \mu\text{m}$, $n=14$, ketamin: $20 \pm 2 \mu\text{m}$, $n=15$, t-teszt, $P>0,3$ mindegyik esetben, 10. ábra, B panel) .

A



B



10. ábra. Az anesztetikumok hatása az átlagos szisztolés vérnyomásra (A) és az átlagos nyugalmi érátmérőkre (B). (A) A szisztolés vérnyomást direkt (artériás) úton mértük 60 perccel a preparátum elkészítését követően kontroll állatokban (üres oszlop) és L-NMMA intravénás perfúzióval kezelt állatok esetén (L-NMMA perfuzor 3mg/kg/min, 100 mg/kg 30 perc alatt, ld. Anyagok és Módszerek, sávozott oszlop). A statisztikailag szignifikáns különbséget a halotán (n=14), ketamin (n=17), vagy izoflurán (n=12) anesztézia során kapott eredmények között ** jelöli (ANOVA és SNK, $P < 0,001$). Az L-NMMA intravénás infúziója szignifikánsan növelte az átlagos szisztolés vérnyomást valamennyi anesztetikum alkalmazása során (t-teszt, $P < 0,001$, a * szignifikáns eltérést jelöli). (B): A negyedrendű arteriolák nyugalmi átmérőjét izoflurán (n=13), halotán (n=16), ketamin (n=17) anesztézia mellett mértük, a különbség nem volt szignifikáns ($P = 0,1$, ANOVA). Az L-NMMA intravénás infúziója nem volt hatással a nyugalmi érátmérőkre egyik csoportban sem (izoflurán: n=14, halotán: n=14, ketamin: n=15, t-teszt, $P > 0,3$ mindegyik esetben).

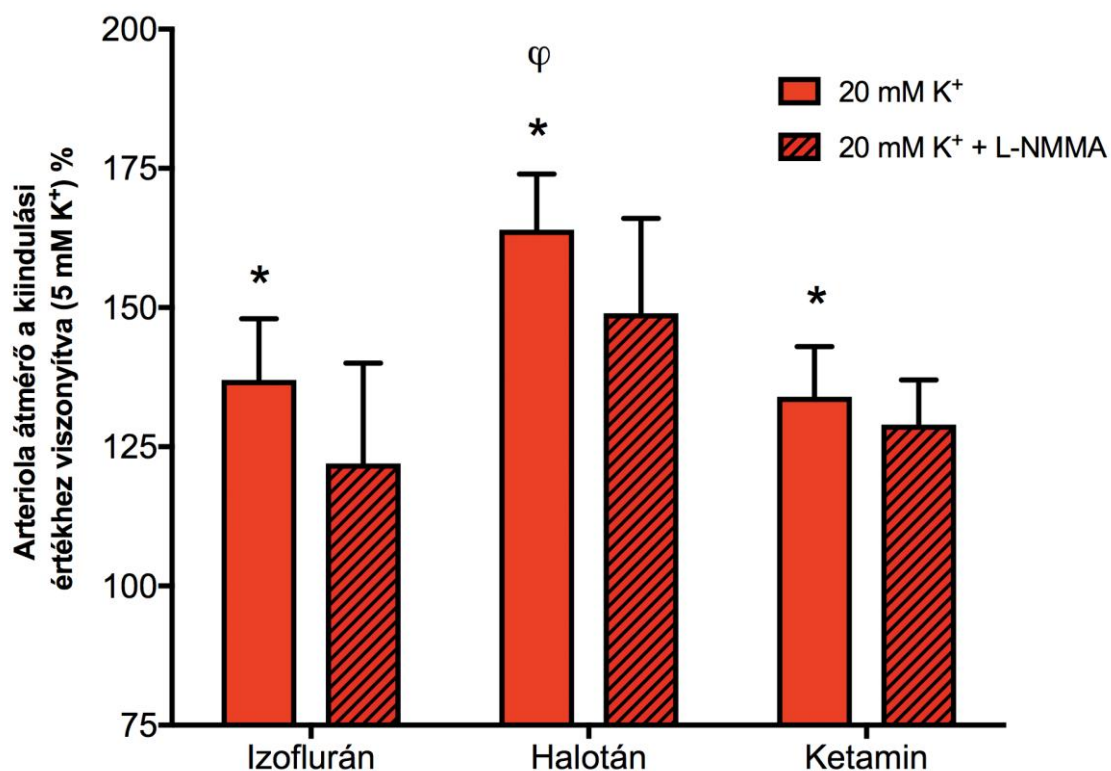
5.3.2 *Az EDHF útvonal gátlásának hatása az érátmérőkre különböző anesztetikumok használatával*

Az EDHF útvonalat magas K^+ tartalmú (20 mM) puffer alkalmazásával gátoltuk. A fellépő esetleges szisztémás változások jelenlétét vizsgáltuk először. Mint azt a kísérleti protokollok fejezetben leírtuk, a magas koncentrációjú puffer hatására az artériából nyert vérminta vérgáz analízise alapján a szérum K^+ koncentrációja nem változott szignifikánsan. 5 mM és 20 mM K^+ koncentráció esetén ennek értéke rendre $3,8 \pm 0,21$ mmol/l volt a normál puffer jelenlétében és $4,65 \pm 0,45$ mmol/l volt 3 órával a magas $[K^+]$ oldat elindítása után ($n=4$). A puffer váltást követően nem jött létre szisztémás vérnyomásváltozás (az adatokat nem jelenítettük meg).

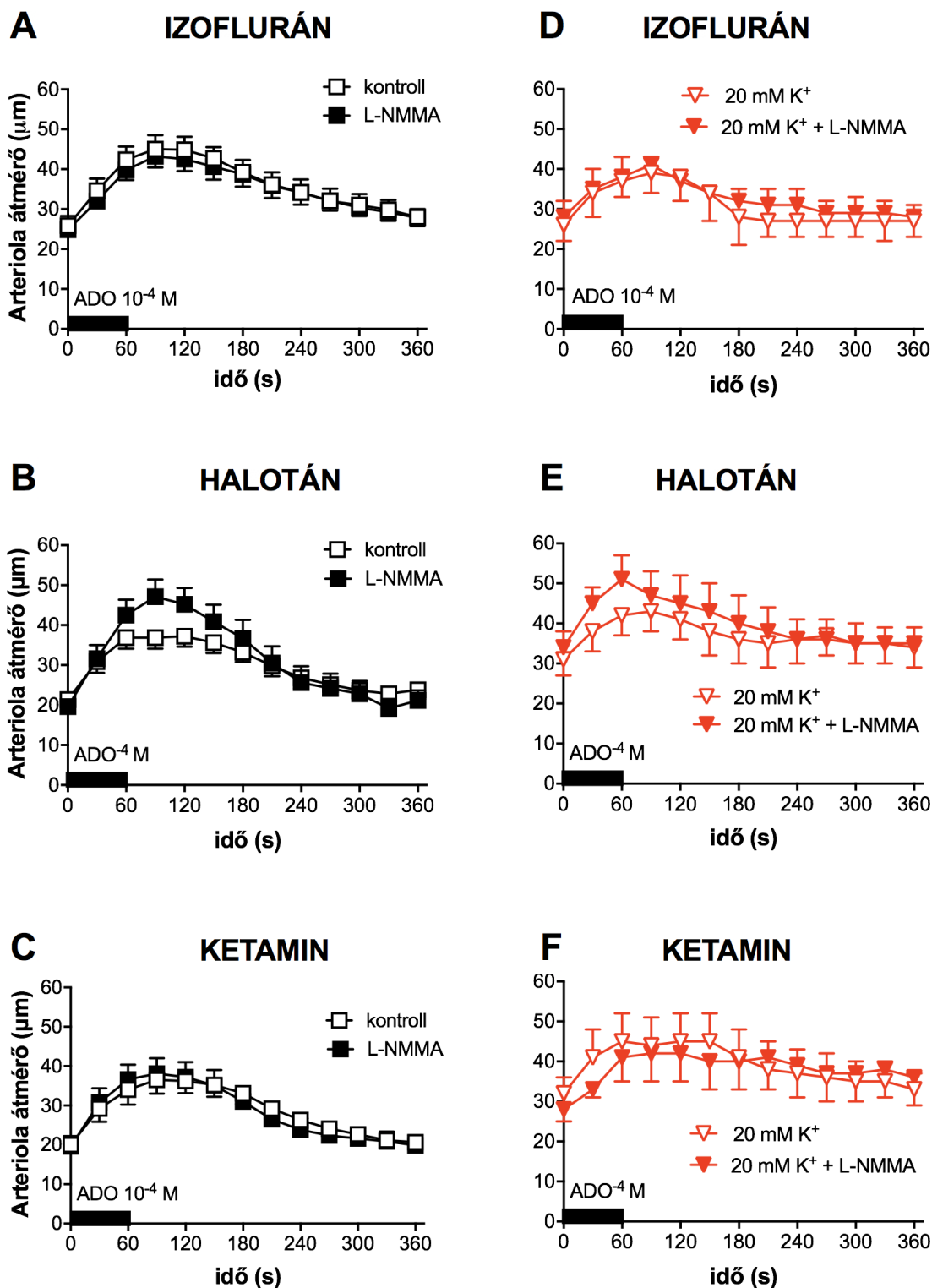
Ezután a 20 mM K^+ koncentrációjú puffernek az erek nyugalmi átmérőjére gyakorolt hatását elemeztük. Megállapítottuk, hogy a negyedrendű arteriolák szignifikáns dilatációt mutattak a normál (5 mM) K^+ koncentrációjú Krebs oldat használatakor megfigyelt értékekhez képest (11. ábra). Az L-NMMA előkezelés nem változtatta meg a 20 mM K^+ koncentrációra adott értágulatot. Érdekes megemlíteni, hogy a halotán jelenlétében a vizsgált erek szignifikánsan tágabbak voltak, mint ketamin vagy az izoflurán használatakor.

Következő lépésként a kiválasztott ér működőképességét vizsgáltuk az elkészített preparátumon. Ehhez az endotéliumtól független úton vazodilatációt kiváltó adenozin használtunk (12. ábra). Normál 5 mM K^+ koncentrációjú puffer alkalmazása során (12. A,B,C) az adenozin által kiváltott vazodilatációt a nyugalmi érátmérő százalékában kifejezve azonos válaszokat figyeltünk meg izoflurán ($187 \pm 21\%$, $n=13$), halotán ($179 \pm 10\%$, $n=15$) és ketamin ($189 \pm 14\%$, $n=15$) anesztézia mellett. Az L-NMMA kezelés nem befolyásolta az adenozin hatására bekövetkezett értágulatot izoflurán ($180 \pm 15\%$, $n=14$), vagy ketamin ($206 \pm 15\%$, $n=17$) jelenlétében. Ebből arra következtethetünk, hogy ez a válasz a nitrogén-oxidtól független úton valósult meg. Ugyanakkor halotán anesztézia során az adenozin által kiváltott érválasz szignifikáns növekedését figyeltük meg ($248 \pm 13\%$, $n=16$) L-NMMA alkalmazása mellett.

Ezt követően a magas kálium koncentráció jelenlétében teszteltük az arteriolák reakcióképességét adenozinnal. A kiváltott vazodilatáció mértékét nem befolyásolta sem a 20 mM $[K^+]$ önmagában, sem az L-NMMA-vel való együttes alkalmazása (12. ábra, D,E,F). A negyedrendű arteriolákban kiváltható maximális dilatáció 35-40 μ m-volt függetlenül az anesztetikus ágenstől és az oldat K^+ koncentrációjától (12. ábra).



11. ábra. A magas K^+ koncentráció hatása az arteriolák nyugalmi átmérőjére izoflurán, halotán és ketamin anesztézia során. A feltüntetett adatok a normál (5 mM) K^+ koncentrációjú puffer esetén mért átlagos nyugalmi érátmérőkhöz (100%) viszonyított százalékos értéket mutatja az L-NMMA-vel kezelt (sávozott tele oszlopok) és 20 mM koncentrációjú K^+ -t tartalmazó pufferben (tele oszlopok) csoportok esetében. A normál puffert 20 mM koncentrációjú K^+ -t tartalmazó pufferre cseréltük, majd a preparátumnak 10 percet hagytunk az egyensúlyi állapot eléréséhez. Ezt követően az érátmérőket 5 percen át 30 másodpercenként rögzítettük, majd átlagoltuk. Az állatok száma a következők szerint alakult: izoflurán esetén $n=5$ mindkét csoportban, a halotán esetén a kontroll: $n=7$, L-NMMA: $n=5$, ketamin esetén $n=5$ mindkét csoportban. * Szignifikáns átmérő növekedés az 5 mM $[K^+]$ mellett mért nyugalmi érátmérőhöz viszonyítva. A halotán anesztézia alatt mért nyugalmi átmérő szignifikánsan nagyobb volt (ϕ), mint izoflurán és ketamin anesztézia alatt.



12. ábra. Az adenosin hatása (ADO, 100 μM) a negyedrendű arteriolák átmérőjére Az érátmérőket izoflurán (A), halotán (B) és ketamin (C) anesztézia során, L-NMMA jelenlétében, vagy anélkül (kontroll) határoztuk meg. Bal oldali panelek: az érátmérők változásai normál 5 mM K⁺ koncentrációjú puffer jelenlétében (izoflurán: n=13-14, halotán: n=15-16, ketamin: n=15-17). Jobb oldali panelek: az érátmérők változásai 20 mM K⁺ koncentrációjú puffer jelenlétében (izoflurán: n=3, halotán: n=7, ketamin: n=5).

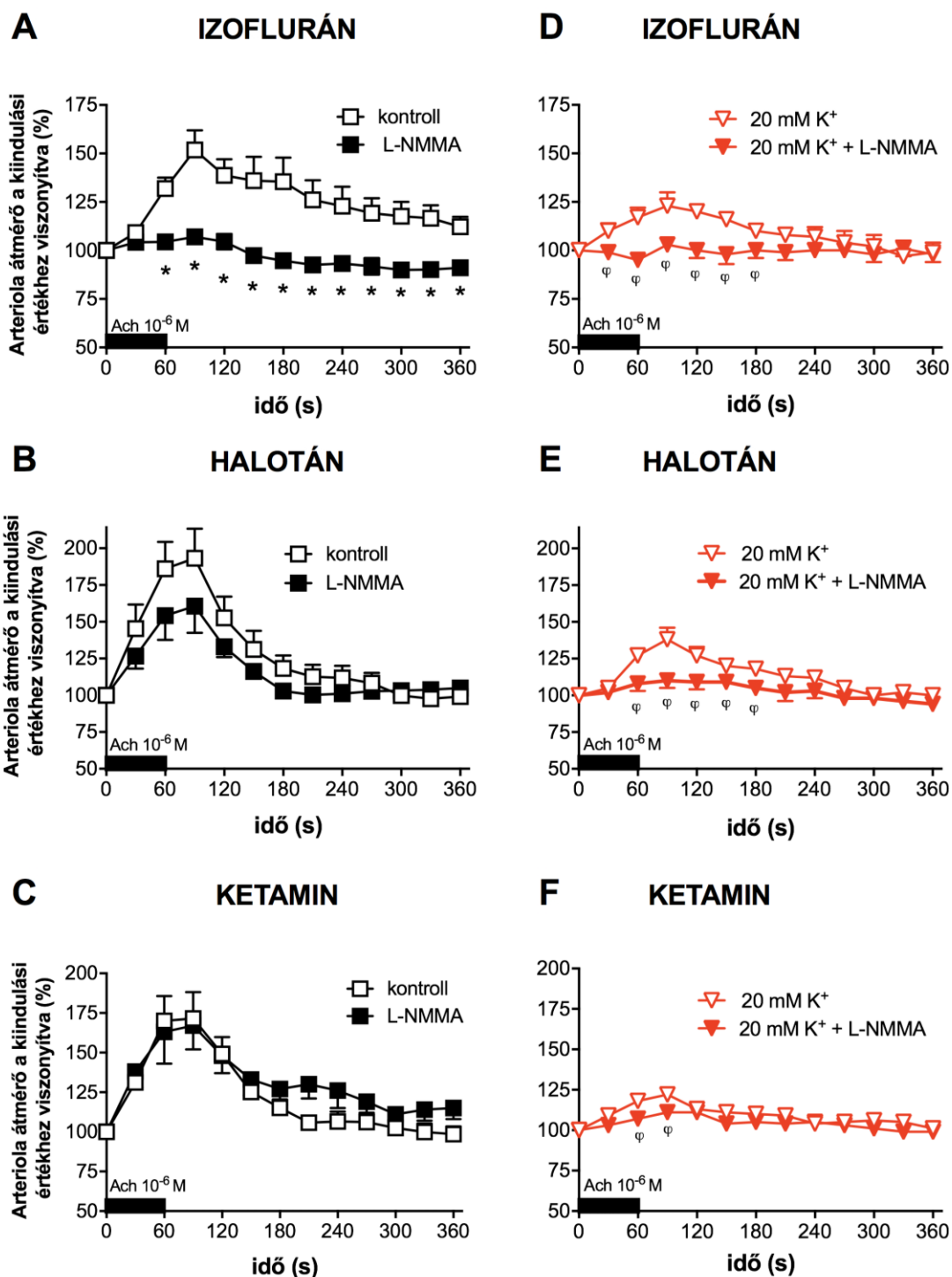
5.3.3 *Az acetilkolin által kiváltott érválaszok a különböző anesztetikumok használata során*

A következőkben az agonisták közül az acetilkolin által kiváltott vazodilatációkat hasonlítottuk össze normál, vagy magas kálium koncentrációjú puffer alkalmazása mellett, L-NMMA nélkül, vagy annak jelenlétében, izoflurán, halotán vagy ketamin narkózis során (13. és 14. ábrák). Az ACh hatására létrejött válaszreakciók mind intenzitásukat, mind időbeli lefutásukat tekintve hasonlóak voltak az adenzin által létrehozott dilatációkhoz (ld. 12. ábra).

Izoflurán anesztézia során azt láttuk, hogy az ACh hatására kialakuló vazodilatációt az eNOS inhibitor L-NMMA jelenléte szignifikánsan gátolta a normál (5 mM) kálium ion koncentráció alkalmazása mellett. A 13. ábra A paneljén az ACh egy reprezentatív dózisa (1 μ M) által kiváltott vazodilatáció időbeli lefutását ábrázoltuk. Ezzel demonstráltuk, hogy izoflurán jelenlétében az acetilkolin döntően NO mediált mechanizmussal dilatálja a kísérletes modellünk rezisztencia ereit. Az izoflurán mellett kiváltható ACh válaszok dózis-hatás görbéit a 14. ábra A panelje ábrázolja.

Ezzel szemben az EDHF mechanizmus gátlása nem befolyásolta érdemben az ACh által kiváltott válaszreakciókat. Az 1 μ M-os dózissal ugyan szignifikáns gátlást kaptunk az L-NMMA + 20 mM K^+ egyidejű jelenlétében (13. ábra D panelje), de a többi dózissal ezt nem sikerült reprodukálnunk (14. ábra A), így az eredményt nem tekintettük a gyakorlati életre nézve általánosíthatónak. Megjegyzendő, hogy az agonisták által kiváltott érválaszokat a kiindulási átmérő százalékában tüntettük fel, ezért a nagyobb kiindulási értékek miatt a százalékos érválaszok kisebbek voltak a magasabb K^+ koncentráció alkalmazása mellett.

Ezzel szemben halotán (13. ábra B és E panelek, 14. ábra B panel) és ketamin (13. ábra C és F panelek, 14. ábra C panel) anesztézia során sem az élettani (5 mM), sem az EDHF rendszert gátló magas K^+ alkalmazása mellett nem tudtunk az acetilkolinra bekövetkező érválasznál szignifikáns NO függést kimutatni.

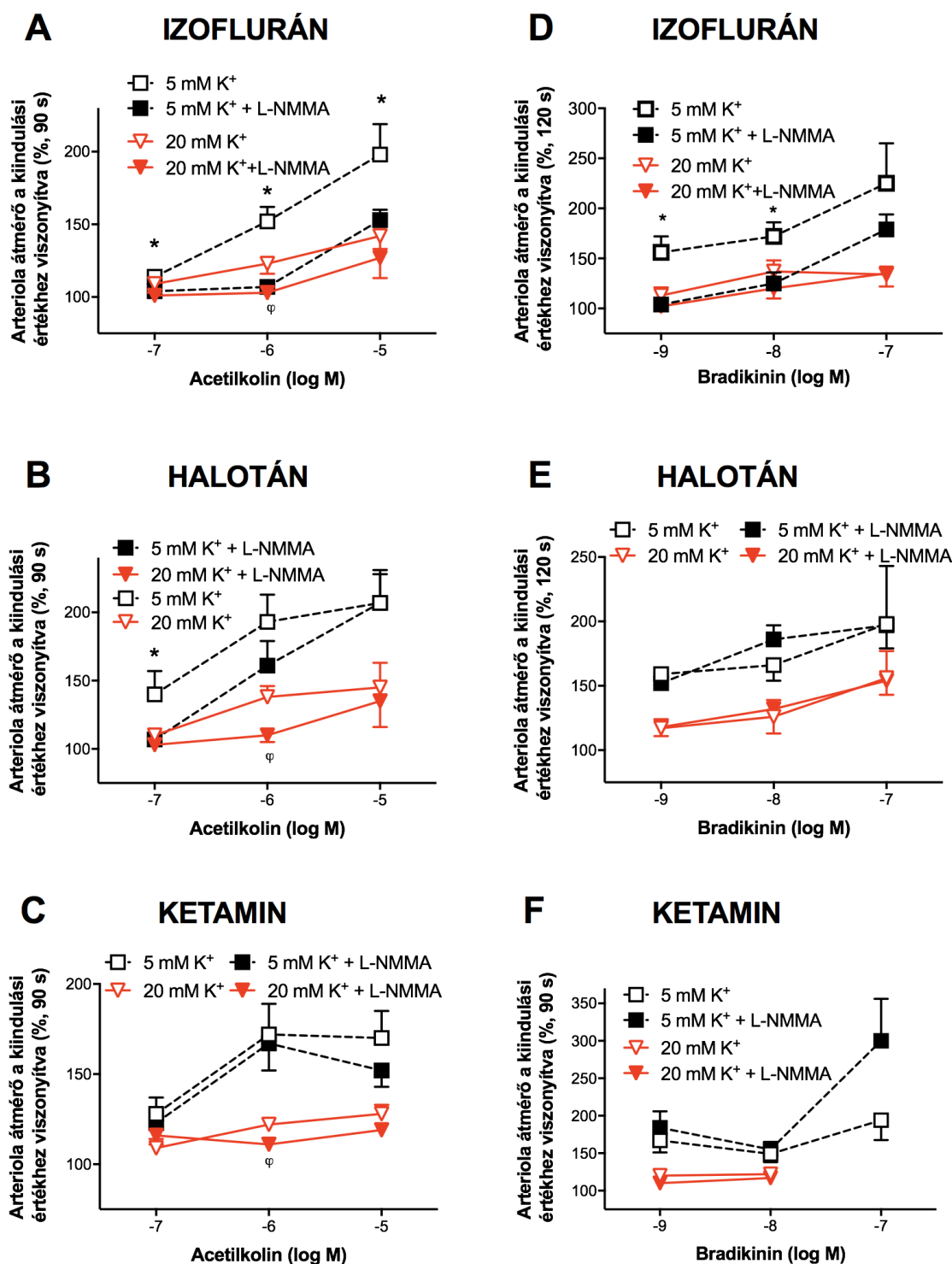


13. ábra Acetilcolin-indukált vazodilatáció mechanizmusa különböző anesztetikumok esetén. A, D. Az acetilkolin (ACh) hatása izoflurán során a negyedrendű arteriolák átmérőjére. A: $1\mu\text{M}$ ACh alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 5 mM K^+ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén. A vazodilatáció szignifikáns gátlását mutattuk ki (*) L-NMMA jelenlétében ($n=12$) a kontroll (5 mM K^+ $n=10$) csoporttal összehasonlítva. D: $1\mu\text{M}$ ACh alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 20 mM K^+ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén. Az L-NMMA ($n=4$) szignifikánsan gátolta a vazodilatációt (ϕ) a kontroll (20 mM K^+ $n=4$) csoporttal összehasonlítva.

13. ábra B, E. Az acetilkolin (ACh) hatása halotán anesztézia során a negyedrendű arteriolák átmérőjére. B: 1 μ M ACh alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 5 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén (n=11-12 mindkét csoportban). E: 1 μ M ACh alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 20 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén. Az L-NMMA szignifikánsan gátolta a vazodilatációt (ϕ) (n=5) a kontroll (20 mM K⁺ n=6) csoporttal összehasonlítva

13. ábra C, F. Az ACh hatása ketamin anesztézia során a negyedrendű arteriolák átmérőjére. C: 1 μ M ACh alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 5 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén L-NMMA jelenlétében (n=14) és a kontroll (5 mM K⁺) csoporttal összehasonlítva (n=16). F: 1 μ M ACh alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 20 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén. Az L-NMMA szignifikánsan gátolta a vazodilatációt (ϕ) a kontroll (20 mM K⁺) csoporttal összehasonlítva (n=5 mindkét csoportban).

Összegzésként az eredményeink azt mutatják, hogy az anesztetikum választás befolyásolta az acetilkolin által kiváltott vazodilatáció mechanizmusát. Izoflurán anesztézia alatt, 5 mM K⁺ jelenlétében NO függő, míg halotán és ketamin anesztézia alatt döntően attól független mechanizmusok okozták a vazodilatációt.



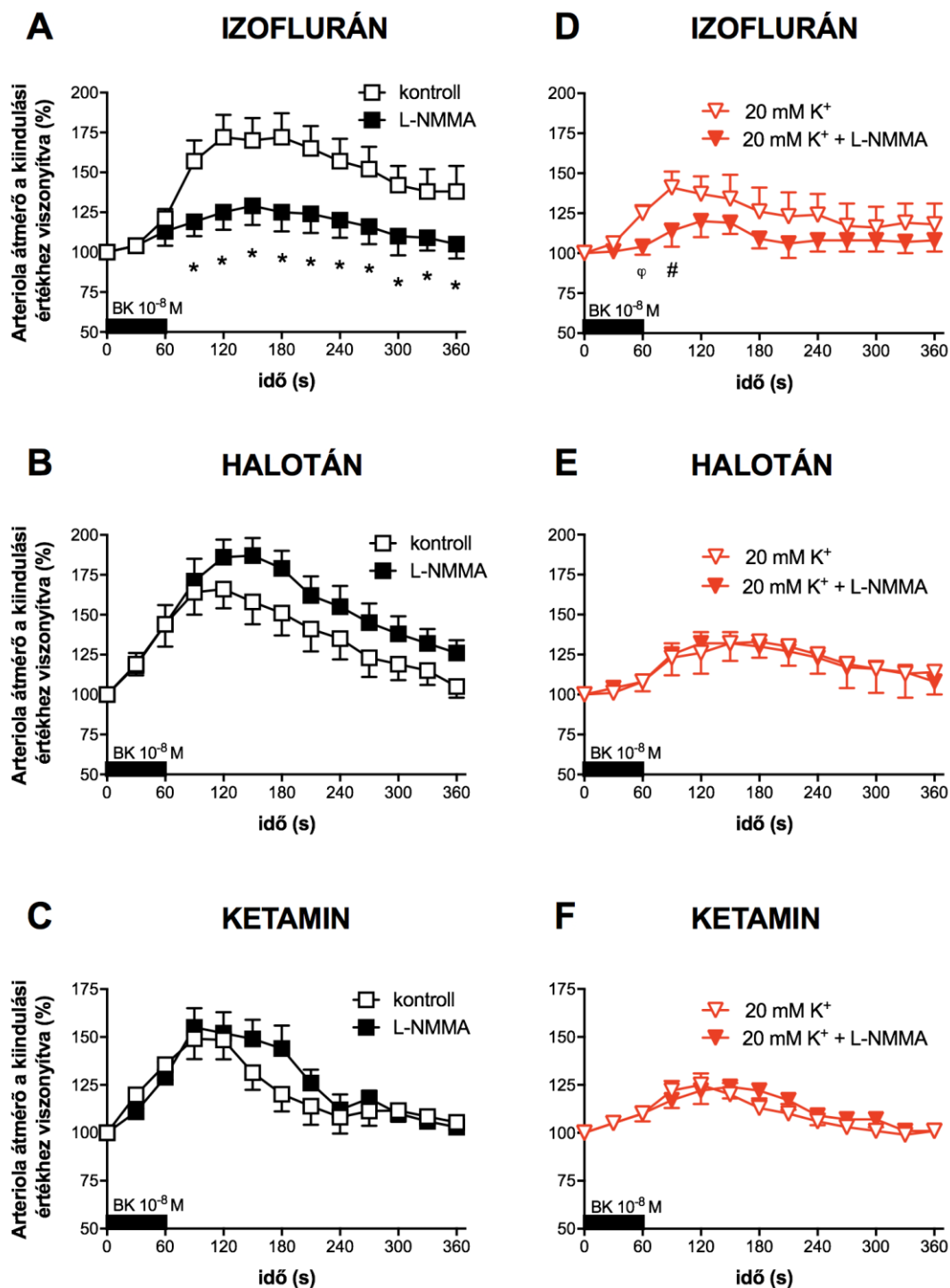
14. ábra Acetilkinin és bradikinin által kiváltott érátérő változások dózis- és gátlószer-függése. A-C :Az ACh által kiváltott reakciók dózis függése a kiindulási érátérők százalékában kifejezve, a szer pufferhez történő adagolásának kezdetétől számított 90. másodpercben, A: izoflurán, B: halotán, C: ketamin anesztézia során. 14. ábra D-F: A BK által kiváltott reakciók dózis függése a kiindulási érátérők százalékában kifejezve, a szer pufferhez történő adagolásának kezdetétől számított 120. másodpercben, D: izoflurán, E: halotán, F: ketamin anesztézia során.

5.3.4 *A bradikinin által kiváltott érválaszok a különböző anesztetikumok használata során*

A következőkben az agonisták közül a bradikinin által kiváltott vazodilatációkat hasonlítottuk össze normál, vagy magas kálium koncentrációjú puffer alkalmazása mellett, L-NMMA nélkül, vagy annak jelenlétében, izoflurán, halotán vagy ketamin narkózis során (14. és 15. ábrák). A BK hatására létrejött válaszreakciók mind intenzitásukat, mind időbeli lefutásukat tekintve hasonlóak voltak az adenzin által létrehozott dilatációkhoz (ld. 12. ábra).

Izoflurán anesztézia során azt láttuk, hogy a BK (1-10nM) hatására kialakuló vazodilatációt az eNOS inhibitor L-NMMA jelenléte szignifikánsan gátolta a normál (5 mM) K^+ koncentrációjú puffer jelenlétében (14. ábra D panel). 15. ábra A paneljén a BK egy reprezentatív dózisa (10 nM) által kiváltott vazodilatáció időbeli lefutását ábrázoltuk. Ezzel demonstráltuk, hogy izoflurán jelenlétében a bradikinin is döntően NO mediált mechanizmussal dilatálja a kísérletes modellünk rezisztencia ereit, hasonlóan az acetilkolinnál bemutatott eredményekhez (13. ábra A panel). Az izoflurán mellett kiváltható BK válaszok dózis-hatás görbéit a 14. ábra D panelje mutatja be. A dózis hatás görbéknél bradikinin esetében a 120. másodpercben mért eredményeket tüntettük fel, mert a kiváltott dilatáció ennél az agonistánál többnyire ekkor érte el a maximális mértékét (ACh esetében a maximális dilatáció általában a 90. másodpercben volt észlelhető). Ugyanakkor a magas K^+ koncentráció (EDHF gátlás) alkalmazása mellett, csak egy dózisonál (10 nM) észleltünk rövid ideig tartó gátlást (60.s, 90. s) a kiváltott értágulat során (14. ábra D és 15. ábra D panelek).

Ezzel szemben halotán (14. ábra E panel és 15. ábra B és E panelek,) és ketamin (14. ábra F panel és 15. ábra C és F panelek,) anesztézia során sem az élettani (5 mM), sem az EDHF rendszert gátló magas K^+ koncentráció alkalmazása mellett nem tudtunk a bradikinin által kiváltott vazodilatációban szignifikáns és több dózison nézve konzekvens NO függést kimutatni.



15. ábra **Bradykinin-indukált vazodilatáció mechanizmusa különböző anesztetikumok esetén** A, D. A bradykinin (BK) hatása izoflurán anesztézia során a negyedrendű arteriolák átmérőjére. A: 10 nM BK alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 5 mM K^+ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén. A vazodilatáció szignifikáns gátlását mutattuk ki (*) L-NMMA jelenlétében a kontroll (5 mM K^+) csoporttal összehasonlítva ($n=10-12$ mindkét csoportban). D: 10 nM BK alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 20 mM K^+ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén. Az L-NMMA szignifikánsan gátolta a vazodilatációt (ϕ) a kontroll (20 mM K^+) csoporttal összehasonlítva ($n=4$ mindkét csoportban). A # esetében $P=0,0524$.

15. ábra B,E: BK hatása halotán anesztézia során a negyedrendű arteriolák átmérőjére. B: 10 nM BK alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 5 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén, L-NMMA-vel kezelt (n=14) és a kontroll csoportban (n=12). E: 10 nM BK alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 20 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén, L-NMMA kezelt (n=6) és a kontroll (20 mM K⁺) csoportban (n=5)

15. ábra C, F. A BK hatása ketamin anesztézia során a negyedrendű arteriolák átmérőjére. C: 10 nM BK alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 5 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén, L-NMMA-vel kezelt (n=11) és a kontroll csoportban (n=12). F: 10 nM BK alkalmazásakor kiváltott hatás időfüggése 20 mM K⁺ koncentrációjú puffer alkalmazása esetén, L-NMMA kezelt és a kontroll (20 mM K⁺) csoportban (n=5 mindkét csoportban)

Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy intakt EDHF rendszer mellett (5 mM K⁺) a különböző altatószerek alkalmazásával eltérő eredményeket kaptunk a fenti kísérlet során, vagyis az anesztetikum választás befolyással volt a mikrocirculációban részt vevő rezisztencia erek működésére.

Izoflurán anesztézia során élettani körülmények között (5 mM K⁺) mind az ACh, mind a BK NO függő vazodilatációt hoz létre, mivel a NOS rendszer gátlásával az agonisták által kiváltott vazodilatáció mértéke is csökkent. Elmondhatjuk, hogy az izoflurán hatására a NO és EDHF egyensúlya az értónus szabályozásában felborul. A NO befolyása nő, míg az EDHF szerepe csökken a rezisztencia arteriolák tónusának fenntartásában.

Halotán és ketamin anesztézia alatt sem az ACh, sem a BK okozta vazodilatáció nem volt befolyásolható a NOS és/vagy az EDHF rendszer gátlásával.

5.4 A levosimendan és metabolitja (OR-1896) vazoaktív tulajdonságainak *in vivo* vizsgálata

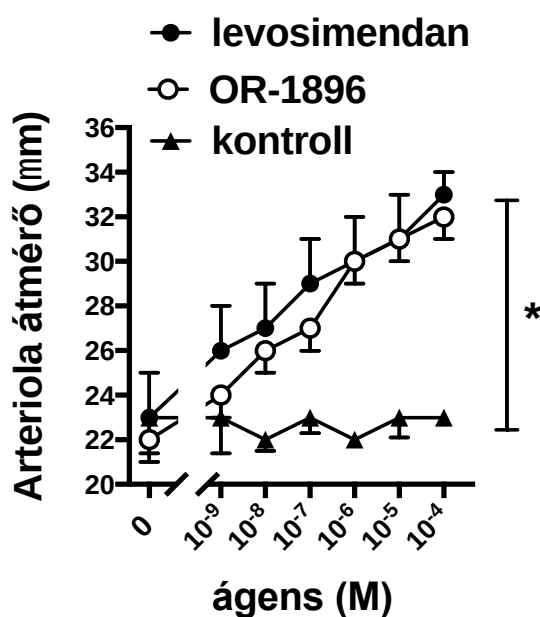
A preparátum elkészülése után 30 percet vártunk az egyensúlyi állapot kialakulására. Ezen időszakban a cremaster izom arterioláiban kialakult egy stabil spontán tónus (nyugalmi érátmérő $25 \pm 6 \mu\text{m}$). Ezt az inkubációs periódust követően az endotélium-függő vazodilatátor acetilkolin (ACh, $1 \mu\text{M}$) és az endotéliumtól független agonista adеноzin (ADO, $10 \mu\text{M}$) egyaránt jelentős érátmérő növekedést hozott létre a vizsgált arteriolákon ($25 \pm 2 \mu\text{m}$ -ről $33 \pm 3 \mu\text{m}$ -re az ACh, és $24 \pm 4 \mu\text{m}$ -ről $35 \pm 2 \mu\text{m}$ -re az ADO esetében. Ezzel a teszttel bizonyítottuk, hogy a preparátum mind az endotélium-függő, mind az attól független válaszreakciót képes prezentálni, vagyis az endotélium és simaizomsejtek működése megfelelő.

5.4.1 A levosimendan és az OR-1896 által kiváltott vazodilatáció vizsgálata

Ezt követően a levosimendan és aktív metabolitja, az OR-1896 növekvő koncentrációi által kiváltott válaszokat vizsgáltuk kísérletes modellünkben. A levosimendan hozzáadása az izmot felülről mosó pufferhez koncentrációfüggő (1 nM - 100 μ M) vazodilatációt eredményezett (maximális dilatáció 23 ± 2 μ m-ről 33 ± 2 μ m-re) (16. ábra). Az OR-1896 növekvő koncentrációjának (1 nM – 100 μ M) alkalmazása hasonlóképpen erőteljes érátmérő növekedést eredményezett (maximális dilatáció 22 ± 1 μ m-ről 32 ± 1 μ m-re) (16. ábra).

Összehasonlítva a levosimendan és az OR-1896 azonos dózisaival által kiváltott válaszreakciókat, azok statisztikailag azonosak voltak ($P > 0,05$).

Mint azt a metodikánál leírtuk, a levosimendant, az OR-1896-t dimethyl-sulfoxidban (DMSO, 100 mM törzsoldat) oldottuk, melyet etanolban hígítottunk tovább. A felülmosó folyadék maximális DMSO koncentrációja 0,015% volt, mely nem okozott szignifikáns érátmérő változást a preparátumunkon (16. ábra).

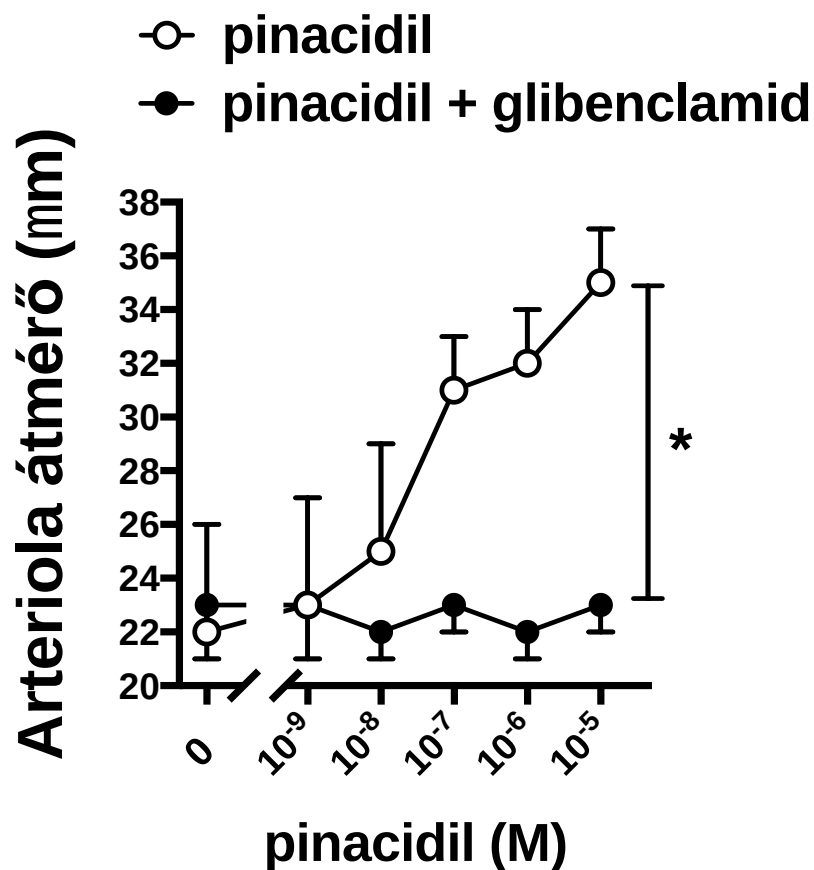


16. ábra A patkány cremaster izom arterioláin megfigyelt érátmérő változások levosimendan növekvő koncentrációinak (1 nM - 100 μ M, n=9) vagy OR-1896 (1 nM - 100 μ M, n=7). Az adatok az átlagos átmérőket mutatják, $\pm$ SEM. * Szignifikáns eltérés a nyugalmi érátmérőhöz vagy az oldószer jelenlétében mért átmérőhöz viszonyítva ($P < 0,05$). 0 M: indulási átmérő

5.4.2 A K_{ATP} csatorna szerepének vizsgálata a levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban

Ebben a kísérlet sorozatban a K_{ATP} csatorna szerepét vizsgáltuk a levosimendan és aktív metabolitja által okozott érválaszban a fenti cremaster preparátumban, in vivo.

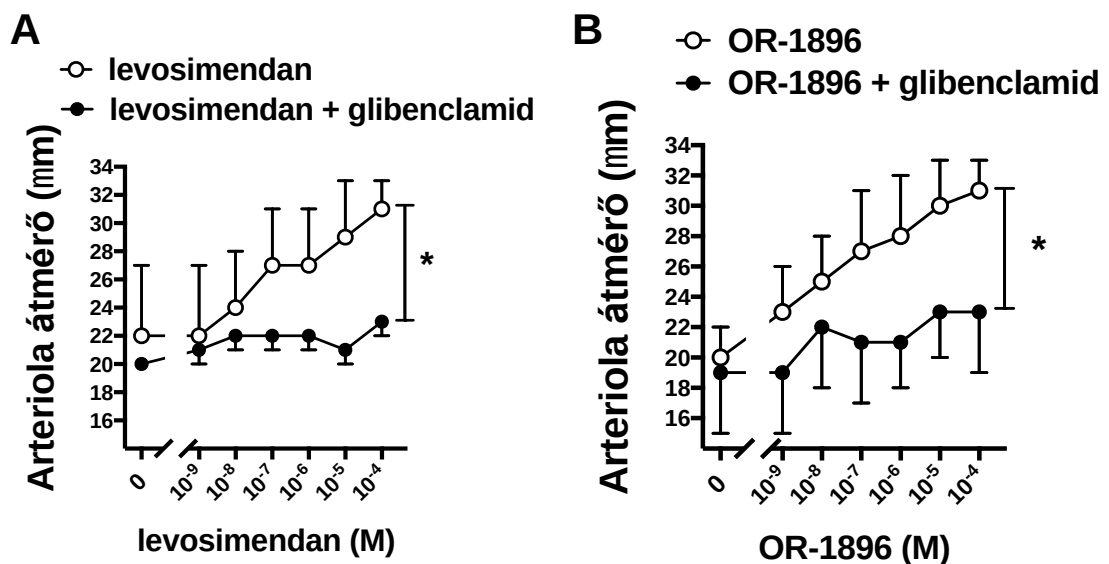
A K_{ATP} csatornákat nyitó pinacidil különböző koncentrációjának (1 nM – 10 μ M) hatását rögzítettük, a K_{ATP} csatornák szelektív gátlószerének, a glibenclamidnak a jelenlétében és anélkül. (5 μ M koncentrációban a pufferhez adva 30 percen át). A glibenclamiddal való inkubáció nem változtatta meg a nyugalmi érátmérőt ($23 \pm 2 \mu$ m és $23 \pm 2 \mu$ m, a glibenclamiddal történt inkubáció előtt és után). Ugyanakkor glibenclamid jelenlétében a pinacidil nem volt képes vazodilatációt kiváltani a cremaster izom arterioláin (17. ábra).



17. ábra A patkány cremaster izom arterioláin megfigyelt érátmérő változások pinacidil növekvő koncentrációinak (1 nM - 10 μ M,) alkalmazása után, glibenclamid (5 μ M, n=5) inkubáció előtt és után. Az adatok az átlagos átmérőket mutatják, $\pm$ SEM. * Szignifikáns eltérés a nyugalmi érátmérőhöz vagy az oldószer jelenlétében mért átmérőhöz viszonyítva ($P < 0,05$). 0 M: indulási átmérő

Ezt követően kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a K_{ATP} csatornák lehetséges szerepét a levosimendan vagy az OR-1896 által kiváltott vazodilatációban. Ezért a fenti kísérleteket megismételtük, pinacidil helyett levosimendan (1 nM – 100 μ M) vagy OR-1896 (1 nM – 100 μ M) növekvő koncentrációjú oldatait alkalmazva glibenclamid nélkül és annak jelenlétében. Hasonlóan a pinacidil esetében tapasztaltakhoz, a glibenclamid jelenlétében a levosimendan által kiváltott vazodilatáció is gátolt volt (maximális dilatáció 23 ± 3 μ m, 18.A ábra). Ugyanezt az eredményt figyeltük meg az OR-1896 alkalmazásakor is (maximális dilatáció 22 ± 5 μ m, 18.B ábra). Az 5 μ M glibenclamiddal történt inkubáció itt sem volt befolyással az erek nyugalmi érátmérőjére (indulási érátmérő), és azok nem voltak statisztikailag különbözőek a levosimendan és OR-1896 legnagyobb dózisának alkalmazásakor sem.

Kísérletünk alapján bebizonyosodott, hogy a levosimendan és aktív metabolitja, az OR-1896 a patkány cremaster izom arterioláiban *in vivo* hatékony vazodilatációt vált ki, amelyben a K_{ATP} csatorna aktivációja játszik vezető szerepet. A levosimendan és az OR-1896 által kiváltott reakciók azonos mértékűek voltak, tehát a metabolit ezen a preparátumon az anyavegyülettel azonos hatást váltott ki.



18. ábra A patkány cremaster izom arterioláin megfigyelt érátmérő változások A. ábra: levosimendan növekvő koncentrációinak (1 nM - 100 μ M, n=4), vagy B. ábra: OR-1896 növekvő koncentrációinak (1 nM - 100 μ M, n=4) alkalmazása után, glibenclamid (5 μ M, n=5) inkubáció előtt és után. Az adatok az átlagos átmérőket mutatják, $\pm$ SEM. * Szignifikáns eltérés a nyugalmi érátmérőhöz vagy az oldószer jelenlétében mért átmérőhöz viszonyítva ($P < 0,05$). 0 M: indulási átmérő

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 A mérsékelt, lokális hiperkalémia okozta vazodilatációért a K_{IR} csatorna volt felelős. A nyugalmi értónus fenntartásában a K_{ATP} csatorna is szerepet játszott

A mérsékeltten emelkedő koncentrációjú KCl oldat (10 mM) értágító hatásának bizonyult az általunk alkalmazott kísérletes modellben. A K^+ koncentráció emelésével létrejövő vazodilatáció nagy valószínűséggel a vaszkuláris simaizomsejteken megtalálható K_{IR} csatorna aktiválása révén fejtette ki hatását, mivel alacsony koncentrációjú báriummal ezt a hatást gátolni tudtuk, míg az iberiotoxin (a K_{Ca} csatorna gátlószere) és a glibenclamid (K_{ATP} csatorna gátlószere) hatástalannak bizonyult. Eredményeink összhangban állnak más tanulmányok eredményeivel. Edwards izolált patkány hepaticus és mezenterialis erein bizonyította, hogy a K^+ indukált vazodilatáció K_{IR} csatornák aktivációja révén jött létre [Edwards és mtsai 1998]. Kísérleteink funkcionális bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a K_{IR} csatorna megtalálható a patkányok cremaster izmának arterioláin és *in vivo* részt vesz a K^+ koncentráció emelésével létrejövő vazodilatáció kiváltásában. A bárium szerepe ismert ugyan más típusú K^+ csatornák működésének gátlásában, azonban az általunk alkalmazott alacsony koncentrációban úgy képes gátolni a K_{IR} csatornákat, hogy gyakorlatilag ineffektív a K_{ATP} , K_{Ca} és K_v csatornákon [Nelson és Quayle 1995]. A K^+ koncentráció emelkedésével kiváltott értágulatban a perifériás idegek direkt stimulációjának lehetséges szerepét Stekiel munkájában kizárta, mivel a válaszreakciót nem befolyásolta sem a szimpatikus idegvégződés roncsolása 6-hydroxydopamine-al, sem a tetrodotoxin, phentolamine és propranolol hozzáadása a mosófolyadékhoz a neuronális és katekolamin aktivitás gátlása céljából [Lombard és Stekiel 1995].

Eredményeink azt is megmutatták, hogy normál (5 mM K^+) körülmények között a K_{IR} csatorna mellett a K_{ATP} csatorna is szerepet játszik a vizsgált arteriolák nyugalmi értónusának fenntartásában. Glibenclamid alkalmazása a patkány cremaster izom negyedrendű arterioláinak szignifikáns szűkületét okozta. Ezt a jelenséget már korábban észlelték hörcsög arteriolákon is [Jackson 1993]. Irodalmi adatok alapján a K_{Ca} csatornák fontos szerepet töltenek ugyan be az izolált agyi, koszorú és mezenterialis erek nyugalmi tónusának fenntartásában, mivel a csatorna egyik gátlószerevel, a charybdotoxinnal csökkenthető volt ezek nyugalmi átmérője [Clark és Fuchs 1997, Nelson és Quayle 1995]. Azonban a patkány vázizom erein sem nekünk, sem más tanulmányoknak nem

sikerült igazolni a K_{Ca} csatornák szerepét a nyugalmi tónus fenntartásában [Jackson és Blair 1998].

Kísérleteinkkel igazoltuk a K_{IR} és a K_{ATP} csatornák szerepét a nyugalmi értónus fenntartásában a patkány harántcsíkolt izmában *in vivo*. Eredményeink első ízben szolgáltatják funkcionális bizonyítékát annak, hogy a K_{IR} csatorna megtalálható a patkányok cremaster izmának negyedrendű arterioláin és részt vesz a K^+ koncentráció emelésével létrejövő vazodilatáció kiváltásában.

6.2 A NO és EDHF egyensúlya felborul egyes volatilis anesztetikumok alkalmazása mellett.

Kísérlet sorozatunkban azt vizsgáltuk, hogy az anesztézia vezetéséhez választott ágensnek (izoflurán, halotán, ketamin) van-e befolyásoló szerepe az agonisták által kiváltott endotélium-függő, NO és EDHF által mediált vazodilatációkra a patkányok cremaster izmában, *in vivo*.

A halogénezett inhalációs anesztetikumokról ismert, hogy csökkentik a vaszkuláris rezisztenciát. Ennek hatásmechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott. A ma kibontakozó elképzelés szerint a volatilis anesztetikumok gátolják ugyan az endotélium-függő vazodilatációt, ugyanakkor fokozzák az endotéliumtól független vaszkuláris simaizom relaxációt. Ez utóbbi folyamat feltételezett hátterében az intracelluláris Ca^{2+} elérhetőségének és az érfal simaizom Ca^{2+} -iránti szenzitivitásának csökkenése állhat [Akata 2007, Villeneuve és mtsai 1991]. Ennek a két, egymást kiegészítő hatásnak az eredménye összességében az értónus elvesztése.

A ketamin fokozza az erek tónusát, melyet elsősorban katekolamin felszabadítás révén ér el, bár *in vitro* körülmények között endotélium-függő vazodilatáció gátlást is kimutattak (a NO és EDHF mechanizmusok gyengítése révén) [Ogawa és mtsai 2001]. *In vivo* azonban a mai napig igen kevés kísérletes adat áll rendelkezésünkre a különböző anesztetikumok mikrocirkulációban betöltött módosító szerepére vonatkozóan.

Számos *in vitro* tanulmány vizsgálta a különböző volatilis anesztetikumok hatását az EDHF mediált vazodilatációra izolált ereken. Lischke demonstrálta, hogy a desflurán, enflurán, szevoflurán, halotán, és izoflurán egyaránt gátolta az ACh által kiváltott EDHF mediált választ nyúl carotis artériájából izolált preparátumokon. Az izoflurán volt mind között a legerélyesebb EDHF inhibítor [Lischke és mtsai 1995]. Hasonló eredményről

számolt be Akata is, aki kimutatta, hogy az ekvipotens dózisban alkalmazott izoflurán, enflurán és szevoflurán gátolta az ACh kiváltott, EDHF mediált relaxációt a nyúl mesenterialis kiserek izolátumain [Akata és mtsai 1995]. Mi nem tudtuk kimutatni, hogy a halotán gátolná az EDHF mechanizmust az agonisták által kiváltott érválaszokban. A fent említett tanulmányok a klinikailag alkalmazott altatószer koncentrációkat meghaladó dózisokat alkalmaztak, így az eredmények nehezen vethetőek össze az *in vivo* észlelt tapasztalatokkal. Az eredményekben észlelhető különbséget az eltérő faj, ill. a vizsgált erek eltérő mérete is magyarázhatja. Az általunk végzett vizsgálat értelemszerűen mindig valamely anesztetikum jelenlétében zajlott, így nem volt lehetőségünk arra, hogy anesztetikum nélküli, kontroll vizsgálatokat végezzünk.

Jelen munkánkban három különböző anesztetikum mikrocirkulációra gyakorolt hatását hasonlítottuk össze a patkányok cremaster izmában, a negyedrendű arteriolák szintjén *in vivo*. Feltételeztük, hogy az egyes anesztetikumok befolyásolni képesek a NO és az EDHF szerepét az ACh és a BK által kiváltott értágulatban. A NOS gátlására L-NMMA-t, az EDHF blokkolására pedig magas extracelluláris K^+ koncentrációt alkalmaztunk. A prosztaglandin szintézist minden kísérletben gátoltuk indometacinnal. A NO és EDHF útvonal külön-külön blokkolásával ezen mechanizmusok részvételi arányát tudtuk összehasonlítani az agonisták által létrehozott vazodilatációban *in vivo*, a a különböző anesztetikumok alkalmazása esetén.

Az L-NMMA intravénás alkalmazását követően a szisztolés vérnyomások szignifikáns emelkedését figyeltük meg, mindegyik anesztetikum alkalmazása mellett. Ez arra utalt, hogy a NO rendszer aktív volt mindegyik esetben. Arra, hogy miért csak az izofluránnál tudtunk a NO rendszer gátlásával csökkent érválaszt kimutatni, nincs egyértelmű magyarázatunk. Valószínűleg a NO szerepe nem a vizsgált vázizom erek negyedrendű arterioláin volt a legkifejezettebb. Lehetséges, hogy más szervek erein, vagy az oszlási fa más résztvevőin eltérő eredményeket kaptunk volna.

Arra sincs egyértelmű magyarázatunk, hogy a halotán jelenléte miért fokozta az adozinra adott érválaszt L-NMMA kezelés alatt. Ezt a jelenséget csak normál (5 mM K^+) használatakor figyeltük meg.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az anesztetikumok képesek befolyásolni a NO-dependens és NO-független vazodilatáció egyensúlyát. Izoflurán anesztézia során a NO –függő folyamat kerül előtérbe mind az ACh, mind a BK hatására létrejövő

vazodilatációnál a fenti kísérletes modellben, mivel a NOS rendszer gátlásával az agonisták által kiváltott vazodilatáció mértéke is csökkent. Ez a gátlás működő EDHF mechanizmus esetén (5 mM K⁺) szignifikáns volt, az EDHF rendszer gátlása után már nem volt konzekvensen megfigyelhető. Ugyanilyen körülmények mellett sem az ACh, sem a BK okozta vazodilatáció nem volt befolyásolható a NOS rendszer gátlásával halotán és ketamin anesztézia alatt.

6.3 A levosimendan és aktív metabolitja a K_{ATP} csatorna aktiválásával hozza létre a perifériás vazodilatatív hatását a fenti kísérletes modellben.

6.3.1 A levosimendan és az OR-1896 erőteljes vazodilatációt váltott ki in vivo

Kísérletünk alapján bebizonyosodott, hogy a levosimendan és annak hosszú féléletidejű, pozitív inotróp hatású aktív metabolitja, az OR-1896 a patkány cremaster izom arterioláiban *in vivo* hatékony vazodilatációt vált ki, amelyben a K_{ATP} csatorna aktivációja játszik vezető szerepet.

A rövid élettartamú levosimendan intravénás alkalmazása után megfigyelt hemodinamikai válasz időben hosszan elhúzódó hatása [Kivikko és mtsai 2002, Kivikko és mtsai 2003] egyrészt a levosimendan és OR-1896 nevű aktív metabolitjának eltérő féléletidejével [Kivikko és mtsai 2002, Sandell és mtsai 1995], másrészt a plazma proteinekhez történő különböző mértékű kötődési affinitásával magyarázható [Papp és mtsai 2004, Szilagyi és mtsai 2004]

Az elmúlt években bebizonyosodott, hogy az OR-1896 kedvező hemodinamikai hatásai nem csak annak köszönhetőek, hogy a kalcium érzékenyítő képessége a levosimendanéhoz hasonló, hanem annak erőteljes vazodilatátor tulajdonságával is rendelkezik, amint ezt patkányból származó izolált koronária és vázizom ereken már demonstrálták [Erdei és mtsai 2006]. Mind a levosimendan, mind az OR-1896 értágító képességét több kísérlet igazolta *ex vivo*, a 100 µm-nél nagyobb artériák és vénák esetében [Ambrus és mtsai 2012, Pataricza és mtsai 2000, Pataricza és mtsai 2003]. Ezenkívül, többen indirekt úton, a szerek intravénás infundálását követően, a szisztémás vaszkuláris rezisztencia változásának rögzítésével következtettek a levosimendan és az OR-1896 mikrocirkulációs hatására *in vivo*. [Banfor és mtsai 2008, Segreti és mtsai 2008]. Azonban a rezisztencia ereken (20-25 µm) kifejtett közvetlen hatásukat kísérleteinket megelőzően még senki nem írta le *in vivo*.

Vizsgálataink során a levosimendan és az OR-1896 hatását vizsgáltuk intravitalis mikroszkópia segítségével, altatott patkányok cremaster izmának harmad és negyedrendű arterioláin (20-25 μm). Eredményeink bizonyították, hogy mindkét szer erőteljes vazodilatációt vált ki a megfigyelt ereken *in vivo*, melyet nem antagonizált semmilyen kardiovaszkuláris reflex. A levosimendan és az OR-1896 által kiváltott maximális dilatáció minden vizsgált dózis esetében azonos volt, a két szer hatásában nem találtunk különbséget, tehát a metabolit ezen a preparátumon az anyavegyülettel azonos hatást váltott ki.

Külön szeretném kiemelni azt a tényt, hogy a klinikailag releváns 10 nM-os koncentrációnál is szignifikáns vazodilatációt észleltünk ($P < 0.05$, ANOVA, Dunnett teszt, több csoport összehasonlítása kontroll csoporttal). Ezek az eredmények összhangban vannak a mások által korábban elvégzett *in vitro* kísérletek megfigyeléseivel [Erdei és mtsai 2006].

6.3.2 A levosimendan és OR-1896 által kiváltott vazodilatációban a K_{ATP} csatorna aktivációja döntő szerepet játszik

A levosimendan hatására bekövetkező K_{ATP} csatorna aktivációt először feszültség- és áramzár technikákkal mutatták ki patkány vaszkuláris simaizomsejtekből és izolált ventrikuláris szívizom sejtekből [Yokoshiki és mtsai 1997, Yokoshiki és mtsai 1997]. Mivel a levosimendan által kiváltott kálium csatorna aktivációt glibenclamiddal sikeresen gátolni tudták, arra a következtetésre jutottak, hogy a levosimendan a vaszkuláris simaizomsejt hiperpolarizációját okozza a K_{ATP} csatornák aktiválódása révén. Ezután számos tanulmány igazolta a fenti elméletet, különböző vaszkuláris preparátumokon [De Witt és mtsai 2002, Erdei és mtsai 2006, Hohn és mtsai 2004, Kaheinen és mtsai 2001]. Jelen tanulmányunk eredményei illeszkednek a korábbi, izolált ereken végzett tanulmányok következtetéseivel és alátámasztják a levosimendan *in vivo* hatásmechanizmusáról alkotott ismereteinket a mikrocirkuláció szintjén.

A korábbi kutatások alapján felmerült, hogy a levosimendan által kiváltott vazodilatációért csak részben felelős a K_{ATP} csatorna aktivációja. Egyes, relatíve nagyobb átmérőjű (nem vázizomból származó) érpreparátumok esetében a BK_{Ca} és/vagy a feszültség függő kálium csatornák gátlószereivel sikeresen blokkolták a levosimendan hatás glibenclamidtól független komponensét *in vitro* [Erdei és mtsai 2006, Hohn és

mtsai 2004, Pataricza és *mtsai* 2000, Pataricza és *mtsai* 2003]. Laboratóriumunk korábbi eredményei és a fenti tanulmányok ugyanakkor rámutattak arra, hogy amíg a BK_{Ca} csatornák meghatározó szerepet töltenek be a koronária erek OR-1896 hatására kialakuló dilatációjában, addig a vázizomzat ereiben kialakuló dilatációban a szerepük elhanyagolható [Erdei és *mtsai* 2006].

Munkánk során célul tűztük ki annak meghatározását, hogy a K_{ATP} csatorna aktivációja milyen arányban vesz részt a levosimendan és az OR-1896 hatására kialakuló vazodilatációban a patkány cremaster izom arterioláiban *in vivo*. Megállapítottuk, hogy a levosimendan, és az OR-1896 hatását azonos mértékben tudtuk gátolni a K_{ATP} csatorna szelektív inhibitorával, a glibenclamiddal. Az inhibíció mértéke hasonló volt a csatornát aktiváló pinacidil és a glibenclamid együttes jelenlétében kialakult gátláshoz. A glibenclamid alkalmazása mellett a levosimendan és az OR-1896 vazodilatatív hatása gyakorlatilag megszűnt. Ezzel igazoltuk, hogy a K_{ATP} csatorna meghatározó szerepet tölt be a levosimendan és metabolitja által a cremaster izom arterioláin létrehozott vazodilatációban. Ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a kísérleteket értelemszerűen hím állatokon végeztük. Irodalmi adatok alapján feltételezhető ugyanis, hogy a K_{ATP} csatornák megoszlása és mikrocirkulációban betöltött szerepe az ér típusa, oszlási rendje mellett a nemtől függően is változhat [Akar és *mtsai* 2007]. Jelenleg még nem pontosan tisztázott az a kérdés, hogy miért különböznek ennyire a levosimendan hatására kialakuló vaszkuláris reakciók a különböző értípusok és fajok esetében. Feltételeztük, hogy a K_{ATP} és BK_{Ca} csatornák expressziója és/vagy szabályozása a különböző érpreparátumoknál eltérő lehet, mint azt már többen megfogalmazták [Michelakis és *mtsai* 1997, Sun és *mtsai* 2004]. Eredményeink nem támogatják az a hipotézist, mely szerint egyéb vazodilatátor mechanizmusok, pl. cAMP közvetített vazodilatáció [Sato és *mtsai* 1998, Takahashi és *mtsai* 2000] is részt venne a levosimendan és metabolitja által kiváltott vazodilatációban az általunk vizsgált preparátumon. Ezzel szemben a két ágens egyenrangúan potens vazodilatátor volt *in vitro* és *in vivo* egyaránt, glibenclamiddal mindkettő hatása gátolható volt, ugyanakkor a foszfodiészteráz enzim gátlása terén markáns különbség volt megfigyelhető a levosimendan és metabolitja között, munkacsoportunk korábbi eredményei alapján [Papp és *mtsai* 2012, Szilagyi és *mtsai* 2004].

Eredményeink bemutatásakor ki kell térnünk arra az ellentmondásra, amelyet az első kísérletsorozat és a jelenleg tárgyalt tanulmány eredményeinek összevetésekor találtunk.

Korábban azt mutattuk be, hogy 5 mM K^+ koncentráció mellett az erek nyugalmi tónusát a glibenclamid alkalmazása csökkentette, vagyis a K_{ATP} csatornák szerepet játszottak a nyugalmi értónus fenntartásában. Ebben a kísérlet sorozatban nem sikerült változást kimutatnunk glibenclamid jelenlétében a nyugalmi értónusra. Mivel ugyanazon faj, ugyanolyan nemű, korú egyedeit vizsgáltuk, azonos technikával készült preparátumon, az egyetlen lehetséges különbséget az anesztézia módjában találtuk (halotán és pentobarbitál). Mint azt demonstráltuk, az anesztetikum választás meghatározó szerepet tölthet be a rezisztencia erek reakcióiban.

Fent bemutatott eredményeink alapján elsőként igazoltuk azt, hogy a levosimendan és OR-1896 nevű metabolitja a szisztémás keringés egyes rezisztencia ereiben azonos mechanizmussal fejt ki hatását: a K_{ATP} csatornák aktivációja révén dilatálja a patkány cremaster izom arterioláit *in vivo*. Feltételezhetően a levosimendan és metabolitja mikrovasculáris rezisztenciát csökkentő hatása legalább részben a fenti mechanizmus révén valósul meg a szervezet többi vázizmában is, és ez által szerepet játszik a levosimendan hatására bekövetkező rövid és hosszútávú hemodinamikai hatásokban.

6.4 Az eredmények jelentősége a gyakorlati életben

Eredményeim segítenek megérteni a mikroerek szintjén zajló szabályozási folyamatokat. Hozzájárulnak ahhoz, hogy átfogóbb képet kapjunk az alkalmazott gyógyszerek hatásmechanizmusáról. Mindezen ismeretek iránymutatóak lehetnek további kísérletek tervezése során, illetve lehetőséget biztosíthatnak újabb terápiás eljárások kialakításához.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Munkámban a negyedrendű arteriolák érátmérő változását vizsgáltuk anesztetizált patkány cremaster izmában, három különböző kísérletsorozatban. Ezek mindegyikében a kipreparált izom felszínére juttattunk különböző vazóaktív anyagokat, majd intravitális videomikroszkópia révén rögzítettük az érátmérő változásokat. Először az erek nyugalmi tónusának fenntartásában résztvevő ioncsatornákat tártuk fel. 5 mM K^+ mellett az erek átmérőjét a glibenclamid és a bárium szignifikánsan csökkentette, míg az iberiotoxin ineffektív volt. Eredményeink alapján a vizsgált erek nyugalmi tónusát a K_{IR} és a K_{ATP} csatornák határozták meg. Ezt követően 10 mM K^+ koncentrációjú pufferrel váltottunk ki vazodilatációt bárium, glibenclamid vagy iberiotoxin jelenlétében. Egyedül a bárium jelenléte akadályozta meg az érválaszt, tehát a vazodilatációért a K_{IR} csatornák voltak felelősek.

Munkám második részében azt vizsgáltam, hogy az anesztetikum választás (halotán, izoflurán vagy ketamin) befolyásolja-e a NO és az EDHF hozzájárulását az agonisták (acetilkolin, bradikinin) által kiváltott vazodilatációhoz. A NO szintézist gátló L-NMMA alkalmazása izoflurán anesztézia során az ACh és BK vazodilatatív hatását megakadályozta, de nem volt hatásos a halotán és ketamin anesztézia alkalmazásakor. Eredményeink azt mutatják, hogy az anesztetikumok megválasztása befolyásolja az endotélium-függő vazodilatáció mechanizmusát *in vivo*, azaz a mikrocirkulációt vizsgáló kísérletek kimenetele függhet az alkalmazott anesztetikumtól. Izoflurán anesztézia mellett a NO-függő folyamat dominánssá válik, míg az EDHF szerepe háttérbe szorul.

Dolgozatom harmadik részében a levosimendan és aktív metabolitja, az OR-1896 rezisztencia erekre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A levosimendan és az OR-1896 azonos mértékű, koncentráció-függő vazodilatációt váltott ki a vizsgált mikroereken. Hipotézisünk szerint ezt az értágulatot a K_{ATP} csatorna közvetíti, ezért először demonstráltuk e csatorna élettanai funkcióját a preparátumon a K_{ATP} csatorna nyitó pinacidilre kiváltott dilatációval és ennek gátolhatóságát a K_{ATP} csatorna gátló glibenclamiddal. A glibenclamid ugyanolyan koncentrációkban alkalmazva gátolta a levosimendan és az OR-1896 által kiváltott érválaszokat is. Ezzel igazoltuk, hogy a levosimendan és az OR-1896 a patkány cremaster izom arterioláiban *in vivo* hatékony vazodilatációt vált ki, amelyben a K_{ATP} csatorna aktivációja játszik vezető szerepet.

8 SUMMARY

We studied the changes in the diameter of fourth order cremaster arterioles of anaesthetised rats, using intravital videomicroscopy technique in three different sets of experiments. The various agents studied were added to the superfusate of the muscle in all experiments. At first we investigated the contribution of different types of K^+ channels to the maintenance of the resting vessel tone. At 5 mM K^+ vessel diameters were significantly decreased by glibenclamide and barium, but not by iberiotoxin, suggesting that basal diameter of the vessels was regulated by K_{IR} and K_{ATP} channels. Subsequently, we studied how barium, glibenclamide or iberiotoxin, the specific inhibitors of K_{IR} , K_{ATP} and K_{Ca} channels, respectively, influence the reaction of the blood vessels to 10 mM K^+ concentration. We found that barium prevented K^+ -induced dilation only, i.e., the K_{IR} channel can be responsible for the K^+ -induced vasodilation in fourth order arterioles of the rat cremaster muscle.

In the next section of our study we investigated if the choice of anaesthetics (isoflurane, halothane or ketamine) alters the balance between NO and EDHF in agonist (acetylcholine, ACh or bradykinin, BK) induced vasodilation. L-NMMA, the inhibitor of NO synthase abolished the agonist induced vasodilation during isoflurane, but not halothane or ketamine anaesthesia. Our data suggest that anaesthetics can alter the pathway of endothel derived vasodilation in vivo, i.e., the outcome of in vivo vascular-biology experiments may depend on the choice of anaesthetics: NO dependent mechanisms are enhanced and EDHF action is inhibited during isoflurane anaesthesia.

In the last set of experiments we investigated the in situ effects of levosimendan and its metabolite OR-1896 in vivo. We found that the two compounds induced arteriolar dilations with identical dose-response relationships. The vasodilation-response of the arterioles to pinacidil, the opener of the K_{ATP} channel, and the inhibition of this response by the selective K_{ATP} channel blocker glibenclamide demonstrated the function of this channel in regulating vascular tone. Glibenclamide counteracted the arteriolar dilation in response to levosimendan or OR-1896 and thus, the K_{ATP} channel was isolated as a target of these vasoactive compounds. In conclusion, this was the first study to demonstrate that Levosimendan and OR-1896 elicit arteriolar dilation in vivo, via activation of K_{ATP} channels in real resistance vessels in the rat cremaster muscle.

9 GYAKRAN ELŐFORDULÓ RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC: adenilcikláz

ACh: acetilkolin

ADO: adenzin

BH₄: tetrahidrobiopterin

BK: bradikinin

BK_{Ca}: nagy konduktanciájú Ca²⁺ -aktivált K⁺ csatorna, K_{Ca}1.1

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

COX: ciklooxygenáz

cTnC: troponin C

CYP450 2c: citokrórn P450 2C enzim

DMSO: dimethyl-sulfoxid

EDHF: endotéliumból származó hiperpolarizáló faktor

EDRF: endotélium eredetű relaxációs faktor

EET: epoxieikozatrién sav

eNOS: endotélium eredetű nitrogén-monoxid szintetáz

FiO₂: Az oxigén aránya a belégzett gázkeverékben

IbTX: iberiotoxin

IK_{Ca} : közepes konduktanciájú Ca²⁺ -aktivált K⁺ csatornák, K_{Ca}3.1

iNOS indukálható nitrogén-monoxid szintetáz

IP: prosztaciklin receptor

K_{ATP}: ATP szenzitív K⁺ csatorna

K_{Ca}: calcium aktiválta K⁺ csatorna

K_{IR}: befelé egyenirányító K⁺ csatorna

Kv: feszültség kapuzott K⁺ csatorna

Levosimendan: (-)-0-ciano-N-{4-[(4R)-4-metil-6-oxo-1,4,5,6-tetrahidropiridazin -3-il]fenil}metánkarbohidrazonoil-cianid

L-NMMA: N^G-monomethyl-L-arginin

MAC: minimum alveoláris koncentráció

nNOS idegi eredetű nitrogén-monoxid szintetáz

NO: nitrogén-monoxid

OR-1896: [N-(4-(1,4,5,6-tetrahidro-4-metil-6-oxo-3-piridazinil)fenil]acetamid(-) enantiomerje

PaCO₂ : CO₂ parciális nyomás

PaO₂ : O₂ parciális nyomás

PGI₂: prosztaciklin

PKGI: cGMP dependens protein kináz I

PLA₂: foszfolipáz A2

SERCA: szarko-endoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATP-áz

sGC: szolubilis guanilát cikláz

SK_{Ca} : kis konduktanciájú Ca²⁺ -aktivált K⁺ csatorna, K_{Ca2.x}

SOD: szuperoxid-dizmutáz

VSM: vaszkuláris simaizom

10 IRODALOMJEGYZÉK

10.1 A disszertáció alapját képző közlemények jegyzéke

Az előzetes bírálaton elhangzottaknak megfelelően a PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények között kérem figyelembe venni az egyéb közlemények között 4. számmal jelzett közleményt is, mivel az előzetes bíráló bizottság megítélése szerint egy adminisztratív intézkedés (lap-család kialakítás) miatt került az Am. J. Physiol.-ban megjelent közlemény „nem impakt faktoros” közlemények közé.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/313/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gödény Ildikó
Neptun kód: B923OP
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10064901

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gödény, I.**, Pollesello, P., Édes, I., Papp, Z., Bagi, Z.: Levosimendan and its metabolite OR-1896 elicit KATP channel-dependent dilation in resistance arteries in vivo.
Pharmacol Rep. 65, 1304-1310, 2013.
IF: 2.165
2. Loeb, A. L., **Gödény, I.**, Longnecker, D. E.: Functional Evidence for Inward-Rectifier Potassium Channels in Rat Cremaster Muscle Arterioles.
Microvasc. Res. 59 (1), 1-6, 2000.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/mvre.1999.2187>
IF: 2.016



10.2 Egyéb közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

3. Nagy, L., **Gődény, I.**, Ifj., N. P. P., Leskó, Á., Balogh, L., Bánhegyi, V., Bódi, B., Csípő, T., Csongrádi, A., Fülöp, G. Á., Kovács, Á., Lódi, M., Papp, Z.: A szív pozitív inotróp támogatása a miozin-aktivátor hatású omecantiv-mecarbil segítségével.
Cardiol. Hung. 47 (1), 69-76, 2017.
4. Loeb, A. L., **Gődény, I.**, Longnecker, D. E.: Anesthetics alter relative contributions of NO and EDHF in rat cremaster muscle microcirculation.
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 272, H618-H627, 1997.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.2.H618>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,181

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,181**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.09.24.



10.3 Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Adeagbo AS, Triggle CR. Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1993;21:423-429.
2. Aguirre JA, Lucchinetti E, Clanachan AS, Plane F, Zaugg M. Unraveling Interactions Between Anesthetics and the Endothelium: Update and Novel Insights. *Anesthesia and analgesia*. 2016;122:330-348.
3. Akar F, Manavbasi Y, Parlar AI, Ulus AT, Katircioglu SF. The gender differences in the relaxation to levosimendan of human internal mammary artery. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2007;21:331-338.
4. Akata T. General anesthetics and vascular smooth muscle: direct actions of general anesthetics on cellular mechanisms regulating vascular tone. *Anesthesiology*. 2007;106:365-391.
5. Akata T, Nakashima M, Kodama K, Boyle WA, 3rd, Takahashi S. Effects of volatile anesthetics on acetylcholine-induced relaxation in the rabbit mesenteric resistance artery. *Anesthesiology*. 1995;82:188-204.
6. Ambrus N, Szolnoky J, Pollesello P, Kun A, Varro A, Papp JG, Pataricza J. Prolonged antispasmodic effect in isolated radial artery graft and pronounced platelet inhibition induced by the inodilator drug, levosimendan. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2012;110:269-274.
7. Armstrong ML, Dua AK, Murrant CL. Potassium initiates vasodilatation induced by a single skeletal muscle contraction in hamster cremaster muscle. *The Journal of physiology*. 2007;581:841-852.
8. Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular research*. 1973;5:384-394.
9. Banfor PN, Preusser LC, Campbell TJ, Marsh KC, Polakowski JS, Reinhart GA, Cox BF, Fryer RM. Comparative effects of levosimendan, OR-1896, OR-1855, dobutamine, and milrinone on vascular resistance, indexes of cardiac function, and O₂ consumption in dogs. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H238-248.
10. Belletti A, Castro ML, Silvetti S, Greco T, Biondi-Zoccai G, Pasin L, Zangrillo A, Landoni G. The Effect of inotropes and vasopressors on mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *British journal of anaesthesia*. 2015;115:656-675.
11. Bellien J, Thuillez C, Joannides R. Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2008;22:363-377.
12. Beny JL, Pacicca C. Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *The American journal of physiology*. 1994;266:H1465-1472.
13. Blaise G, Guy C, To Q, Sauve R. Do enflurane and isoflurane interfere with the release, action, or stability of endothelium-derived relaxing factors? *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie*. 1997;44:550-558.
14. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23:374-380.
15. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity research*. 2003;11:1278-1289.

16. Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *British journal of pharmacology*. 1988;95:1165-1174.
17. Chrissobolis S, Sobey CG. Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone. *Current drug targets*. 2003;4:281-289.
18. Clark SG, Fuchs LC. Role of nitric oxide and Ca^{++} -dependent K^+ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;282:1473-1479.
19. de Klaver MJ, Buckingham MG, Rich GF. Isoflurane pretreatment has immediate and delayed protective effects against cytokine-induced injury in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology*. 2003;99:896-903.
20. De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1982;222:166-173.
21. De Witt BJ, Ibrahim IN, Bayer E, Fields AM, Richards TA, Banister RE, Kaye AD. An analysis of responses to levosimendan in the pulmonary vascular bed of the cat. *Anesthesia and analgesia*. 2002;94:1427-1433, table of contents.
22. Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;89:122-135.
23. Duling BR. Microvascular responses to alterations in oxygen tension. *Circulation research*. 1972;31:481-489.
24. Duling BR. Changes in microvascular diameter and oxygen tension induced by carbon dioxide. *Circulation research*. 1973;32:370-376.
25. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998;396:269-272.
26. Eger EI, Johnson BH. Rates of awakening from anesthesia with I-653, halothane, isoflurane, and sevoflurane: a test of the effect of anesthetic concentration and duration in rats. *Anesthesia and analgesia*. 1987;66:977-982.
27. Enlund M, Berglund A, Andreasson K, Cicek C, Enlund A, Bergkvist L. The choice of anaesthetic--sevoflurane or propofol--and outcome from cancer surgery: a retrospective analysis. *Upsala journal of medical sciences*. 2014;119:251-261.
28. Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Edes I, Bagi Z. The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the $\text{K}(\text{ATP})$ and $\text{BK}(\text{Ca})$ channels in rat isolated arterioles. *British journal of pharmacology*. 2006;148:696-702.
29. Feletou M. The Endothelium: Part 2: EDHF-Mediated Responses "The Classical Pathway". San Rafael (CA)2011.
30. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA)2011.
31. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2006;26:1215-1225.
32. Feng J, Anderson K, Liu Y, Singh AK, Ehsan A, Sellke FW. Cyclooxygenase 2 contributes to bradykinin-induced microvascular responses in peripheral arterioles after cardiopulmonary bypass. *J Surg Res*. 2017;218:246-252.

33. Fleming I. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2004;49:525-533.
34. Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L, Steering C, Investigators of the Levosimendan Infusion versus Dobutamine S. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet*. 2002;360:196-202.
35. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
36. Gamperl AK, Hein TW, Kuo L, Cason BA. Isoflurane-induced dilation of porcine coronary microvessels is endothelium dependent and inhibited by glibenclamide. *Anesthesiology*. 2002;96:1465-1471.
37. Gibbons GH. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *The American journal of cardiology*. 1997;79:3-8.
38. Gross SS, Kilbourn RG, Griffith OW. NO in septic shock: good, bad or ugly? Learning from iNOS knockouts. *Trends in microbiology*. 1996;4:47-49.
39. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews*. 2010;90:291-366.
40. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological reviews*. 2006;86:1-23.
41. Hohn J, Pataricza J, Petri A, Toth GK, Balogh A, Varro A, Papp JG. Levosimendan interacts with potassium channel blockers in human saphenous veins. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2004;94:271-273.
42. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Rabelink TJ. Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension*. 2000;35:1314-1318.
43. Hu G, Schwartz DE, Shajahan AN, Visintine DJ, Salem MR, Crystal GJ, Albrecht RF, Vogel SM, Minshall RD. Isoflurane, but not sevoflurane, increases transendothelial albumin permeability in the isolated rat lung: role for enhanced phosphorylation of caveolin-1. *Anesthesiology*. 2006;104:777-785.
44. Iranami H, Hatano Y, Tsukiyama Y, Yamamoto M, Maeda H, Mizumoto K. Halothane inhibition of acetylcholine-induced relaxation in rat mesenteric artery and aorta. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. 1997;44:1196-1203.
45. Jackson WF. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *The American journal of physiology*. 1993;265:H1797-1803.
46. Jackson WF, Blair KL. Characterization and function of Ca(2+)-activated K⁺ channels in arteriolar muscle cells. *The American journal of physiology*. 1998;274:H27-34.
47. Johns RA, Tichotsky A, Muro M, Spaeth JP, Le Cras TD, Rengasamy A. Halothane and isoflurane inhibit endothelium-derived relaxing factor-dependent cyclic guanosine monophosphate accumulation in endothelial cell-vascular smooth muscle co-cultures independent of an effect on guanylyl cyclase activation. *Anesthesiology*. 1995;83:823-834.

48. Johnson TD, Marrelli SP, Steenberg ML, Childres WF, Bryan RM, Jr. Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery. *The American journal of physiology*. 1998;274:R541-547.
49. Julier K, da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, Chassot PG, Schmid ER, Turina MI, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology*. 2003;98:1315-1327.
50. Kaheinen P, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H. Levosimendan increases diastolic coronary flow in isolated guinea-pig heart by opening ATP-sensitive potassium channels. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2001;37:367-374.
51. Kaley G, Rodenburg JM, Messina EJ, Wolin MS. Endothelium-associated vasodilators in rat skeletal muscle microcirculation. *The American journal of physiology*. 1989;256:H720-725.
52. Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Coey U, Green JV. Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *Journal of applied physiology*. 2005;98:629-632.
53. Kirstetter P, Lagneau F, Lucas O, Krupa Y, Marty J. Role of endothelium in the modulation of isoflurane-induced vasodilatation in rat thoracic aorta. *British journal of anaesthesia*. 1997;79:84-87.
54. Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikainen PJ. Pharmacodynamics and safety of a new calcium sensitizer, levosimendan, and its metabolites during an extended infusion in patients with severe heart failure. *Journal of clinical pharmacology*. 2002;42:43-51.
55. Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikainen PJ. Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2002;40:465-471.
56. Kivikko M, Lehtonen L, Colucci WS. Sustained hemodynamic effects of intravenous levosimendan. *Circulation*. 2003;107:81-86.
57. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of arterial diameter and wall $[Ca^{2+}]$ in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *The Journal of physiology*. 1998;508 (Pt 1):199-209.
58. Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Bignami E, Morelli A, Guarracino F, Zangrillo A. Effects of levosimendan on mortality and hospitalization. A meta-analysis of randomized controlled studies. *Critical care medicine*. 2012;40:634-646.
59. Lischke V, Busse R, Hecker M. Inhalation anesthetics inhibit the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the rabbit carotid artery. *Anesthesiology*. 1995;83:574-582.
60. Lombard JH, Stekiel WJ. Responses of cremasteric arterioles of spontaneously hypertensive rats to changes in extracellular K^{+} concentration. *Microcirculation*. 1995;2:355-362.
61. Massey MJ, Shapiro NI. A guide to human in vivo microcirculatory flow image analysis. *Crit Care*. 2016;20:35.
62. McCarron JG, Halpern W. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *The American journal of physiology*. 1990;259:H902-908.
63. Mebazaa A, Nieminen MS, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber FX, Pocock SJ, Thakkar R, Padley RJ, Poder P, Kivikko M, Investigators S. Levosimendan vs

- dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial. *Jama*. 2007;297:1883-1891.
64. Michaels AD, McKeown B, Kostal M, Vakharia KT, Jordan MV, Gerber IL, Foster E, Chatterjee K. Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake. *Circulation*. 2005;111:1504-1509.
 65. Michelakis ED, Reeve HL, Huang JM, Tolarova S, Nelson DP, Weir EK, Archer SL. Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1997;75:889-897.
 66. Moiseyev VS, Poder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik LB, Kobalava ZD, Lehtonen LA, Laine T, Nieminen MS, Lie KI, Investigators RS. Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *European heart journal*. 2002;23:1422-1432.
 67. Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *The American journal of physiology*. 1992;263:H1090-1094.
 68. Nagao T, Vanhoutte PM. Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. *The American journal of physiology*. 1991;261:H1034-1037.
 69. Nakamura K, Terasako K, Toda H, Miyawaki I, Kakuyama M, Nishiwada M, Hatano Y, Mori K. Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane, and sevoflurane. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. 1994;41:340-346.
 70. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation*. 2008;117:2211-2223.
 71. Namba T, Ishii TM, Ikeda M, Hisano T, Itoh T, Hirota K, Adelman JP, Fukuda K. Inhibition of the human intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, hIK1, by volatile anesthetics. *European journal of pharmacology*. 2000;395:95-101.
 72. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology*. 1995;268:C799-822.
 73. Ogawa K, Tanaka S, Murray PA. Inhibitory effects of etomidate and ketamine on endothelium-dependent relaxation in canine pulmonary artery. *Anesthesiology*. 2001;94:668-677.
 74. Packer M, Colucci W, Fisher L, Massie BM, Teerlink JR, Young J, Padley RJ, Thakkar R, Delgado-Herrera L, Salon J, Garratt C, Huang B, Sarapohja T, Group RHFS. Effect of levosimendan on the short-term clinical course of patients with acutely decompensated heart failure. *JACC Heart failure*. 2013;1:103-111.
 75. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666.
 76. Papp Z, Edes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenpera M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RH, Meyer S, Algotsson L, Wikstrom BG, Jorgensen K, Filippatos G, Parissis JT, Gonzalez MJ, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications:

- consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *International journal of cardiology*. 2012;159:82-87.
77. Papp Z, Van Der Velden J, Borbely A, Edes I, Stienen GJ. Effects of Ca^{2+} - sensitizers in permeabilized cardiac myocytes from donor and end-stage failing human hearts. *Journal of muscle research and cell motility*. 2004;25:219-224.
 78. Pataricza J, Hohn J, Petri A, Balogh A, Papp JG. Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2000;52:213-217.
 79. Pataricza J, Krassoi I, Hohn J, Kun A, Papp JG. Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2003;17:115-121.
 80. Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*. 1987;237:896-898.
 81. Pierrakos C, Velissaris D, Franchi F, Muzzi L, Karanikolas M, Scolletta S. Levosimendan in critical illness: a literature review. *Journal of clinical medicine research*. 2014;6:75-85.
 82. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2016;18:891-975.
 83. Rapoport RM. Acute nitric oxide synthase inhibition and endothelin-1-dependent arterial pressure elevation. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:57.
 84. Riha H, Patel P, Valentine E, Lane B, Augoustides JG. Major themes for 2011 in cardiovascular anesthesia and intensive care. *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*. 2012;4:31-39.
 85. Sandell EP, Hayha M, Antila S, Heikkinen P, Ottoila P, Lehtonen LA, Pentikainen PJ. Pharmacokinetics of levosimendan in healthy volunteers and patients with congestive heart failure. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1995;26 Suppl 1:S57-62.
 86. Sato A, Terata K, Miura H, Toyama K, Loberiza FR, Jr., Hatoum OA, Saito T, Sakuma I, Guterman DD. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;288:H1633-1640.
 87. Sato S, Talukder MA, Sugawara H, Sawada H, Endoh M. Effects of levosimendan on myocardial contractility and Ca^{2+} transients in aequorin-loaded right-ventricular papillary muscles and indo-1-loaded single ventricular cardiomyocytes of the rabbit. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998;30:1115-1128.
 88. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical science*. 2005;109:143-159.
 89. Segreti JA, Marsh KC, Polakowski JS, Fryer RM. Evoked changes in cardiovascular function in rats by infusion of levosimendan, OR-1896 [(R)-N-(4-(4-methyl-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydropyridazin-3-yl)phenyl)acetamide], OR-1855 [(R)-6-(4-aminophenyl)-5-methyl-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-one], dobutamine, and milrinone: comparative effects on peripheral resistance, cardiac output, dP/dt ,

- pulse rate, and blood pressure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;325:331-340.
90. Seyde WC, Longnecker DE. Anesthetic influences on regional hemodynamics in normal and hemorrhaged rats. *Anesthesiology*. 1984;61:686-698.
 91. Sun X, Cao K, Yang G, Huang Y, Hanna ST, Wang R. Selective expression of Kir6.1 protein in different vascular and non-vascular tissues. *Biochemical pharmacology*. 2004;67:147-156.
 92. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Levy S, Linde C, Lopez-Sendon JL, Nieminen MS, Pierard L, Remme WJ, Task Force for the D, Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of C. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *European heart journal*. 2005;26:1115-1140.
 93. Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, Papp Z. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *European journal of pharmacology*. 2004;486:67-74.
 94. Takahashi R, Talukder MA, Endoh M. Inotropic effects of OR-1896, an active metabolite of levosimendan, on canine ventricular myocardium. *European journal of pharmacology*. 2000;400:103-112.
 95. Thal SC, Luh C, Schaible EV, Timaru-Kast R, Hedrich J, Luhmann HJ, Engelhard K, Zehendner CM. Volatile anesthetics influence blood-brain barrier integrity by modulation of tight junction protein expression in traumatic brain injury. *PloS one*. 2012;7:e50752.
 96. Uggeri MJ, Proctor GJ, Johns RA. Halothane, enflurane, and isoflurane attenuate both receptor- and non-receptor-mediated EDRF production in rat thoracic aorta. *Anesthesiology*. 1992;76:1012-1017.
 97. van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin AF, Weitzberg E, Zweier J, Gladwin MT. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Medicinal research reviews*. 2009;29:683-741.
 98. Vicaut E, Baudry N, Hou X. Nitric oxide-independent response to acetylcholine by terminal arterioles in rat cremaster muscle. *Journal of applied physiology*. 1994;77:526-533.
 99. Villeneuve E, Blaise G, Sill JC, Guerard MJ, Buluran J, Girard D. Halothane 1.5 MAC, isoflurane 1.5 MAC, and the contractile responses of coronary arteries obtained from human hearts. *Anesthesia and analgesia*. 1991;72:454-461.
 100. Waldron GJ, Garland CJ. Contribution of both nitric oxide and a change in membrane potential to acetylcholine-induced relaxation in the rat small mesenteric artery. *British journal of pharmacology*. 1994;112:831-836.
 101. Wilson C, Lee MD, McCarron JG. Acetylcholine released by endothelial cells facilitates flow-mediated dilatation. *The Journal of physiology*. 2016;594:7267-7307.
 102. Wilson JR, Kapoor SC, Krishna GG. Contribution of potassium to exercise-induced vasodilation in humans. *Journal of applied physiology*. 1994;77:2552-2557.

103. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. Levosimendan, a novel Ca^{2+} sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K^{+} channel in rat arterial myocytes. *European journal of pharmacology*. 1997;333:249-259.
104. Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive K^{+} channel in rat ventricular cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;283:375-383.

11 TÁRGYSZAVAK

Tárgyszavak magyarul:

mikrocirkuláció, cremaster izom, vazodilatáció, EDHF, NO, K_{ATP} csatorna, K_{IR} csatorna, levosimendan, OR-1986

Tárgyszavak angolul:

microcirculation, cremaster muscle, vasodilation, EDHF, NO, K_{ATP} channel, K_{IR} channel, levosimendan, OR-1986

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni Prof. Dr. Papp Zoltán témavezetőmnek a munkám során nyújtott segítséget, és hogy lehetővé tette munkámat az általa vezetett laboratóriumban.

Külön köszönöm Dr. Bagi Zsoltnak, hogy a video mikroszkópos rendszer kialakításában segítséget nyújtott, és a kísérletek közvetlen felügyeletét ellátta.

Köszönöm Prof. Édes Istvánnak, a Kardiológiai Klinika igazgatójának hogy lehetővé tette számomra az intézetben való kutatómunkát.

Egyesült Államok-beli tanulmány utam során rengeteg segítséget kaptam a University of Pennsylvania, Department of Anesthesiology and Critical Care intézet minden dolgozójától, különös képpen Prof. Dr. David. E. Longneckertől, az aneszteziológiai tanszék és kutatóközpont vezetőjétől, valamint Dr. Alex Loebtől, a kutatólaboratórium operatív vezetőjétől.

Külön hálával tartozom Pásztorné Tóth Enikőnek a mérések előkészítésében nyújtott segítségéért.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00048. számú „Életet veszélyeztető akut megbetegedések súlyossági és halálozási mutatóinak javítása transzlációs orvostudományi megközelítésben – Stay Alive ” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

13 FÜGGELÉK