

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az aneszteziológia és intenzív terápia egyes
gyógyszereinek vaszkuláris hatásai**

Dr. Gődény Ildikó

Témavezető: Dr. Papp Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Az aneszteziológia és intenzív terápia egyes gyógyszereinek vaszkuláris hatásai

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Gődény Ildikó okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezető: Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Zsembery Ákos, PhD
Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettudományi Központ, Immunológiai Intézet, 2.209-211. szoba
2018. december 6., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bari Ferenc, az MTA doktora
Dr. Fábián Ákos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla György, akadémikus
tagok: Dr. Zsembery Ákos, PhD
Prof. Dr. Németh Norbert, az MTA doktora
Prof. Dr. Bari Ferenc, az MTA doktora
Dr. Fábián Ákos, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettudományi Központ, F008-009 tanterem,
2018. december 6., 13 óra

1 BEVEZETÉS

1.1 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.

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 nehezé 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.

Az endotélium sejtek és az alattuk elhelyezkedő simaizomsejtek szoros egységet alkotnak. Kölcsönhatásuk eredménye a kisebb artériák 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 ugyan ezeknek az ereknek az átmérője ép endotélium mellett. Az endotélium változatos mechanizmusokon keresztül képes az alatta fekvő simaizom működését befolyásolni: közvetlen kapcsolat révén (pl. gap junction) az alatta fekvő simaizommal, illetve relaxációt/konstriktációt 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. 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. 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).

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

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.

1.1.1 A NO keletkezése és szerepe a vazodilatációban

A NO által közvetített vazodilatáció az endoteliális NO szintetáz (eNOS) aktivációjával kezdődik. Ennek hatására L-argininből molekuláris oxigén felhasználásával L-citrullin és nitrogén oxid (NO) képződik. A NO ezután az endotélium alatt elhelyezkedő vaszkuláris simaizomsejtbe diffundálva aktiválja a szolubilis guanilát cikláz, 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 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$) 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 érzékenység 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.

1.1.2 Az EDHF szerepe az értónus szabályozásában

1.1.2.1 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. Ezt az érhártya által

kibocsátott faktornak tulajdonították, melyet ezért endotélium eredetű hiperpolarizáló faktornak (endothel derived hyperpolarizing factor- EDHF) neveztek el.

Később kiderült, 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).

1.1.2.2 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.

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 Ca^{2+} 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.

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.

1.2 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?

A jelenleg használt volatilis anesztetikumok csökkentik a vaszkuláris rezisztenciát, de a hatásmechanizmus még nem egyértelműen tisztázott. A kísérletek nem igazolták azt a korábbi hipotézist, mely szerint az anesztetikumok hatására az endotélium sejtek NO kibocsátása fokozódna. Ugyanakkor izolált aorta gyűrűn az agonisták által kiváltott endotélium-függő relaxáció gátlását figyelték meg halogénezett inhalációs anesztetikumok jelenlétében. 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. Ez a két, egymást kiegészítő hatás összességében az értónus elvesztését eredményezheti. A leírt hatásokért, legalábbis részben, az inhalációs ágenseknek közvetlenül az endotélium sejtek K^+ csatornáira és/vagy a gap junction-okra gyakorolt hatását teszik felelőssé.

A kísérleteinkben alkalmazott egyéb anesztetikumok (ketamin, pentobarbitál) 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). A ketamin hatása elsősorban az R(-) sztereoizomernek tulajdonítható.

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

A Ca^{2+} -érzékenyítő pozitív inotróp hatású levosimendant a dekompenzált szívelégtelenség kezelésére fejlesztették, emellett a perifériás ereken (artériák és vénák) erőteljes vazodilatációt okoz (inodilátor). Mivel hatása a béta-adrenerg receptoroktól független, béta-blokkoló kezelés mellett is alkalmazható. A korai tanulmányok megerősítették a levosimendan terápia kedvező hatását mind a dekompenzált szívelégtelenség kezelésében (LIDO), mind az akut miokardiális infarktust követő szívelégtelenség mérséklésében (RUSSLAN), az elvárt eredményeket azonban a kritikus állapotú betegek csoportjában végzett nagy nemzetközi tanulmányok nem tudták egyértelműen igazolni (SURVIVE és REVIVE tanulmányok). Bár számos meta-

analízis mutatott a levosimendan terápia hatására szignifikáns mortalitás csökkenést, ugyanakkor további klinikai hatástanulmányok szükségesek a biztonságosság és klinikai hatásosság bizonyítására kritikus állapotú betegek esetében.

Ahhoz, hogy a levosimendan a klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazhatóvá váljon, elengedhetetlen a hatásmechanizmusának részletes ismerete *in vitro* és *in vivo*. Kiderült, hogy a levosimendan hatása komplex, egyrészt mert a hatás fenntartásában egy hosszú féléletidejű lebomlási terméket, 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. Ezzel az összetett hatással magyarázható az a tény, hogy a levosimendan pozitív inotróp hatása mellett erőlyes vazodilatátor és kardioprotektív szerepet is betölt.

A levosimendan egy Ca^{2+} -érzékenyítő molekula, mely pozitív inotróp hatását főleg a szívizomsejtek vékony filamentumaiban található, Ca^{2+} 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. A rövid életidejű levosimendan hosszú távú kardiovaszkuláris hatásaiért az OR-1896 nevű metabolitja felelős. 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).

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. 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 harmadrendű arterioláit (átmérő kb. 20 μm) vizsgáltuk *in vivo* videomikroszkópiával. A növekvő koncentrációban topikusan alkalmazott levosimendan és OR-1896 hatására létrejövő érátérő változásokat összehasonlítottuk a két szer esetében. Mivel korábbi *in vitro* kísérletek a patkány vázizomzatban a K_{ATP} csatornák szerepét igazolták a létrejövő érválaszban, így kísérleteink egy részében ezeket a csatornákat előzetesen blokkoltuk.

2 CÉLKITŰZÉSEK

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 szerettük volna bizonyítani a levosimendan és az OR-1896 mikrocirkulációban betöltött szerepét (a patkány cremaster izom preparátumon) *in vivo*.

3 ANYAGOK és MÓDSZEREK

3.1 Állatok és anyagok

Állatkísérleteink során az Állatkísérletes Etikai Bizottság által jóváhagyott protokollt követtük. Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat (200g-300g) használtunk. Az állatokat ezután ketaminnal, halotánnal, izofluránnal vagy nátrium-pentobarbitállal altattuk el. A kísérlet végén 150mg/kg nátrium-pentobarbitállal végeztünk eutanáziát.

3.2 A patkányok anesztéziája és monitorozása

Halotán anesztézia: 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). A testhőmérsékletet fűtőpad segítségével 37 °C - 38 °C-között tartottuk.

Az izoflurán anesztézia során az izoflurán fenntartó koncentrációja 1.4 térf % volt (1 MAC). A ketamin anesztézia indukciójára 150mg/kg intraperitoneálisan injektált ketamint használtunk, majd 1,5mg/kg/min dózissal folyamatos intravénás adagolással tartottuk fenn.

Kísérleteink harmadik részében nátrium-pentobarbitállal 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.

3.3 A cremaster preparátum készítése

A bal cremaster izom feltárásához a scrotumot a középvonalban felnyitottuk, az irodalomban korábban ismertetett technikának megfelelően. Az állatot háton fekvő helyzetben egy fűtött padra helyeztük, az izmot pedig, az ér-idegellátást 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 NaHCO_3 , 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 és 2 mM CaCl_2 volt. A Krebs puffert előzetesen 95% N_2 /5% CO_2 gáz keverékével áramoltattuk át. A preparátum elkészítését követően min. 30 percig áramoltattuk a Krebs puffert, időt hagyva az ekvilibrum létrejöttéhez mielőtt elindítottuk a kísérleti protokollt.

A cremaster izom fő artériát első rendű (A1), majd az ebből származó kisebb ereket a további oszlásoknak megfelelően azonosítottunk. Kísérleteinkben negyedrendű ereket (arteriolákat) használtunk. Ezek átmérője 20-30 μ m volt.

3.4 Az intravitalis videomikroszkópia

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 analizátor segítségével (Boeckeler VIA-150), minden ágens alkalmazása során, ill. azt követően 30 másodpercenként mértük.

3.5 Az agonisták által kiváltott válaszreakciók jellemzése

A sebészeti preparálás után az izmot 30-60 percen keresztül a fent említett Krebs oldattal áramoltattuk át, az ekvilíbrioium 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 adenzin (ADO) adásával teszteltük. 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 lemértük. 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.

3.6 A kísérleti protokollok

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

Kísérleteink első részében a K^+ koncentráció emelkedés 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. 30 perc ekvilíbrio után megismételtük a méréseinket a mérsékeltén emelkedett (10 mM) K^+ koncentrációjú oldatok random sorrendű 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.

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

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.

3.6.2.1 A NO szerepének vizsgálata a fenti modellben

Az egyik csoport kísérleti állat 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 fiziológias NaCl oldatot kapott (1ml/óra).

Az agonisták (BK, 1-100 nM és acetilkolin, ACh, 10 nM-10 μ M) megfelelő koncentrációjú oldatát Krebs pufferben állítottuk elő és ugyanúgy juttattuk az izom felületére, mint azt korábban az ADO esetében részleteztük. Az artériák átmérőjének változását a kiindulási érték százalékában fejeztük ki. Az adenosin és az acetilkolin esetében a maximális vazodilatáció a 90. másodpercben, míg a bradikinin esetén a 120. másodpercben jött létre.

3.6.2.2 Az EDHF szerepének vizsgálata

Miután a normál (5 mM) K^+ koncentrációjú puffer jelenlétében elvégeztük a fenti kísérleteket, a magas (20 mM) K^+ koncentrációjú pufferre váltottunk az EDHF mechanizmus gátlás céljából. Az oldat cseréje után 30 percig vártunk az új egyensúlyi helyzet kialakulására, mielőtt

az első agonista hatását vizsgáltuk volna. Az agonistákat a fentebb elírtaknak megfelelően juttattuk a preparátumra.

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

A kísérletekhez pentobarbital anesztéziát alkalmaztunk. Acetilcolin (1 μ M) és adenzin (10 μ M) izomfelszínre juttatásával teszteltük az ér reakcióképességét. Az átmérőket ebben a kísérletsorozatban abszolút értékben prezentáltuk.

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

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 a kiértékelés során az ér maximális dilatációjakor mért értéket használtuk

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

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.

3.7 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 adenzin a Research Biochem. Inc (Natick, MA, USA) terméke volt, az indometacin, acetilcolin, 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).

3.8 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 emelkedő K^+ koncentráció vagy az adenozin 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 varianciaanalízist (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, az elemzés során az agonisták által kiváltott legnagyobb kiváltott választ használtuk fel. 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.

4 EREDMÉNYEK

4.1 K^+ csatornák részvétele az érátmérő szabályozásában normál extracelluláris K^+ koncentráció mellett

A kísérletek során ioncsatorna gátlók felhasználásával vizsgáltuk, hogy milyen K^+ csatornák vesznek részt az érátmérő szabályozásában normál (5 mM) extracelluláris K^+ koncentráció mellett. 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 IbTX a K_{Ca} csatornák (K_{Ca} 1.1) esetén.

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, 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.

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

Az általunk alkalmazott K^+ csatorna inhibitorok 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 magas 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 mérsékelt K^+ emelkedéssel indukált vazodilatáció.

4.3 A különböző anesztetikumok szerepének vizsgálata az értónus szabályozásában

Az előzőekben bemutatott kísérleteinket *in vivo* végeztük. Ehhez elengedhetetlen volt valamely anesztetikum használata. 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 érátérő NOS- és EDHF-függő szabályozó folyamatait befolyásolják-e az anesztetikumok. A korábban említetteknek megfelelően a NOS-rendszert LNMMMA-val, az EDHF-rendszert magas (20 mM) K^+ alkalmazásával, mindkét rendszert pedig a kettő kombinálásával függesztettük fel. Így az eredményeknek alapvetően négy alaptípusa jött létre: 5 mM K^+ , 5 mM K^+ + L-NMMA, 20 mM K^+ vagy 20 mM K^+ + L-NMMA. A fenti csoportokban így a kialakuló vazodilatáció lehetséges mechanizmusai a következők lehettek: NO + EDHF mediált, csak EDHF mediált, csak NO közvetített válasz, vagy teljes gátlás, a fenti sorrendben. A prosztaciklin/prosztaciklin (PGI_2) közvetített vazodilatációt minden kísérletben gátoltuk intravénás indometacinnal.

4.3.1 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 ekvilíbrio után indítottuk az L-NMMA perfúziót, vagy a kontroll csoportban a volumenháztartás egyensúlyának fenntartása érdekében ugyanolyan sebességgel fiziológiás sóoldatot adtunk. Újabb 30 perc ekvilíbrio 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, majd megnéztük, befolyással volt-e az anesztetikus ágens a vizsgált erek nyugalmi átmérőjére.

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, egybevágóan más korábbi eredményekkel (ANOVA és SNK, $P < 0,001$). 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.

A vizsgált negyedrendű arteriolák átlagos nyugalmi átmérői 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 ± 2 μ 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 adenzin (ADO, 100 μ M) alkalmazásával ellenőriztük.

Az L-NMMA-val kezelt állatoknál a nyugalmi érátmérők nem különböztek a kezeletlen (kontroll) csoportban mért értékektől egyik anesztetikus ágens használata során sem (izoflurán: 25 ± 1 μ m, $n=14$, halotán: 19 ± 2 μ m, $n=14$, ketamin: 20 ± 2 μ m, $n=15$, t-teszt, $P > 0,3$ mindegyik esetben).

4.3.2 Az EDHF útvonal gátlásának hatása az érátmérőkre különböző anesztetikumok használata mellett

Az EDHF útvonalat magas K^+ tartalmú puffer alkalmazásával gátoltuk. A fellépő esetleges szisztémás változások jelenlétét vizsgáltuk először. 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 $3,8 \pm 0,21$ mM volt a normál puffer jelenlétében és $4,65 \pm 0,45$ mM volt 3 órával a magas $[K^+]$ oldat elindítása után ($n=4$).

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. 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. Normál 5 mM K^+ koncentrációjú puffer alkalmazása során az adenzin 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 adenzin 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 adenzin 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 adenzinnal. A kiváltott vazodilatáció mértékét nem befolyásolta sem a 20 mM $[K^+]$ önmagában, sem az L-NMMA-val való együttes alkalmazása. A negyedrendű arteriolákban kiváltható maximális dilatáció 35-40 μm -volt függetlenül az anesztetikus ágénstől és az oldat K^+ koncentrációjától.

4.3.3 Az acetilkolin által kiváltott érválaszok a különböző anesztetikumok használata során

A következőkben az agonisták közül az acetilkolin által kiváltott vazodilatációt hasonlítottuk össze normál, vagy magas kálium koncentrációjú puffer alkalmazása mellett, L-NMMA

nélkül, vagy annak jelenlétében, izoflurán, halotán vagy ketamin narkózis során. Az ACh hatására létrejött válaszreakciók mind intenzitásukat, mind időbeli lefutásukat tekintve hasonlóak voltak az adenzin által létrehozott dilatációkhoz.

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. Ezzel demonstráltuk, hogy izoflurán jelenlétében az acetilkolin döntően NO mediált mechanizmussal dilatálja a kísérletes modellünk rezisztencia ereit.

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, de a többi dózissal ezt nem sikerült reprodukálnunk, 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 és ketamin 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.

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.

4.3.4 A bradikinin által kiváltott érválaszok a különböző anesztetikumok használata során

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

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. Ezzel demonstráltuk, hogy izoflurán jelenlétében a bradikinin is döntően NO mediált mechanizmussal dilatálja a kísérletes modellünk rezisztencia ereit, hasonlóan az acetilkolinnál bemutatott eredményekhez. 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.

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

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 mikrocirkulációban 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.

4.4 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 adonozin (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.

4.4.1 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 ($1 \text{ nM} - 100 \mu\text{M}$) vazodilatációt eredményezett (maximális dilatáció $23 \pm 2 \mu\text{m}$ -ről $33 \pm 2 \mu\text{m}$ -re). 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).

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

Mint azt a metodikáknál 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.

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

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 ± 2 μ m és 23 ± 2 μ m, a glibenclamiddal történt inkubáció előtt és után). Ugyanakkor glibenclamid jelenlétében a pinacidil nem volt képes vazodilatációt kiváltani a cremaster izom arterioláin.

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). Ugyanezt az eredményt figyeltük meg az OR-1896 alkalmazásakor is (maximális dilatáció 22 ± 5 μ m). 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.

5 MEGBESZÉLÉS

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

A mérsékelten emelkedett 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 hepatikus és mezenterialis erein bizonyította, hogy a K^+ indukált vazodilatáció K_{IR} csatornák aktivációja révén jött létre. 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. 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.

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. 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. Azonban a patkány vázizom erein sem nekünk, sem más tanulmányoknak nem sikerült igazolni a K_{Ca} csatornák szerepét a nyugalmi tónus fenntartásában.

Kísérleteinkkel igazoltuk a K_{IR} és a K_{ATP} csatornák szerepét a nyugalmi értónus fenntartásában *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.

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

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 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 adonozinra 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.

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

5.3.1 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.

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. Mind a levosimendan, mind az OR-1896 értágító képességét több kísérlet igazolta *ex vivo*, a 100 μm -nél nagyobb artériák és vénák esetében. 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*. 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 intravitális 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.

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

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. 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. Eredményeink nem támogatják az a hipotézist, mely szerint egyéb vazodilatátor mechanizmusok, pl. cAMP közvetített vazodilatáció 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.

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 egyedeket 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 fejti ki hatását: a K_{ATP} csatornák aktivációja révén dilatálja a patkány cremaster izom arterioláit *in vivo*. Feltételezhetően a levosimendan és metabolitja mikrovaszkuláris rezisztenciát csökkentő hatása legalább részben a fenti mechanizmus révén

valószínűleg meg a szervezet többi vázizmában is, és ez által szerepet játszik a levosimendan hatására bekövetkező rövid és hosszútávú hemodinamikai hatásokban.

5.4 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.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Munkámban a negyedrendű arteriolák érátmérő változását vizsgáltuk anesztetizált patkány cremaster izmában, három különböző kísérletsorozatban. Ezek mindegyikében a kipreparált izom felszínére juttattunk különböző vazoaktív 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 mérsékelten emelkedett K^+ koncentrációjú pufferrel (10 mM) 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.

7 IRODALOMJEGYZÉK

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.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatást 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.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gődény, 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., **Gődény, 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





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 omecamtiv-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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.09.24.

