

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A neuromuszkuláris junkció működésének tanulmányozása n. phrenicus-diaphragma preparátumon

Dr. Csernoch Vera

Témavezetők: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora

Dr. Fábíán Ákos István, PhD



DEBRECENI EGYETEM

Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2024

**A neuromuszkuláris junkció működésének tanulmányozása n.
phrenicus-diaphragma preparátumon**

Értekezés a doktor (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Csernoch Vera okleveles aneszteziológus és intenzív terápiás
szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Fülesdi Béla, az MTA doktora
Dr. Fábíán Ákos István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, MTA doktora

tagok: Dr. Klekner Álmos, MTA doktrora
Prof. Dr. Darvas Katalin, PhD

A doktori szigorlat helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet A épület Könyvtára, 2024. május 28., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bártai István, PhD

Dr. Fekete Klára Edit, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bártai István, PhD
Dr. Fekete Klára Edit, PhD
Dr. Klekner Álmos, MTA doktrora
Prof. Dr. Darvas Katalin, PhD

Az értekezés védésének helyszíne, időpontja: Debreceni Egyetem
ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet Tanterme, 2024. május 28.
,13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzések	3
3. Metodikák.....	4
3.1. Kísérleti állatok.....	4
3.2. Anyagok.....	4
3.3. Kísérleti módszerek	5
3.4. Statisztikai elemzés.....	13
4. Eredmények	15
4.1. A carboxymethyl- γ -ciklodextrin hatásának vizsgálata.....	15
4.2. A magnézium hatásának vizsgálata	20
5. Megbeszélés	26
6. Saját eredmények, új megállapítások	34
7. Összefoglalás	35
8. Summary.....	37
9. Publikációs jegyzék	39
10. Tárgyszavak.....	40
10.1. Magyar	40
10.2. Angol	40
11. Köszönetnyilvánítás.....	41

1. Bevezetés

A kuráre 1942-ben történt bevezetése óta a neuromuszkuláris blokkoló szerek lehetővé tették a betegek műtétek alatti immobilizációját, javították a sebészeti beavatkozások kivitelezhetőségét, valamint a trachealis intubációs körülményeket. A neuromuszkuláris blokkoló szerek használata viszont hatszorosára növelte a mortalitás rizikóját, mely megmutatta a megnövekedett kockázatot az izomrelaxánsok használata esetén. Az évtizedek alatt számos fejlesztés valósult meg, annak érdekében, hogy növelni lehessen a betegbiztonságot általános anesztézia alatt használt izomrelaxánsok mellett. Számos új neuromuszkuláris blokkoló szert sikerült szintetizálni, és kifejleszteni, a minél ideálisabb izomrelaxáns hatás létrehozása érdekében. Megjelentek az izomműködés kvalitatív és kvantitatív monitorozására szolgáló eszközök. A maradék izomrelaxáns hatás függesztésére már az 1950-es években bevezették a neostigmin használatát, és évtizedekig ez volt az egyetlen függesztőszer a klinikusok számára. Az acetilkolin-észteráz gátló számos mellékhatása, és azon tulajdonsága miatt, hogy képtelen mély izomblokk függesztésére, messze áll a tökéletes függesztőszer ideáljától. 2008-ban megjelent a klinikumban egy új típusú szelektív relaxáns kötő ágens, a sugammadex, ami egy γ -ciklodextrin származék. Ez a vegyület képes bármilyen mélységű izomblokk gyors, és teljes függesztésére, de ennek is megvannak a korlátai. Csak aminoszteroid izomrelaxánsokra van hatással, és leírtak egyebek mellett anafilaxiás reakciót, és bradikardiát használata mellett. Az ideális izomrelaxáns függesztő szer feltalálása tehát még várat magára. Az elmúlt 70 év számos innovációjának hatására a neuromuszkuláris blokkoló szerek okozta direkt mortalitás ugyan lecsökkent, de a légzési szövődmények rizikója továbbra is fennáll. A posztoperatív reziduális neuromuszkuláris blokk incidenciáját mai napig 2–64% közé teszik. A fennmaradó izomrelaxáció nem kívánatos hatásai közé tartozik a hypoxia, légzésdepresszió, bronchoaspiráció, atelektázia, pneumónia, vagy akár a halál is. Nagyon nagy jelentősége van tehát annak, hogy a műtétek végén az aneszteziológusok biztosítsák a teljes izomerő visszatérést, és ne maradjon reziduális izomrelaxáns hatás, mely megnövelheti a betegek mortalitását és morbiditását.

A hatás tanulmányozására a klinikai vizsgálatok mellett, a préklinikai fázisban a n. phrenicus-diaphragma preparátum szolgálhat. Az izolált patkány nervus phrenicus-diaphragma preparátum számos izom élettani és farmakológiai kísérlet megvalósításához bizonyul kiváló módszernek napjainkig is. Ismereteink szerint ilyen preparátum vizsgálatára Európán belül Münchenben a Technische Universität Neuromuszkuláris kutatócsoportjában, illetve klinikánk neuromuszkuláris munkacsoportjában van lehetőség. Klinikánk experimentális laboratóriumában ezen a preparátumon végeztünk a klinikum számára később felhasználható vizsgálatokat.

2. Célkitűzések

Vizsgálataink során ex vivo állatkísérletben, amiben egy izolált patkány nervus phrenicus-diaphragma szövetpreparátumot használtunk, vizsgáltuk az izomrelaxánsok hatását, és azoknak a függeszthetőségét két különböző kísérletsorozatban.

Első kísérletsorozatunk célja az volt, hogy egy új γ -ciklodextrin származék, a carboxymethyl- γ -ciklodextrin, hatékonyságát vizsgáljuk, három a klinikumban is használatban lévő izomrelaxáns, a rocuronium, a vecuronium és a pipecuronium, függeszthetőségére. További célkitűzésünk az volt, hogy a carboxymethyl- γ -ciklodextrin hatékonyságát összevessük a már forgalomban lévő, klinikai gyakorlatban használatban lévő másik γ -ciklodextrin származék, a sugammadex hatékonyságával.

Második kísérletsorozatunkban, amit szintén az ex vivo patkány nervus phrenicus-diaphragma preparátumon végeztünk, különböző magnézium koncentrációk hatását vizsgáltuk a rocuroniummal kiváltott izomrelaxációra és annak sugammadexszel történő függeszthetőségére. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a megnövelt magnézium koncentráció hatását a rocuronium kiváltotta izomrelaxációra, a függeszthetőségére és a rekurarizációra.

3. Metodikák

3.1. Kísérleti állatok

Mindkét kísérletsorozatunk patkány preparátumokon volt végrehajtva. Etikai jóváhagyás a kutatáshoz (1/2013/DE MÁB) a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (Elnök Prof Furka I.) által történt 2013. április 15-én. A két kutatáshoz kutatásonként 20–20 hím Wistar patkány volt használva, súlyban 250–563 g-osak. Az intézményi irányelvek az állatokkal való megfelelő bánásmódról, és kutatási célokra való felhasználásukról, szigorúan be voltak tartva. Az állatok random módon voltak kiválasztva a kísérletek reggelén, és közvetlenül a kísérletek megkezdése előtt voltak eutanizálva.

3.2. Anyagok

3.2.1. Carboxymethyl- γ -ciklodextrin hatásának vizsgálata

Ezekben a kísérletekben rocuroniumot (Esmeron; MSD Pharma Hungary, Budapest, Magyarország), pipecuroniumot (Arduan; Richter Gedeon, Budapest, Magyarország), vecuroniumot (Vecuronium Inresa; Inresa Arzneimittel Ltd, Freiburg, Németország), és sugammadexet (Bridion; MSD Pharma Hungary, Budapest, Magyarország) használtunk, melyeket kereskedelmi forgalomból vásároltunk, és Krebs oldatban oldottunk fel, oly mértékben, hogy 10–100 μ L-es térfogatban lehessen dozírozni.

A kísérlethez továbbá, egy új γ -ciklodextrin származékot, a carboxymethyl- γ -ciklodextrint (CMGCD) használtuk, mely a Cyclolab Ltd, Budapest, Magyarország által lett kifejlesztve, és legyártva. A vegyület szintéziséhez a γ -ciklodextrint feloldották a nátrium-klóracetát vizes oldatában. Az így kapott oldatot 70°C-ra melegítették. Amikor elérték a 60°C-ot vizes NaOH-t adagoltak cseppenként az oldathoz 3 óra alatt, majd tovább keverték az oldatot 75°C-on további 4 órán keresztül. Ezt

követően, mikor a reakcióelegy visszahűlt szobahőmérsékletűre, egy erős ioncserélő gyantával kezelték meg, majd a filtrátumot szénnel tisztították. A szintelen oldatot végül liofilizálták. A kapott CMGCD variánsok a szubsztitúció fokában (degree of substitution DS) különböznek egymástól, melynek mértékét nukleáris mágneses rezonancia spektroszkópiával (NMR), és kapilláris elektroforézissel (CE) határozták meg. Előzetes ex vivo adatok alapján, mi CMGCD DS = 4.1 variánsát használtuk a kísérleteinkhez.

3.2.2. A magnézium hatásának vizsgálata

Ebben a kísérletsorozatban rocuroniumot (Esmeron; MSD Pharma Hungary, Budapest, Magyarország) és sugammadexet (Bridion; MSD Pharma Hungary, Budapest, Magyarország) használtunk, melyeket kereskedelmi forgalomban vásároltunk, és Krebs oldatban oldottunk fel, oly mértékben, hogy 10–100 μL -es térfogatban lehessen dozírozni.

Továbbá magnézium heptahidrát szulfátot (Cormagnesin, Wörwag Pharma GmbH, Böblingen, Németország) használtunk és hígítás nélkül adtuk a puffer oldathoz, hogy elérjük a magnézium megfelelő végső koncentrációját.

3.3. Kísérleti módszerek

3.3.1. Ex vivo patkány szövetpreparátum kivitelezése

Patkány nervus phrenicus-hemidiaphragma preparátumot használtunk mind a két kísérletsorozathoz. A patkányokat az peritoneumba befecskendezett, túldozírozott thiopentallal (60 mg/kg) öltük meg, majd kivérettük őket a dorsalis véna cavan ejtett vágáson keresztül. A hemidiaphragma preparációjához a Bülbring által leírt módszernek egy módosított verzióját használtuk. Bilaterális thoracotómiát hajtottunk végre, majd kiemeltük a sternumot. Ezt követően kipreparáltuk a két nervus phrenicust kraniális irányból rostrális irányba, egészen a diaphragmába való becsatlakozásukig. Ezután a két hemidiaphragmát preparáltuk ki a hozzájuk tartozó nervus phrenicusokkal. A preparálást követően a nervus phrenicus-hemidiaphragma preparátumokat egy speciális szövettar-

tóba helyeztük (IS0-07-TSZ2D, Experimetria Ltd., Budapest, Magyarország), 75 mL Krebs oldatba (110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM glucose, 20 mM NaHCO₃), amit 95% O₂-el és 5% CO₂-al (Vol%) buborékoltattunk át. Az oldatot 37 °C-on tartottuk. (AMP-09 Hőmérséklet szabályozó, Experimetria Ltd., Budapest, Magyarország).

A hemidiaphragmák egy izometriás erőátvivő transzducerhez (FSG-01/200 Force Transducer, Experimetria Ltd., Budapest, Magyarország) lettek erősítve a diaphragma centrum tendiniumánál egy 5/0 átmérőjű sebési varrattal. A mérések egy AMP-01-SG Classic bridge erősítővel lettek felerősítve, és egy 16 csatornás professzionális software csomaggal (S.P.E.L. Advanced Isosys software, Experimenta Ltd., Budapest, Magyarország) lettek rögzítve. A nervus phrenicus vagy single twitch (ST) impulzusokkal volt ingerelve 5 másodpercenként (0,3 ms hosszúságú, téglalap alakú supramaximális erősségű impulzusok), vagy train-of-four (TOF) ingerlési mintával 15 másodpercenként (2 Hz frekvenciával leadott, négy egymást követő, egyenként 0,2 ms hosszúságú téglalap alakú supramaximális erősségű impulzusok, mely sorozat 15 másodpercenként meg volt ismételve). Az elektromos ingerlést egy négyszög impulzust generáló elektromos stimulátorral adtuk le (ST-03-O4, Experimenta Ltd., Budapest, Magyarország).

A preparátum puffer oldatba való helyezését követően, hagytuk a szöveteket akklimatizálódni 10 percet, amely időtartam alatt nem ingereltük az ideget, csak egy alap 20–30 mN-os feszülést használtunk. Ezt követően megkezdtük a nervus phrenicus elektromos ingerlését, amit 1–1,5 órán keresztül folytattunk, miközben az oldathoz nem adtunk egyéb szereket, csak a puffer oldatot cseréltük szükség szerint, egészen addig, amíg egy stabil bázis feszülést el nem értünk. Az izomrelaxánsok, a szelektív relaxáns kötő ágensek, valamint a magnézium, csak a stabilizációs periódus után volt hozzáadva az oldathoz. Egy adott koncentráció-hatás görbe lemérését követően a puffer oldatot 5-ször cseréltük át egy 30 perces időintervallum alatt, hogy teljes kimosását biztosítsuk az oldathoz adott anyagoknak, mielőtt új koncentráció-hatás görbe mérésébe kezdtünk volna bele.

Több mérést végeztünk egy adott patkányon, de egy állat egy koncentráció-hatás görbéhez csak egy mérésrel járult hozzá. Annak érdekében, hogy lecsökkenthessük a szövetben az idő előrehaladásával jelentkező

degradációból fakadó hatásokat, a koncentráció-hatás görbéket variált sorrendben vettük fel az állatokban. A preparátumokat nem használtuk tovább, ha már nem tudtunk egy stabil bázis feszülést fenntartani. Minden egyes koncentráció-hatás görbe 5 különböző állatból felvett koncentráció-hatás görbéből származik.

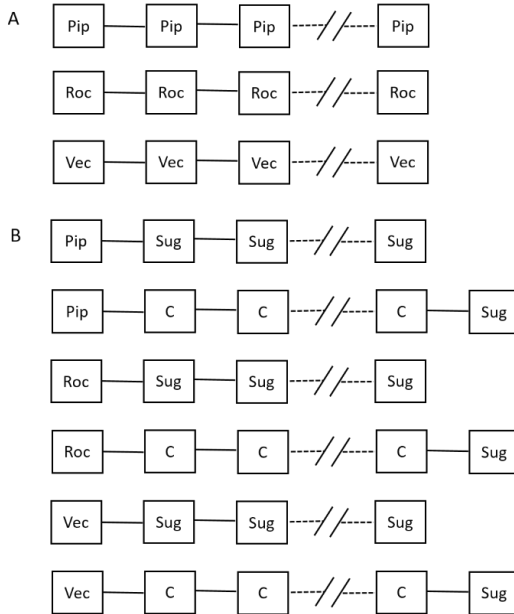
3.3.2. A carboxymethyl- γ -ciklodextrin hatásának vizsgálata

3.3.2.1. A rocuronium, vecuronium és pipecuronium koncentráció-hatás görbéinek felvétele

Ebben a kísérlet sorozatunkban először három izomrelaxáns, a rocuronium, a vecuronium és a pipecuronium koncentráció-hatás görbéit vettük fel. Az izomrelaxánsok hatását a nervus phrenicusra kifejtett, single twitchek (ST) formájában leadott, elektromos impulzusok által kiváltott izom összehúzódások erejének csökkenésén keresztül mértük (a továbbiakban ST erő amplitúdó). A neuromuszkuláris blokkoló szerek 15 perces intervallumokban voltak adagolva. Az ST erő amplitúdó egy adott gyógyszer koncentrációnál, öt egymást követő izomkontrakció átlagából lett kalkulálva, amikor a kontrakciós amplitúdók már stabilizálódtak, és vizuálisan nem változtak idővel. Az értékeket az alapfeszüléshez korrigáltuk, amit a kontrakciók között mértünk, valamint a nem kezelt preparátum maximális kontrakciós amplitúdójához normalizáltuk, hogy létrehozassuk a kumulatív koncentráció-hatás görbéket. Mindegyik preparátum 5–8 mérési pontot biztosított a görbére.

3.3.2.2. A sugammadex és CMGCD koncentráció-hatás görbéi az aminoszteroid izomrelaxánsok kiváltotta izomblokk függesztése során

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a szelektív relaxáns kötő ágens (SRBA) hatását, egy egyszeri izomrelaxáns dózist adtunk a pufferoldathoz, amivel 90–95%-os ST erő amplitúdó csökkenést értünk el.



1. ábra. Kísérleti elrendezés. A: Neuromuszkuláris blokkoló szerek koncentráció-hatás görbéinek szerkesztése. 15 percnként bólus izomrelaxánsok voltak adagolva, amíg a ST válasz teljes szuppressziója el nem lett érve. B: SRBA-ek koncentráció-hatás görbéinek szerkesztése. Egy iniciális bólus NMBD adása után, hogy 90–95%-os ST depresszió jöjjön létre, SRBA-ek adagolása történt 15 percnként, amíg meg nem valósult a neuromuszkuláris blokk teljes függesztése. Egy reverzáláshoz szükséges dózisú sugammadex volt adva a C-vel történő függesztést követően, hogy igazolható lehessen a teljes függesztés megvalósulása. NMBD: neuromuszkuláris blokkoló szer, ST: single twitch, SRBA: szelektív relaxáns kötő ágens, Pip: pipecuronium, Roc: Rocuronium, Vec: Vecuronium, Sug: Sugammadex, C: Carboxymethyl- γ -ciklodextrin.

Ezt követően SRBA dózisok 15 percnként voltak adagolva addig, amíg további dózisok már nem okoztak további növekedést a ST erő amplitúdóban. Egy sikeres felfüggesztés a TOF arány meghatározásával volt megállapítva, amennyiben a TOF arány nagyobb volt, mint 90%. A TOF arány a négy elektromos stimulus negyedik (T4) és első (T1) impulzusának aránya (T4/T1). A CMGCD görbékhez, egy függesztési dózis (0,5 mg) sugammadex is lett adva, hogy garantáljuk az adott izomrelaxáns teljes felfüggesztését. A ST erő amplitúdó korigálva volt az SRBA beadását megelőző ST erő amplitúdóhoz, és normalizálva volt a maximális kontrakciós amplitúdóhoz a teljes felfüggesztést követően,

hogy létrehozzuk a kumulatív koncentráció-hatás görbéket. Az 1. ábra mutatja be a kísérleti tervünket.

3.3.3. A magnézium hatásának vizsgálata

3.3.3.1. A magnézium és rocuronium koncentráció-hatás görbéi

Először a magnézium és rocuronium koncentráció-hatás görbéit határoztuk meg a diaphragma-nervus phrenicus preparátumunkon. A magnézium és rocuronium hatásai az izomkontrakciós erőre, a single twitch erő amplitúdójának depressziójával lett számszerűsítve. A magnézium és rocuronium egy adott koncentrációjánál az egy méréshez tartozó single twitch erő amplitúdót, öt egymást követő kontrakció átlagos értéke adta meg, amikor a kontrakciós amplitúdók már stabilizálódtak. A kapott értéket pedig az alaptenzióhoz korrigáltuk. A single twitch erő amplitúdó a még kezeletlen preparátum maximális single twitch erő amplitúdójához lett normalizálva, a kumulatív koncentráció-hatás görbék meghatározásához. A magnézium koncentráció-hatás görbéjének kimérése során 9,2 mg magnézium volt befecskendezve a puffer oldatba minden 10. percben addig, amíg a ST erő amplitúdó teljes depresszióját el nem értük. Minden egyes preparátum 11–12 mérési ponttal járult hozzá a görbe felállításához. A rocuronium koncentráció-hatás görbéjének meghatározásához 15 percenként adagoltuk a vegyületet az oldathoz. Az izomrelaxáns esetében két görbét határoztunk meg, két különböző magnézium koncentráció mellett. Az egyik esetben a rocuronium koncentráció-hatás görbéjét 1 mM magnézium koncentráció mellett vettük fel, a másik esetben pedig 1,5 mM magnézium koncentráció mellett. Az 1 mM magnézium koncentráció esetében a rocuronium kezdő dózisa 0,2 mg volt, amit 0,1 mg dózisosk követtek, amíg kontrakció már nem volt érzékelhető ideg stimulációt követően. Mindegyik preparátum 5–7 mérési ponttal járult hozzá a görbe kialakításához. A 1,5 mM magnézium koncentráció mellett felvett koncentráció-hatás görbénél az első rocuronium dózis 0,1 mg volt, melyet két 0,05 mg dózisos rocuronium követett, majd 0,025 mg dózisoskban folytattuk a rocuronium adagolását, addig amíg már nem volt kiváltható izomkontrakció elektromos stimulusra. Mindegyik preparátum 7–11 mérési ponttal járult hozzá a görbe kialakításához.

3.3.3.2. A magnézium préblokk hatásának megítélése

Végeztünk egy mérésorozatot annak meghatározása érdekében, hogy az izomrelaxálás megkezdése előtt, azaz préblokk alkalmazott különböző magnézium koncentrációknak milyen hatása van a neuromuszkuláris blokk függeszthetőségére. Ebben a kísérletsorozatban két különböző magnézium koncentráció mellett mértük a rocuroniummal kivitelezett izomrelaxáció sugammadexszel történő függeszthetőségét. 1,5 mM magnézium koncentráció mellett egy egyszeri 0,3 mg dózísú rocuroniumot adtunk az oldathoz, 1 mM magnézium koncentráció mellett egy egyszeri 0,5 mg dózísú rocuroniumot adtunk az oldathoz, hogy 90–95%-os single twitch erő amplitúdó depressziót érjünk el. Ezt követően 10 percenként adagoltuk a sugammadexet, hogy felvegyük a vegyület koncentráció-hatás görbéjét. A ST erő amplitúdó korrigálva volt az alapvonalhoz, ami a sugammadex beadását megelőző ST erő amplitúdó volt, valamint normalizálva volt a teljes reverzálás utáni maximális kontrakciós amplitúdóhoz, hogy megalkothassuk a kumulatív koncentráció-hatás görbéket. 1 mM magnézium koncentráció mellett a kezdő sugammadex dózis 0,2 mg volt, amit négy 0,1 mg-os dózis követett, majd egy 0,15 mg-os dózis, végül pedig 0,25 mg-os dózisok addig, amíg a ST erő amplitúdó el nem ért egy platót, és a neuromuszkuláris blokk függesztettsége nem igazolódott azáltal, hogy a TOFR > 0,9 ért el. Mindegyik preparátum 5–8 mérési ponttal járult hozzá a koncentráció-hatás görbe megalkotásához. A 1,5 mM magnézium koncentráció mellett a kezdő sugammadex dózis 0,05 mg volt, amit három 0,1 mg dózísú sugammadex követett, majd egy 0,15 mg dózísú sugammadex, végül 0,25 mg dózísú sugammadexek annyiszor amíg a ST erő amplitúdó el nem ért egy plató szintet, és a TOFR > 0,9-el igazoltuk a teljes izomerő visszatértét. Minden egyes preparátum 7 mérési ponttal járult hozzá a koncentráció-hatás görbe kialakításához.

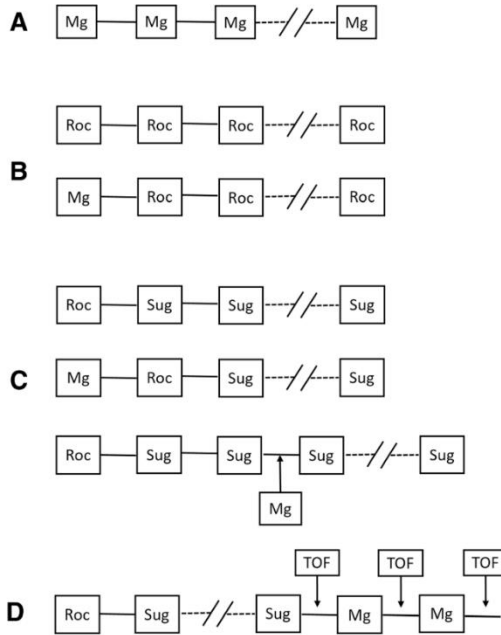
3.3.3.3. A magnézium posztblokk hatásának megítélése

Ebben a kísérletben azt határoztuk meg, hogy a magnéziumnak milyen hatása van az izomrelaxációra és annak függeszthetőségére sugammadexszel, azután megemelve a dózísát, hogy a már megkezdődött a neuromuszkuláris blokk függesztése, azaz posztblokk. A kísérletünkben 1 mM magnézium koncentráció mellett 0,5 mg rocuroniumot adtunk az oldathoz, hogy 90–95%-os ST erő amplitúdó csökkenést hozzunk létre. Ezt követően megkezdtuk a neuromuszkuláris blokk felfüggesztését 10

percenként adagolt 0,1–0,2 mg dózisú sugammadexszel, addig amíg az összes sugammadex dózis el nem érte a 0,5 mg-ot. Ekkor az oldatban a magnézium koncentrációt 1,5 mM-ra növeltük, és a sugammadex adagolását folytattuk először egy egyszeri 0,15 mg dózissal, majd egy 0,1 mg dózissal. Ezt követően 0,25 mg dózisokban adagoltuk a függesztőszert, addig, amíg egy plató hatást nem értünk el a ST erő amplitúdójában, és a teljes izomerő visszatérte nem igazolódott, azáltal, hogy a $TOFR > 0,9$ -et el nem érte. A ST erő amplitúdó korrigálva volt az alapvonalhoz, ami a sugammadex beadását megelőző ST erő amplitúdó volt, valamint normalizálva volt a teljes reverzálás utáni maximális kontrakciós amplitúdóhoz, hogy megalkothassuk a kumulatív koncentráció-hatás görbéket. Mindegyik preparátum 6–7 mérési ponttal járult hozzá a kumulatív koncentráció-hatás görbe kialakításához.

3.3.3.4. A magnézium hatása a függesztés „safety margin”-jára

Ebben a kísérletben azt mértük, hogy az oldatban növekvő magnézium koncentráció hogyan befolyásolja a sugammadexel függesztett rocuronium blokkot azután, hogy már teljesen visszatért az izomerő a függesztés hatására, azaz milyen hatással van a magnézium a függesztés „safety margin”-jára.



2. ábra. Kísélet tervezet. A: magnézium koncentráció-hatás görbéjének felvétele. Magnézium dózisok voltak adagolva a puffer oldathoz 10 percenként, amíg a ST erő amplitúdó teljes szupressziója meg nem valósult. B: Rocuronium koncentráció-hatás görbéjének felvétele. 15 percenként bólus rocuronium volt adagolva, amíg a ST erő amplitúdó teljes szupressziója meg nem valósult. A magnézium hatásának felmérése érdekében a kísérlet meg volt ismételve úgy, hogy 10 perccel a rocuronium adagolásának megkezdése előtt, bólus magnézium volt adva az oldathoz. C: Sugammadex koncentráció-hatás görbéjének szerkesztése. Egy iniciális bólus rocuronium adását követően, mely egy minimum 90%-os ST erő amplitúdó depressziót okozott, sugammadex dózisok voltak adagolva 10 percenként, amíg a ST amplitúdó teljes visszatérése meg nem valósult. Az izomrelaxáció kiváltása előtt adott magnézium hatásának felmérése érdekében, a kísérlet megismétlésre került úgy, hogy 10 perccel a rocuronium adását megelőzően, bólus magnézium került beadásra az oldatban. Az izomblokk kialakulása után adott magnézium hatásának meghatározása érdekében, a kísérlet megismétlésre került úgy, hogy a bólus magnézium, az izomerő sugammadexel létrehozott részleges visszatérését követően került beadásra, és a sugammadex dozírozása ezt követően folytatódott tovább. D: A magnézium hatásának felmérése a függesztés „safety margin”-jára. Bólus rocuronium adását követően sugammadex dózisok voltak adagolva az izomrelaxáció teljes, vagy már biztonságosnak ítélt határáig, TOFR-val mérve. Ezt követően magnézium dózisok voltak adagolva, és minden adag után TOFR mérés történt. Mg: magnézium, Roc: rocuronium, Sug: sugammadex, TOF: train-of-four, TOFR: train-of-four ráta.

Ezt a kísérletet úgy viteleztük ki, hogy sugammadexszel függesztettük a rocuronium kiváltotta izomblokkot TOFR $\approx 1,0$ -re, amikor már látható fáradás nem volt tapasztalható, azaz a teljes izomerő visszatéréséig, vagy pedig egy TOFR $> 0,9$ értékre, amikor még volt vizuálisan látható fáradás, de már a klinikailag biztonságosnak tartott extubáció kritériumát elértük. Ezt követően a magnézium koncentrációt 0,5 mM-os lépésekben emeltük, addig amíg 2 mM koncentrációt nem értünk el. A TOFR-t 15 másodpercenként mértük 10 percen keresztül minden egyes magnézium koncentráció változást követően, és a végső stabil TOFR-t használtuk fel, hogy számszerűsítsük a TOFR-ban végbement változásokat. A 2. ábra mutatja be a kísérleti tervünket.

3.4. Statisztikai elemzés

Mind a két kísérlet sorozatunkban a MS Windowsra kialakított GraphPad Prism 6-ot (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) használtunk a koncentráció-hatás görbék illesztéséhez. A görbe illesztéshez több lehetséges megoldást is kínál a szoftver, melyek a következők: non-lineáris regresszió, „log(agonist) vs. normalized response-variable slope”, „log(inhibitor) vs. normalized response-variable slope”, „log(agonist) vs. response-Find EC anything”. Az illesztő egyenlet a következő volt

$$y = \frac{100}{1 + (EC50 - X) \cdot Hillslope}, \text{ ahol } X = \log(\text{koncentráció})$$

és y a normalizált és bázisvonal korrigált kontrakciós amplitúdó. EC_{90} és EC_{99} értékek a következő egyenlettel voltak meghatározva

$$\log EC50 = \log ECF - \frac{1}{Hillslope} \cdot \log \frac{F}{100 - F}, \text{ ahol } F = 90 \text{ vagy } F = 99$$

3.4.1. A carboxymethyl-gamma-cyclodextrin hatásának vizsgálata-power analízis

A kísérletet megelőzően egy előzetes mérést végeztünk ($n = 3$) a minta méretének meghatározására, amely szükséges a pipecuronium koncentráció-hatás görbéjének kiszámításához. Eredményként $\log EC_{50} = 0,14$ és $SD = 0,007$ értékeket kaptunk. 10%-os változást feltételezve az EC_{50} értékében, ami már klinikailag releváns változásnak mondható, $\alpha = 0,05$ és 80%-os „power” esetén $n = 5$ mintaméretet kaptunk egy kétoldali teszt elvégzéséhez. Statisztikai összehasonlítása a koncentráció-hatás görbéknek az MS Windowsra kifejlesztett GraphPad Prism 6 programmal végeztük el, egy extra sum-of-squares F-teszttel. $\log EC_{50}$, $\log EC_{90}$ vagy $\log EC_{99}$ volt a modell komponens, amit használtunk az extra sum-of-squares-hez. Az eredmények átlagban, vagy 95%-os konfidencia intervallumban (CI) vannak feltüntetve, amennyiben másképpen nem specifikáljuk.

A szelektív relaxáns blokkoló vegyülettel történő felfüggesztés előtti, a 90–95%-os ST erő amplitúdó depressziót létrehozó izomrelaxáns dózisok összehasonlítása, illetve az EC_{50} , EC_{90} és EC_{99} -hez hozzárendelt különböző izomrelaxáns koncentrációkat Student T-test-el hasonlítottuk össze Microsoft Excelben (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

3.4.2. A magnézium hatásának vizsgálata-power analízis

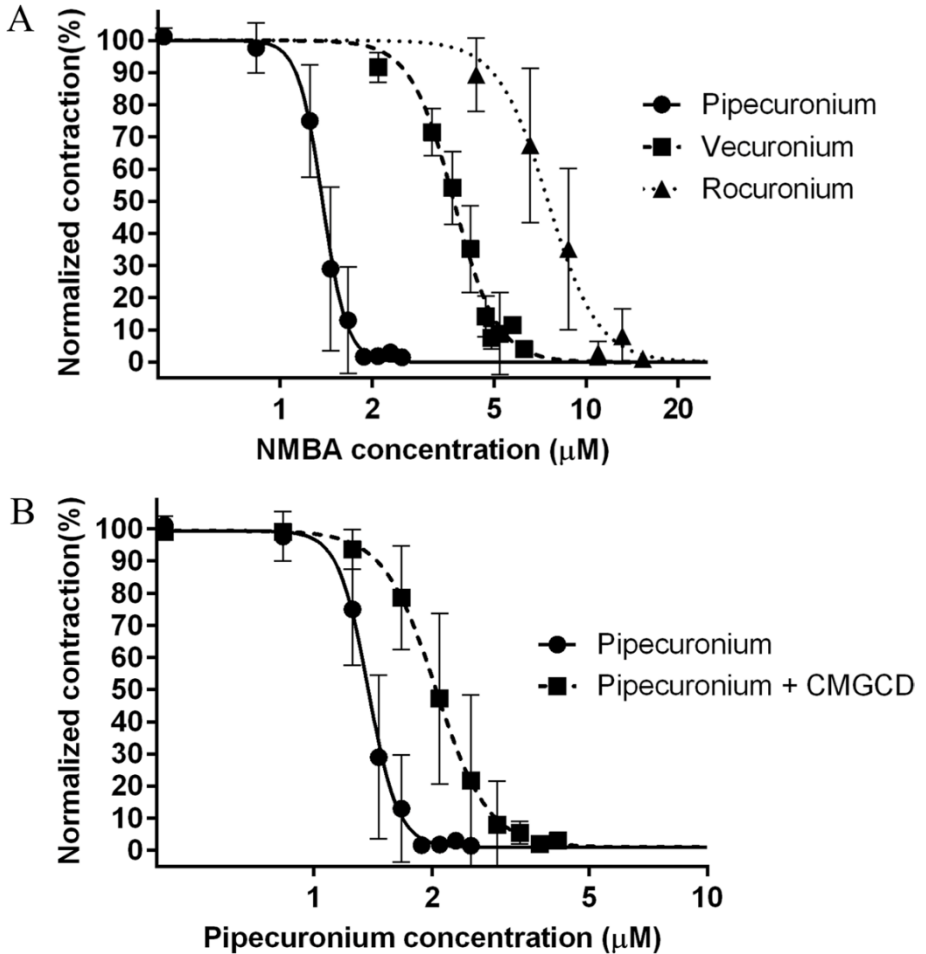
A kísérletet megelőzően egy előzetes mérést végeztünk ($n = 3$) a minta méretének meghatározására, amely szükséges a rocuronium koncentráció-hatás görbéjének kiszámításához. Eredményeinkben $\log EC_{50} = 0,875$ és $SD = 0,023$ értékeket kaptunk. 10%-os változást feltételezve az EC_{50} értékében, ami már klinikailag releváns változásnak mondható, $\alpha = 0,05$ és 80%-os „power” esetén $n = 4$ mintaméretet kaptunk egy kétoldali teszt elvégzéséhez. A koncentráció-hatás görbék statisztikai összehasonlítása az MS Windowsra kifejlesztett GraphPad Prism 6 programmal történt, extra sum-of-squares F-teszttel. Az extra sum-of-squares-hez $\log EC_{50}$ modell komponenset használtunk. Az eredmények átlagban, vagy 95%-os konfidencia intervallumban (CI) vannak feltüntetve.

4. Eredmények

4.1. A carboxymethyl- γ -ciklodextrin hatásának vizsgálata

4.1.1. Koncentráció-hatás kapcsolat a különböző izomrelaxánsok esetén

Első lépésként meghatároztuk a koncentráció-hatás görbéit az összes általunk vizsgált izomrelaxánsoknak, azaz a rocuroniumét, vecuroniumét, és pipecuroniumét. Eredményeinkben az 50%-os (EC_{50}), és 90%-os (EC_{90}) effektív koncentrációt tüntettük fel, melyek azok a koncentrációk, melyek mellett rendre, 50%-os, valamint 90%-os az izomrelaxáns hatása. Rocuronium esetén azt kaptuk, hogy az EC_{50} értéke $7,50 \mu\text{M}$ ($6,93$ – $8,12 \mu\text{M}$), az EC_{90} értéke $11,36 \mu\text{M}$ ($9,64$ – $13,39 \mu\text{M}$). Vecuronium esetén az EC_{50} értéke $3,69 \mu\text{M}$ ($3,59$ – $3,80 \mu\text{M}$), az EC_{90} értéke pedig $5,29 \mu\text{M}$ ($4,97$ – $5,63 \mu\text{M}$). A pipecuronium EC_{50} értéke $1,38 \mu\text{M}$ ($1,33$ – $1,42 \mu\text{M}$), EC_{90} értéke pedig $1,68 \mu\text{M}$ ($1,58$ – $1,79 \mu\text{M}$). Az izomrelaxánsok koncentráció-hatás görbéit a 3. ábra A része mutatja be. Az eredményeink alapján a pipecuronium mutatta a legnagyobb potenciált, míg a vecuroniumnak közepes mértékű volt a potenciálja. A rocuroniumnak kellett a legnagyobb koncentráció, hogy effektíven csökkentse a ST erő amplitúdót ex vivo rendszerünkben. Az értékek átlag és 95%-os konfidencia intervallumban vannak megadva.



3. ábra. Koncentráció-hatás görbéi a különböző izomrelaxánsoknak. A: A pipecuronium, vecuronium és rocuronium koncentráció-hatás görbéi. Normalizált kontrakciós erő amplitúdó, az izomrelaxánsok koncentrációjának tízes alapú logaritmusának függvényében (\log_{10}) ábrázolva. A görbék a legjobban illeszkedő görbék, non-lineáris regresszióval közelítve, $n = 5$ különböző preparátumból. Mérési pontok az átlag értéket reprezentálják a normalizált erő amplitúdójának egy adott koncentráció mellett. A hiba-sávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak. B: A pipecuronium koncentráció-hatás görbéjének eltolódását mutatja 13,3 μM CMGCD előkezelést követően. CMGCD: carboxymethyl- γ -ciklodextrin, NMBD: neuromuszkuláris blokkoló szer.

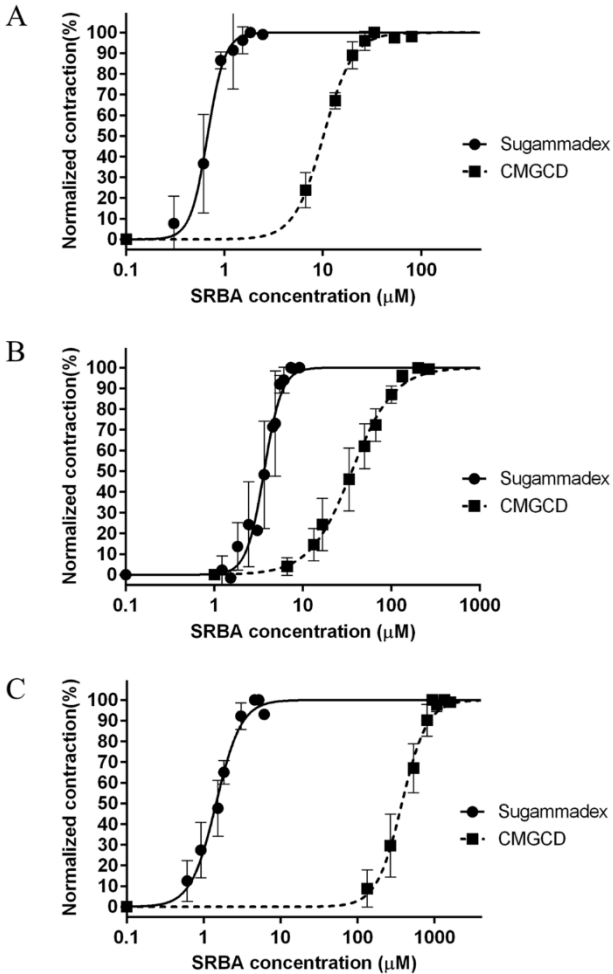
4.1.2. Az izomrelaxánsok által kiváltott neuromuszkuláris blokk felfüggesztésének mechanizmusa CMGCD-vel

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az interakció jellegét a CMGCD és az izomrelaxánsok között, CMGCD-t adtunk az oldathoz, úgy hogy annak az oldatban való végső koncentrációja $13,3 \mu\text{M}$ legyen, mielőtt elkezdtük növelni a pipecuronium koncentrációját. A függesztőszerrel történő előkezelés után a pipecuronium EC_{50} értéke $2,04 \mu\text{M}$ ($1,94\text{--}2,16 \mu\text{M}$), EC_{90} értéke pedig $2,90 \mu\text{M}$ ($2,58\text{--}3,25 \mu\text{M}$) volt. Az előkezelés CMGCD-vel jobbra tolódást eredményezett a pipecuronium koncentráció-hatás görbéjében. A maximális ST depresszió viszont továbbra is kivitelezhető volt a CMGCD jelenlétében, csak magasabb pipecuronium koncentráció mellett (ahhoz viszonyítva, amikor a CMGCD nem volt jelen az oldatban). A kapott eredmények koncentráció-hatás görbéit a 3. ábra B része szemlélteti.

A kapott eredményünk azt feltételezi, hogy a CMGCD megköti a pipecuroniumot addig, amíg a receptorai nem telítődnek, ami után a nem kötött izomrelaxáns molekulák képesek ST depressziót létrehozni.

4.1.3. A CMGCD potenciálja a neuromuszkuláris blokk felfüggesztésére a sugammadexhez képest

Mindhárom izomrelaxánshoz felvettük a CMGCD és sugammadex koncentráció-hatás görbéit. A rocuronium esetében azt kaptuk, hogy a CMGCD EC_{50} értéke $35,89 \mu\text{M}$ ($32,67\text{--}39,41 \mu\text{M}$) volt, az EC_{90} értéke pedig $119,9 \mu\text{M}$ ($101,5\text{--}141,9 \mu\text{M}$), a sugammadex EC_{50} értéke $3,67 \mu\text{M}$ ($3,43\text{--}3,92 \mu\text{M}$), az EC_{90} pedig $6,08 \mu\text{M}$ ($5,34\text{--}6,92 \mu\text{M}$) volt. A pipecuronium kiváltotta izomrelaxáció függesztéséhez használt CMGCD EC_{50} értéke $10,14 \mu\text{M}$ volt ($9,61\text{--}10,70 \mu\text{M}$), EC_{90} értéke $21,60 \mu\text{M}$ ($19,63\text{--}23,76 \mu\text{M}$) volt, a sugammadex EC_{50} értéke $0,67 \mu\text{M}$ ($0,62\text{--}0,74 \mu\text{M}$), EC_{90} értéke $1,05 \mu\text{M}$ ($0,86\text{--}1,29 \mu\text{M}$) volt. A vecuronium függesztésénél azt kaptuk eredményül, hogy a CMGCD EC_{50} értéke $376,1 \mu\text{M}$ volt ($341,9\text{--}413,8 \mu\text{M}$), EC_{90} értéke $863,1 \mu\text{M}$ ($727,8\text{--}1023 \mu\text{M}$) volt, a sugammadex EC_{50} értéke $1,45 \mu\text{M}$ ($1,35\text{--}1,56 \mu\text{M}$), EC_{90} értéke pedig $3,33 \mu\text{M}$ ($2,82\text{--}3,92 \mu\text{M}$) volt. A koncentráció-hatás görbéket a 4. ábra mutatja.



4. ábra. Az SRBA-ek koncentráció-hatás görbéi. A: Pipecuronium indukálta izomrelaxáció függesztésére használt sugammadex és CMGCD koncentráció-hatás görbéi. B: Rocuronium indukálta izomrelaxáció függesztésére használt sugammadex és CMGCD koncentráció-hatás görbéi. C: Vecuronium indukálta izomrelaxáció függesztésére használt sugammadex és CMGCD koncentráció-hatás görbéi. Normalizált kontrakciós erő amplitúdó, a SRBA-ek koncentrációjának tízes alapú logaritmusának függvényében (\log_{10}) ábrázolva. A görbék a legjobban illeszkedő görbék, non-lineáris regresszióval közelítve, $n = 5$ különböző preparátumból. Mérési pontok az átlag értéket reprezentálják a normalizált erő amplitúdónak egy adott koncentráció mellett. A hiba-sávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak. CMGCD: carboxymethyl- γ -ciklodextrin, SRBA: szelektív relaxáns kötő ágens.

Az EC_{50} és EC_{90} értékek mind a sugammadexnél mind a CMGCD-nél a pipecuroniumnál voltak a legalacsonyabbak. A sugammadex potenciálja, hogy függessze a vecuronium által létrehozott neuromuszkuláris blokkot, nagyobb volt, mint a rocuronium által létrehozott blokknál, míg a CMGCD-nek a rocuroniumnál volt nagyobb potenciálja, és a vecuronium felfüggesztésére volt a leggyengébb hatással. Mind a három izomrelaxáns esetén a sugammadexnek szignifikánsan alacsonyabb volt az EC_{50} és EC_{90} értéke a CMGCD-hez képest ($< 0,0001$).

Amíg a CMGCD-vel teljes függesztést lehetett elérni pipecuronium indukálta izomrelaxáció esetén, addig rocuronium esetében csak $94,6 \pm 1,5\%$ -os izomerő visszatérést, vecuronium esetében $86,3 \pm 5\%$ -os ST amplitúdót lehetett elérni. Érdekességképp a rocuronium által kiváltott blokk esetén az ST erő amplitúdó visszatérése nagyobb volt, mint a TOF ratio visszatérése ($94,6\%$ szemben $90,6\%$ -al), míg vecuronium esetében az ST erő amplitúdó visszatérte alacsonyabb volt, mint a TOF ráta visszatérése ($86,3\%$ szemben $87,6\%$ -al). Bár a ST visszatérés és a TOF arány közötti különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($p = 0,249$ rocuroniumra, és $p = 0,637$ vecuroniumra).

4.1.4. Szelektív relaxáns kötő ágensek affinitása a neuromuszkuláris blokkoló szerekhez

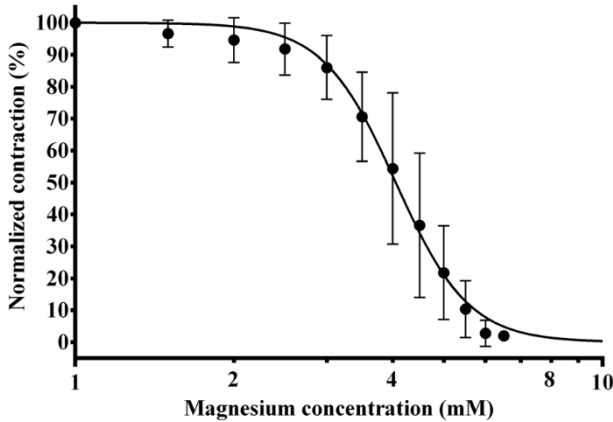
Mivel az izomrelaxánsokat olyan koncentrációban adtuk az oldathoz, hogy minimum 90% -os ST erő amplitúdó csökkenést okozzanak, a neuromuszkuláris blokkoló szerek potenciál-beli különbségei, szignifikáns koncentráció-beli különbségeket eredményeztek ($p < 0,0001$ az összes NMBD párhoz). Hogy jobban fel tudjuk mérni az SRBA-ek valós affinitását az izomrelaxánsokhoz, mind a két függesztőszerhez kikalkuláltuk az EC_{50} és EC_{90} értékeknek az adott NMBD koncentrációjához viszonyított arányát, így megkapva a korrigált effektív koncentráció értékeket ($EC_{50,kek}$, $EC_{90,kek}$). Rocuroniummal kiváltott izomrelaxáció esetén a CMGCD $EC_{50,kek}$ értéke $3,81 \mu\text{M}$ ($2,44\text{--}5,19 \mu\text{M}$) volt, az $EC_{90,kek}$ értéke pedig $10,60 \mu\text{M}$ ($9,63\text{--}11,57 \mu\text{M}$). Rocuronium kiváltotta izomrelaxáció esetén a sugammadex $EC_{50,kek}$ értéke $0,34 \mu\text{M}$ ($0,24\text{--}0,44 \mu\text{M}$) volt, $EC_{90,kek}$ értéke $0,55 \mu\text{M}$ ($0,48\text{--}0,62 \mu\text{M}$) volt, $EC_{99,kek}$ értéke pedig $0,95 \mu\text{M}$ ($0,82\text{--}1,08 \mu\text{M}$) volt. Pipecuroniummal kiváltott relaxáció esetén a CMGCD $EC_{50,kek}$ értéke $5,15 \mu\text{M}$ ($4,21\text{--}$

6,08 μM) volt, $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ értéke 11,02 μM (8,95–13,08 μM) volt. Pipecuroniummal kiváltott izomrelaxáció esetén a sugammadex $\text{EC}_{50,\text{kek}}$ értéke 0,38 μM (0,23–0,54 μM) volt, $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ értéke 0,58 μM (0,43–0,74 μM) volt, míg $\text{EC}_{99,\text{kek}}$ értéke 0,95 μM (0,69–1,20 μM) volt. Vecuronium esetében azt kaptuk, hogy a CMGCD $\text{ED}_{50,\text{kek}}$ értéke 101,2 μM (73,9–128,4 μM) volt, $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ érték 306,0 μM (172,7–439,2 μM) volt. Vecuronium esetén a sugammadex $\text{EC}_{50,\text{kek}}$ értéke 0,32 μM (0,23–0,41 μM), az $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ 0,68 μM (0,54–0,83 μM), és az $\text{EC}_{99,\text{kek}}$ értéke pedig 1,67 μM (1,08–2,26 μM) volt. Sugammadex esetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az $\text{EC}_{50,\text{kek}}$ és $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ értékekben, sem pipecuronium, sem rocuronium, sem vecuronium esetében. A koncentráció-hatás görbék sugammadex esetében nagyon meredekek voltak, emiatt kalkuláltuk ki az $\text{EC}_{99,\text{kek}}$ értékeket is. Az $\text{EC}_{99,\text{kek}}$ érték vecuronium esetében szignifikánsan magasabb volt, mint pipecuronium ($p = 0,024$) és rocuronium esetében ($p = 0,013$). A CMGCD esetében az $\text{EC}_{50,\text{kek}}$, és $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ értékek szignifikánsan magasabbak voltak vecuronium esetében, a rocuronium és a pipecuronium ezen értékeihez képest. Az $\text{EC}_{50,\text{kek}}$, és $\text{EC}_{90,\text{kek}}$ értékek rocuronium esetében nem voltak szignifikánsan kisebbek a pipecuroniumnál kalkulált értékeknél.

4.2. A magnézium hatásának vizsgálata

4.2.1. Magnézium hatása a neuromuszkuláris transzmisszióra

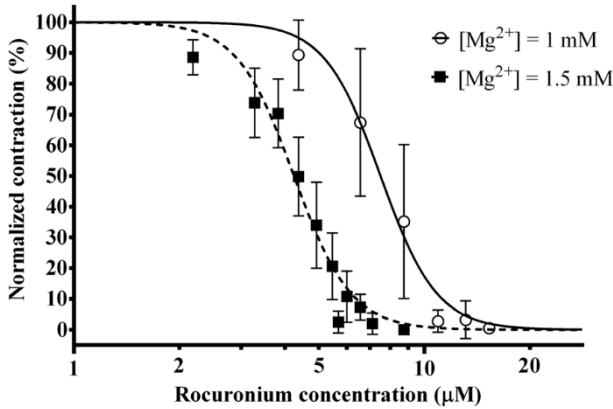
Első lépésként meghatároztuk a magnézium koncentráció-hatás görbét (ld. ábra). Az effektív koncentráció 50%-ának (EC_{50}) eléréséhez 4,06 mM-ra (95% CI: 3,91–4,21 mM) volt szükség. A koncentráció-hatás görbéből látszik, hogy megnövelve a magnézium koncentrációt 1 mM-ról 1,5 mM-ra, átlagosan 96,6%-ra (95% CI: 91,4–101,8%) csökkent a ST erő amplitúdó, ahhoz az amplitúdóhoz képest, amit 1mM magnézium koncentrációnál mértünk (5. ábra).



5. ábra. Magnézium koncentráció-hatás görbéje. Normalizált kontrakciós erő amplitúdó, a magnézium koncentrációjának tízes alapú logaritmusának függvényében (\log_{10}) ábrázolva. A görbék a legjobban illeszkedő görbék, non-lineáris regresszióval közelítve, $n = 5$ különböző preparátumból. Mérési pontok az átlag értékét reprezentálják a normalizált erő amplitúdónak egy adott koncentráció mellett. A hibasávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak.

4.2.2. A magnézium hatása a rocuronium által kiváltott neuromuszkuláris blokkra

A rocuronium koncentráció-hatás görbáját 1 mM és 1,5 mM magnézium koncentráció mellett is felvettük. A rocuronium EC_{50} értéke 1 mM magnézium koncentráció mellett $7,5 \mu\text{M}$ ($6,93\text{--}8,12 \mu\text{M}$) volt, EC_{95} értéke pedig $12,89 \mu\text{M}$ ($10,67\text{--}15,56 \mu\text{M}$) volt. 1,5 mM magnézium koncentráció mellett a rocuronium EC_{50} értéke $4,26 \mu\text{M}$ ($4,09\text{--}4,43 \mu\text{M}$) volt, EC_{95} értéke pedig $7,35 \mu\text{M}$ ($6,64\text{--}8,13 \mu\text{M}$) volt ($p < 0,0001$). A magnézium koncentrációt növelve balra tolódást tapasztaltunk az izom-relaxáns koncentráció-hatás görbéjében (6. ábra).

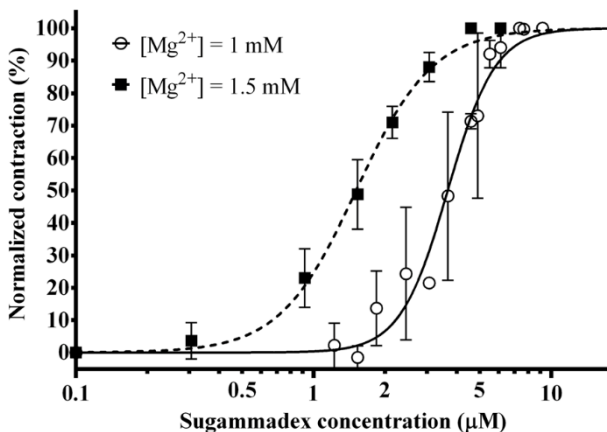


6. ábra. Rocuronium koncentráció-hatás görbéi két különböző, 1 mM és 1,5 mM, magnézium koncentráció mellett. Normalizált kontrakciós erő amplitúdó, a rocuronium koncentrációjának tízes alapú logaritmusának függvényében (\log_{10}) ábrázolva. A görbék a legjobban illeszkedő görbék, non-lineáris regresszióval közelítve, $n = 5$ különböző preparátumból. Mérési pontok az átlag értéket reprezentálják a normalizált erő amplitúdónak egy adott koncentráció mellett. A hibásávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak.

4.2.3. A magnézium hatása a rocuronium által kiváltott neuromuszkuláris blokk sugammadexszel való függesztésére

Ehhez a méréshez rocuroniummal létrehozott izomrelaxációt értünk el 1 mM és 1,5 mM magnézium koncentráció mellett, majd lépésről-lépésre növeltük a Sugammadex koncentrációját az oldatban, hogy a neuromuszkuláris blokk felfüggesztését vizsgáljuk. A két különböző magnézium koncentráció mellett felvett koncentráció-hatás görbéjét a sugammadexnek a 7. ábra mutatja be. Eredményeinkben azt kaptuk, hogy a sugammadex EC_{50} értéke 1 mM magnézium koncentráció mellett 3,67 μM (3,43–3,92 μM) volt, 1,5 mM magnézium koncentráció mellett pedig 1,51 μM (1,42–1,50 μM) volt. Az effektív koncentráció a 95%-os izomerő kontrakció visszatéréséhez (EC_{95}) 1 mM magnézium koncentráció mellett 7,22 μM (6,09–8,54 μM), 1,5 mM magnézium koncentráció mellett 4,48 μM (3,80–5,29 μM) volt. Az 1 mM és 1,5 mM magnézium koncentráció mellett mért EC_{50} és EC_{95} értékek közötti

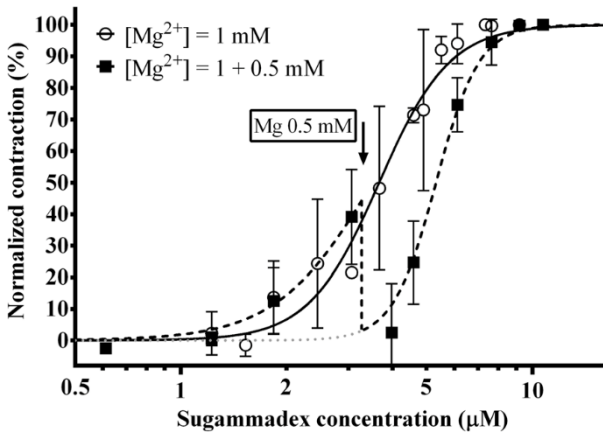
koncentráció különbségek statisztikailag szignifikánsak voltak ($p < 0,0001$ az EC_{50} esetében, és $p = 0,002$ EC_{95} esetében).



7. ábra. Sugammadex koncentráció-hatás görbéi a rocuronium kiváltotta izomrelaxáció függesztésénél, még az izomrelaxálás előtt megemelt, két különböző, 1 mM és 1,5 mM, magnézium koncentráció mellett. Normalizált kontrakciós erő amplitúdó, a sugammadex koncentrációjának tízes alapú logaritmusának függvényében (\log_{10}) ábrázolva. A magnézium izomblokk potenciózó hatása miatt a rocuronium koncentrációja 0,3 mg volt a 1,5 mM magnézium koncentráció mellett, és 0,5 mg, az 1 mM magnézium koncentráció mellett. A görbék a legjobban illeszkedő görbék, non-lineáris regresszióval közelítve, $n = 5$ különböző preparátumból. Mérési pontok az átlag értéket reprezentálják a normalizált erő amplitúdónak egy adott koncentráció mellett. A hibásávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak.

Habár a látszólagos potenciálja a sugammadexnek úgy tűnik, hogy nő, ahogy növeljük a magnézium koncentrációt, a hatást megzavarja, hogy a magasabb magnézium koncentráció mellett kisebb rocuronium koncentráció váltja ki az azonos mértékű neuromuszkuláris blokkot. A kísérleteinkben, hogy 90% ST erő amplitúdó csökkenést érzünk el, 1 mM magnézium koncentráció mellett 0,5 mg rocuroniumra volt szükség, 1,5 mM magnézium koncentráció mellett, pedig csak 0,3 mg rocuroniumra. Annak érdekében, hogy kizárjuk a különböző rocuronium koncentrációk okozta hatásokat a sugammadexel történő izomrelaxáció függesztésre, a neuromuszkuláris blokk parciális felfüggesztését követően emeltünk a magnézium koncentráción, így elérve, hogy ugyanolyan rocuronium koncentráció mellett figyeljük a sugammadex hatását különböző magnézium koncentrációk mellett (8. ábra). A megnövelt mag-

nézium koncentráció ebben a felállásban, egy meredek csökkenést eredményezett a ST erő amplitúdóban, és egy következményes növekedést a sugammadex EC₅₀ értékében, azaz 3,67 μM-ról (3,43–3,92 μM) 5,36 μM-ra (5,18–5,53 μM) növekedett, ami statisztikailag szignifikáns különbséget eredményezett (p < 0,0001). Az EC₉₅ értékek között viszont nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (p = 0,542), 7,22 μM-ról (6,09–8,54 μM) 7,61 μM-ra (7,05–8,20 μM) növekedett.

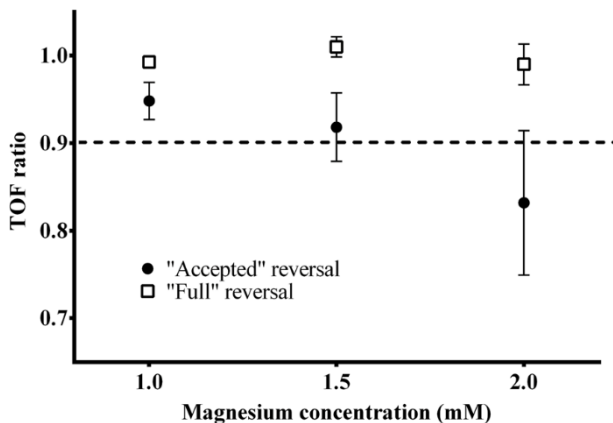


8. ábra. Izomrelaxációt követően adott magnézium hatása sugammadex koncentráció-hatás görbéjére, rocuronium kiváltotta izomrelaxáció függesztésénél. Normalizált kontrakciós erő amplitúdó, a sugammadex koncentrációjának tízes alapú logaritmusának függvényében (log₁₀) ábrázolva. 1 mM magnézium koncentráció mellett 0,5 mg rocuronium került beadásra, amit sugammadexel függesztettünk, vagy azonos magnézium koncentráció mellett (○), vagy parciális reverzálást követően 1,5 mM-ra megemelt magnézium koncentráció mellett (■). A magnézium koncentráció parciális izomrelaxálás függesztését követően lett megemelve, amit a fekete nyíl jelöl, hogy vizualizálhatók lehessenek a kontrakciók, a magnézium izomblokk potenciózó hatása ellenére. A fekete szaggatott vonal (---) az tényleges normalizált kontrakciós erő amplitúdót, míg a szürke pöttyözött vonal (●) a legjobban illeszkedő görbét mutatja, non-lineáris regresszióval közelítve, n = 5 különböző preparátumból. Mérési pontok az átlag értéket reprezentálják a normalizált erő amplitúdónak egy adott koncentráció mellett. A hibásávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak.

4.2.4. Magnézium hatása a sugammadexszel történt neuromuszkuláris blokk felfüggesztését követően

Mivel a magnézium hozzáadása az oldathoz parciális sugammadexszel való függesztést követően csökkenést eredményezett a ST erő amplitú-

dóban, és növekedést a koncentráció-hatás görbe meredekségében, meg akartuk vizsgálni, hogy változó magnézium koncentrációk mellett a biztonságos neuromuskuláris felfüggesztés tradicionális mérése továbbra is megbízható-e. Ezért a neuromuskuláris blokkot teljes mértékben felfüggesztettük (TOF arány ≈ 1 , átlag TOF arány $0,99 \pm 0,006$), vagy pedig a biztonsági határ felettire, de még látható csökkenéssel (TOF arány $> 0,9$, átlag TOF arány $0,95 \pm 0,02$), és ezt követően emeltük a magnézium koncentrációt az oldatban. A sugammadex/rocuronium arány 1,43 volt ($0,83-2,02$) a TOF arány ≈ 1 csoportban, és 0,68 ($0,60-0,76$) a TOF arány $> 0,9$ csoportban. Amíg a TOF arány stabil maradt növekvő magnézium koncentráció mellett a TOF arány ≈ 1 -ben, addig a TOF arány $> 0,9$ csoportban folyamatos csökkenést észleltünk a TOF arányban, és a neuromuskuláris blokk biztonsági szint alá való visszatérését tapasztaltuk (9. ábra).



9. ábra. Magnézium kiváltotta változás a „train-of-four” (TOF) rátában. TOF ráta a magnézium koncentráció függvényében. 0,5 mg rocuronium koncentrációt követően sugammadex volt adagolva addig amíg, a klinikailag elfogadott értékét el nem érte a TOF ráta, azaz $1 > \text{TOF ráta} > 0,9$, de még látható fáradás, vagy pedig teljes függesztésig, azaz TOF ráta $\approx 1,0$, fáradás nem látható. Ezt követően a magnézium koncentráció 1,5 mM-ra lett megemelve, majd 2,0 mM-ra. Mindegyik függesztési típus $n = 5$ különböző preparátumból volt mérve. Mérési pontok a TOF ráta átlagát reprezentálják egy adott koncentrációnál. A hibásávok a standard deviációját mutatják a mérési pontoknak.

5. Megbeszélés

Az izomrelaxáció, ami az általános anesztézia egyik alapja, súlyos szövődeményeket okozhat, ha fennmarad a hatása az extubációt követően. A posztoperatív reziduális neuromuszkuláris blokk, és az acetilkolinészteráz gátlók okozta mellékhatások miatt a klinikai gyakorlat a közepes hatástartamú neuromuszkuláris blokkoló szerek elterjedésének kedvezett a hosszú hatású izomrelaxánsokkal szemben. Ennek ellenére a PORNB nem lett megbízhatóan eliminálva a közepes hatástartamú izomrelaxánsok használatával sem, ezért a neuromuszkuláris blokk rutin monitorozása, valamint a megfelelő felfüggesztése, amennyiben szükséges, elengedhetetlenek a megfelelő betegbiztonság érdekében. A szelektív relaxáns kötő ágensek, nevezetesen a sugammadex, gyors és biztos felfüggesztését eredményezi az izomrelaxánsoknak, kevés mellékhatással. A vegyület használata mellett azonban ritkán allergiás reakciók, és anafilaxiás sokk mind felnőttekben, mind gyerekekben kerültek leírásra. Ezen kívül nagyon ritkán, súlyos atropin rezisztens bradikardiáról és aszisztóliáról is számoltak már be tanulmányok. Továbbá a sugammadex hatástalan benzilizokinolin vázas izomrelaxánsokkal szemben, mint amilyen például az atracurium, vagy cisatracurium. Ezek miatt, egy konstans keresés folyik a neuromuszkuláris blokkoló szerek alternatív antagonistái után, melyeknek szélesebb a felfüggesztési spektruma, és kevesebb mellékhatással rendelkeznek.

A mi kísérleteinkben egy új szelektív izomrelaxáns kötő vegyület, a carboxymethyl- γ -ciklodextrin, hatását vizsgáltuk a rocuronium, vecuronium, és pipecuronium által kiváltott izomrelaxáció felfüggeszthetőségére, és vetettük össze a már klinikai gyakorlatban elterjedt sugammadexszel. Hogy megvizsgáljuk a γ -ciklodextrin származékok hatékonyságát a neuromuszkuláris blokk felfüggeszthetőségére, mi a kísérleteinkben egy izolált szövet preparátumot használtuk, ami egy patkány hemidiaphragmájából, és a hozzá kapcsolódó nervus phrenicusból állt. Az eredetileg Bülbring által leírt hemidiaphragma-nervus phrenicus preparátum számos klasszikus kísérletben közrejátszott, a neuromuszkuláris junkció farmakológiájának felkutatásában. Mivel a normál funkciója a neuromuszkuláris junkciónak, és az idegstimulációt követő elektromechanikus átvitel megtartott a hemidiaphragma-nervus phrenicus

preparátumban, ez az ex vivo rendszer megfelelő klinikailag releváns adatok kutatására, anélkül, hogy élő állatos kísérletet kelljen folytatni.

Mi a kísérleteinkben elsőként koncentráció-hatás görbéket szerkesztettünk, hogy meghatározzuk az EC₅₀ értékét a három aminoszteroid izomrelaxánsnak, amiket a klinikumban is használunk, nevezetesen a pipecuroniumét, a vecuroniumét és a rocuroniumét. A mi általunk kapott EC₅₀ értékek hasonlóak voltak, korábban publikált mérési eredményekhez, melyeket ehhez hasonló rendszerben mértek ki, ami így alátámasztja a mi általunk kapott eredmények érvényességét.

Eredményeinkben azt kaptuk, hogy a pipecuroniumnak volt a legnagyobb a hatékonysága, a három izomrelaxáns közül, azután következett a vecuronium, majd a rocuronium.

Az izomrelaxánsok koncentráció-hatás görbéinek felvétele után a két γ -ciklodextrin származék, a sugammadex, és a carboxymethyl- γ -ciklodextrin hatékonyságát vizsgáltuk a relaxánsok felfüggeszthetőségére. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a sugammadex, mind a CMGCD képes volt antagonizálni, mind a pipecuronium, mind a vecuronium, mind a rocuronium által létrehozott neuromuszkuláris blokkot, de a carboxymethyl- γ -ciklodextrin kisebb hatékonysággal.

Az eredetileg rocuronium indukálta neuromuszkuláris blokk felfüggesztésére szolgáló sugammadexről már számos kísérlet kimutatta, hogy mind vecuronium, mind pipecuronium által létrehozott izomrelaxáció felfüggesztésére is alkalmas, melyet a mi eredményeink is alátámasztottak. A függesztőszer hatékonyságának megállapítására, a különböző izomrelaxánsokkal szemben, in vitro és in vivo kísérletek eredményei állnak rendelkezésre. Egy in vitro kísérlet eredményei azt mutatták, hogy míg a sugammadex rocuronium asszociációs konstansa $1,79 \times 10^7$ mol/L, addig a sugammadex vecuronium asszociációs konstansa csak $5,72 \times 10^6$ mol/L, ami azt eredményezi, hogy a rocuronium komplex képződése a sugammadexel gyorsabb, mint a vecuronium komplex képződése a függesztőszerrel. A disszociációs konstansa a sugammadex-vecuronium komplexnek $0,17 \mu\text{M}$, ami 3,1-szer magasabb, mint a rocuronium sugammadex disszociációs konstansa, ami csak $0,055 \mu\text{M}$. Ez azt eredményezi, hogy a sugammadex komplexképződése vecuroniummal nem csak lassabb, de magasabb relatív koncentráció szükséges a függesztőszerből, mint rocuronium esetében. Az in vivo kísérletek sugammadexel, és vecuroniummal is azt mutatják, hogy

a relaxáns kötő ágens kevésbé hatékony vecuronium esetén, mint rocuronium esetén. In vitro kísérlet a sugammadex és pipecuronium affinitásának felmérésére eddig még nem történt, de klinikai in vivo kísérletek azt mutatják, hogy a függesztőszer affinitása a pipecuroniumhoz hasonló mértékű, mint a rocuroniumhoz. A mi eredményeink is ezt bizonyítják, azaz a sugammadex hasonló affinitást mutatott pipecuronium, rocuronium és vecuronium esetében, ha a koncentráció korrigált EC_{50} és EC_{90} értékeket nézzük, és csökkent affinitást vecuronium esetében korrigált EC_{99} értéknél. Az EC_{99} érték aránya a pipecuronium és rocuronium koncentrációjához körülbelül 1 volt, ami azt jelenti, hogy ekvimoláris koncentrációjú sugammadex elegendő volt az izomkontrakció teljes visszanyeréséhez az ezen két izomrelaxánssal létrehozott neuromuszkuláris blokk felfüggesztésénél. Vecuronium esetében, ez az arány közelítette az 1,7-et, ami azt jelentette, hogy csökkent a megkötő kapacitás, azaz majdnem kétszer annyi molekula sugammadexre volt szükséges ahhoz, hogy megkösse az összes vecuroniumot.

A carboxymethyl- γ -ciklodextrin származékkal végzett kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a vegyület képes volt antagonizálni, mind a pipecuronium, mind a vecuronium, mind a rocuronium által létrehozott neuromuszkuláris blokkot. A koncentráció korrigált EC_{50} és EC_{90} értékekben nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a rocuronium és pipecuronium esetében, bár a pipecuronium iránt nagyobb affinitást mutatott. Vecuronium esetében a CMGCD potenciálja alacsony volt, összehasonlíthatóan magasabb EC_{50} és EC_{90} értékekkel, még koncentráció korrekciót követően is. A CMGCD hatékonysága, hogy felfüggeszse az izomrelaxációt más és más volt a különböző izomrelaxánsok esetében, amit alátámaszt a megnövekedett kontrakciós erő amplitúdó, ami sugammadex hozzáadása után jelentkezett rocuronium és vecuronium esetében.

A két γ -ciklodextrin származék izomrelaxáns függesztő hatékonyságának összehasonlításakor azt kaptuk, hogy a CMGCD bár függesztette a rocuronium, és a pipecuronium által létrehozott izomblokkot, de körülbelül 15–20-szor kisebb hatékonysággal, mint a sugammadex, ami a klinikai gyakorlat számára lefordítva azt jelentené, hogy ennyivel nagyobb dózisban kellene alkalmazni a szert a sugammadexszel összevethető hatás érdekében.

A kísérleteink limitációja az ex vivo mivoltából fakad. A farmakokinetikai hatásai a vegyületeknek nem érvényesülnek a kísérleteinkben, ezért tényleges izomblokk dinamikában lehet különbség in vivo. Mi ST stimulációt alkalmaztunk a neuromuszkuláris funkció monitorozására, ami kevésbé szenzitív, mint a TOF arány, amit a klinikumban használnak. Továbbá, a TOF arányban való halványodás, és az ST depresszió közötti kapcsolat hatóanyag specifikus lehet. Végül az in vitro kimért koncentráció-hatás értékek nem feltétlenül tükrözik a klinikai tanulmányokban kimért egyes változókat, mint például az izomerő visszatéréséhez szükséges időt, vagy a rekurarizáció fellépését.

A magnéziummal kapcsolatos kísérletsorozatunkban a magnézium neuromuszkuláris hatását vizsgáltuk, valamint az interakcióját rocuroniummal és sugammadexszel. Korábbi tanulmányokkal megegyezően, mi is azt tapasztaltuk, hogy önmagában a magnézium koncentráció dependens módon csökkentette az izomkontrakciót. A magnézium neuromuszkuláris funkcióra kifejtett multifaktoriális hatása már évtizedek óta ismert. Ezek közül a legjelentősebb, az acetilkolin felszabadításának csökkentése, a prejunkcionálisan található motorneuronokon. Kevésbé jelentős mértékű a magnézium posztjunkcionálisan kifejtett hatása, többek között a depolarizáció csökkentése a motoros véglemezen és az izomrost membrán excitabilitásának csökkentése. A magnézium ezen hatásai a kalcium koncentráció emelésével visszafordíthatók, ami a magnézium kalcium antagonistaként való szerepét feltételezi. A parenterális magnézium használatának bevezetése a klinikumban hamar bizonyította az ion neuromuszkuláris szerekre kifejtett potenciózó hatását. 1970-ben patkány nervus phrenicus-hemidiaphragma preparátumon vizsgálták a magnézium és izomrelaxánsok együttes alkalmazásának koncentráció-hatás összefüggését. Eredményeikben azt kapták, hogy az oldathoz megelőzően hozzáadott 0,1 mg/mL magnézium balra tolódást okozott a tubokurarin koncentráció-hatás görbéjében, ami bizonyította az ionnak a potenciózó hatását az alkalmazott izomrelaxánsra, mely eredményeik alapján 4,1-szeres (3,9–4,2) volt. 2018-ban, szintén patkány nervus phrenicus-hemidiaphragma preparátumon végzett kísérletben négy különböző magnézium koncentráció, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L és 4 mmol/L mellett mérték a rocuronium kiváltotta izomrelaxáció koncentráció-hatás görbéit. Eredményeikben azt kapták, hogy a rocuronium EC_{50} , EC_{90} és EC_{95} értékei szignifikánsan csökkentek, ahogy a magnézium koncentráció növekedett, kivéve a 3 és 4 mmol/L

koncentrációknál. A mi általunk, szintén a patkány nervus phrenicus-diaphragma preparátumon, végzett kísérlet eredménye, is az, hogy a magnézium balra tolódást okozott az izomrelaxáns koncentráció-hatás görbéjében, hasonlóan a korábban látottakéhoz. A rocuronium és magnézium közt szinergista kapcsolat feltételezhető, mivel együttesen alkalmazva őket az oldatban, az tapasztalható, hogy az izomerő kontrakciójának csökkenése meghaladja a külön-külön rocuroniummal és magnéziummal kiváltott izomerő kontrakciók csökkenésének az összegét. Korábban azt feltételezték, hogy ez a potencírozás a magnézium acetil-kolin felszabadítására kifejtett gátló hatásának a következménye, amit az ion a preszinaptikus feszültségfüggő kalcium csatornák inhibícióján keresztül vált ki. De 2011-ben végeztek egy in vitro kísérletet, ahol patch clamp technikával mérve azt találták, hogy az izomrelaxáns klinikai hatásának fokozása magnézium által nem csak az ion preszinaptikusan kifejtett hatásának eredménye, hanem részben az ion és a relaxáns szinergista hatásának köszönhető magán a nikotinos ACh receptoron.

Kísérleteinkben első ránézésre a préblokk alkalmazott magnézium növeli a sugammadex hatékonyságát is. Ez leginkább abból adódik, hogy a préblokk alkalmazott magasabb magnézium koncentráció mellett a magnézium rocuroniumot potencírozó hatása miatt kevesebb rocuroniumra volt szükség az azonos szintű neuromuszkuláris blokk eléréséhez. Ebből következik, hogy a rocuronium mennyisége, amit a sugammadexnek meg kell kötnie kevesebb, ami a látszólagos balra tolódást okozta a sugammadex koncentráció-hatás görbéjében. Ezzel szemben, ha a magnézium koncentrációját csak azután növeltük meg, hogy elkezdtük a neuromuszkuláris blokk felfüggesztését, azaz parciális függesztésnél, a rocuronium potencírozása a megnövelt magnézium koncentráció mellett izomrelaxációt váltott ki, és jobbra tolódást eredményezett a sugammadex koncentráció-hatás görbéjében. Meg kell jegyeznünk, hogy ezen kondíciók mellett sem láttunk szignifikáns növekedést a sugammadex teljes függesztési koncentrációjában. Bár a mi kísérleti adataink alapján nem lehet teljes mértékben kizárni a lehetőségét annak, hogy a magnézium és a sugammadex között nincs semmiféle interakció, egy mikrokalorimetriás vizsgálat azt igazolta, hogy nincs affinitás a magnézium és a sugammadex között. Ezekből adódóan, annak a lehetősége, hogy klinikailag szignifikáns interakció lenne a magnézium és a sugammadex között nagyon kicsi, és valószínűleg irreleváns összeha-

sonlítva a magnézium kifejezettebb rocuronium potenciózó hatásához képest.

1996-ban vecuroniummal végeztek egy in vivo kísérletet 20 betegen, melyben azt demonstrálták, hogy az izomerő TOFR 0,7-re való visszatértekor beadott 60 mg/kg magnézium minden betegben rekurarizációt okozott, mely izomparalízis fennállt minimum egy órán keresztül. A rekurarizáció gyors volt megjelenésében, és olyan mértékű, hogy negatív hatással volt a légzésre is. A rekurarizáció rapid, és nagymértékű megjelenését a neuromuszkuláris transzmisszió „margin of safety” koncepciójával magyarázták, mely alapján az elektromos stimulációra adott kielégítő izomválasz ellenére, az ACh receptorok 70–80%-a még blokkolva lehet izomrelaxánssal, így a magnézium, ami az ACh felszabadulásának gátlását okozza, rekurarizációhoz vezethet. Hasonlót tapasztalatokat osztottak meg egy esettanulmányban, melyben egy betegnek a rocuroniummal létrehozott izomrelaxációját sugammadexszel függesztették, majd pitvarfibrilláció fellépése miatt nagy koncentrációjú magnézium került beadásra. A mi méréseinkben azt találtuk, hogy a magnézium hatása fennmarad még a TOF arány $> 0,9$ -nél is, ami klinikailag már a biztonságos extubáció feltételének teljesítését jelenti, és csak a teljes neuromuszkuláris blokk felfüggesztése sugammadexszel előzi meg a magnézium hatására visszatérő neuromuszkuláris blokkot. A magnézium által kiváltott rekurráló neuromuszkuláris blokk olyan mértékű lehet, hogy a blokk szintje visszatér a „már nem biztonságos az extubációhoz” zónába (TOF arány $< 0,9$). A magnézium koncentrációban való változás, mely már elő tudja idézni a fentebb leírt mértékű visszatérését az izomrelaxációnak, relatíve kicsi, mivel a méréseink során alkalmazott legmagasabb magnézium koncentráció 2 mM volt, ami megközelíti az ion fiziológiás tartományát. A sugammadex a rocuroniumhoz koncentrációs arányt azt mutatja, hogy teljes felfüggesztés esetén extra sugammadex molekulák vannak az oldatban, figyelembe véve az 1:1 arányú kötődését a sugammadexnek a rocuroniummal, azaz az összes rocuronium enkapszulálva van sugammadex által. Ezzel szemben ha a neuromuszkuláris blokk csak TOF arány $> 0,9$ -ig van függesztve, a rocuroniumnak egy jelentős hányada nem lesz a sugammadex által enkapszulálva. Az eredményeink azt mutatják, hogy ilyen mértékű neuromuszkuláris blokk mellett, a rocuronium molekulák 25–40%-a nincs sugammadexhez kötve, ami összhangban van más, egereken végzett tanulmányokkal. Valószínűleg ezeknek a kötetlen rocuronium molekuláknak a

potencírozásából adódik a TOF arány csökkenése, magnézium adminisztrációt követően.

A kísérleteink ex vivo mivoltából adódóan nem tudjuk megmondani a klinikai gyakorlatban történő alkalmazhatóságát az eredményeinknek. Az egyik leginkább zavart keltő tényező, hogy a szövetpreparátum a preparálási folyamata során elég hosszú időt tölt hipoxiás állapotban, és egyelőre nem tisztázott, hogy ez milyen receptor szintű változásokat eredményezhet, vagy, hogy pontosan mennyiben befolyásolhatja az intracelluláris ionáramlást, és felhasználást, bár már voltak ennek felkutatására irányuló kísérletek. Azonban, ha bármi ilyen hatás van, az viszont egyenlő a kísérleti példányok között, mivel azonos módon voltak felhasználva.

Azonban a kifejezett előnye ennek az ex vivo megközelítésnek, hogy pontos kvantitatív eredményekkel szolgál, melynek in vivo meghatározása sokkal nehezebb lenne. Kapcsolatok, és interakciók felfedésre kerülnek, melyek amúgy maszkírozva vannak a gyógyszerek magas koncentrációban való alkalmazása miatt klinikai kísérletek során (relatív a koncentráció-hatás görbék meghatározásához szükséges koncentrációkhoz képest), vagy a vizsgálati végpontokhoz képest, melyek a valós hatékonyságnak csak helyettesítői (neuromuszkuláris blokk időbeni felfüggeszthetősége sugammadexszel, szemben egy valós koncentráció-hatás kapcsolathoz képest). Ha a meglévő klinikai eredményeket a mi ex vivo kísérleteinkben interpretáljuk, számos klinikailag releváns feltételezés kikövetkeztethető a magnézium hatását illetően.

Amikor a magnézium a neuromuszkuláris blokkoló szer adminisztrációját megelőzően kerül beadásra, és nincs kompenzatórikus csökkentés a beadott izomrelaxáns koncentrációjában, a potencírozó hatás és koncentráció-hatás görbe balra tolódása egy gyorsabb hatásbeállást, és hosszabb neuromuszkuláris blokkoló hatást eredményez, mely hatás már korábban is ki lett mutatva vecuronium és rocuronium esetében. Míg azt feltételezhetnénk, hogy a magnézium előkezelés okozta neuromuszkuláris blokk potencírozása meghosszabbítja a sugammadexel történő függesztését az izomrelaxációnak, két klinikai tanulmány is azt mutatta ki, hogy a magnézium nincs rá szignifikáns hatással. Ezt igazolja egy 2018-as ex vivo patkány nervus phrenicus-hemidiaphragma preparátumon végzett kísérlet is, mely eredményeiben azt kapta, hogy az átlagos idő a sugammadex beadásától a maximális első twitch megjele-

néséig, TOF ingerlés mellett, szignifikánsan nem volt hosszabb 1 mmol/L magnézium koncentráció ($1039 \pm 351,8$ másodperc), és 2 mmol/L magnézium koncentráció mellett ($926 \pm 278,1$ másodperc), csak a magasabb, 4 mmol/L magnézium koncentráció mellett ($1483,9 \pm 237$ másodperc).

Magnézium adása inkomplett izomerő visszatérést követően, spontán, vagy függesztőszer használatával, rekurarizációt okozhat, még akkor is, ha a TOFR > 0,9. Két esettanulmány, és egy in vivo kísérlet is került leírásra, melyekben a magnézium rekurarizáló hatására hívják fel a klinikusok a figyelmet. A rekurarizáció mértéke már klinikailag szignifikáns lehet, olyan magnézium koncentráció mellett is, ami még közel fiziológias tartományban van. Ebből kifolyólag a magnézium mostanában elterjedőben levő analgetikus adjuváns szerként történő posztoperatív alkalmazása nagy odafigyelést igényel, és javasolt a neuromuszkuláris funkció kvantitatív monitorozása, hogy megbizonyosodjunk az izomerő teljes visszatéréséről, hogy meg lehessen előzni a rekurarizáció fellépését, még sugammadexszel való függesztést követően is.

6. Saját eredmények, új megállapítások

1. A nemzetközi irodalomban először tanulmányoztuk carboxymethyl- γ -ciklodextrin DS = 4,1 vegyületnek az szteránvázas izomrelaxánsok felfüggesztésére kifejtett hatását.
2. A carboxymethyl- γ -ciklodextrin DS = 4,1 effektíven függesztette a rocuronium és pipecuronium, kiváltotta izomrelaxációt ebben az ex vivo rendszerben.
3. A carboxymethyl- γ -ciklodextrin DS = 4,1 a rocuronium és pipecuronium kiváltotta izomblokkot felfüggesztette ugyan, de körülbelül 15–20-szor kisebb hatékonysággal, mint a sugammadex. Ez a hatékonyság-beli különbség kompenzálható a carboxymethyl- γ -ciklodextrin koncentrációjának növelésével. A carboxymethyl- γ -ciklodextrin szubsztitúciós fokának optimalizálásával esetleg javítható lehetne a függesztőszer affinitása, és ezáltal csökkenthető a koncentrációja.
4. A magnézium az ex vivo rendszerben markánsan növeli a rocuronium kiváltotta izomrelaxációt, és balra tolódást eredményez az izomrelaxáns koncentráció-hatás görbéjében.
5. Fontos új megfigyelésnek tartjuk, hogy magnézium alkalmazása mellett a sugammadex által meg nem kötött rocuronium molekulák miatt, csökken a függesztés „safety margin”-ja, ami csak a sugammadexszel történő teljes mértékű függesztéssel küszöbölhető ki. Megfigyeléseink a posztoperatív szakban fontos betegbiztonsági kérdésre és a posztoperatív neuromuszkuláris monitorozás szükségességére hívja fel a figyelmet magnézium és izomrelaxáns együttes használata esetén.

7. Összefoglalás

A posztoperatív reziduális neuromuszkuláris blokk előfordulása a mai napig magas, és a betegekre nézve súlyos következményekkel járhat. Az évtizedek alatt megjelent számos innováció a megelőzése érdekében, mint a közepes hatástartamú izomrelaxánsok, a kvantitatív monitorozási eszközök, szelektív relaxáns kötő ágens, de ezek mellett sem sikerült lecsökkenteni az előfordulását. A γ -ciklodextrin származék, a sugammadex bevezetésével bármilyen mélységű neuromuszkuláris blokk gyors függesztése nyílt lehetőség. De ez a vegyület is messze van az ideális izomrelaxáns függesztő szertől. Többek között, csak az aminoszteroid típus izomrelaxánsok függesztésére képes, és írtak le súlyos mellékhatásokat is használata mellett, valamint igen magas az ára. Ex vivo, patkány nervus phrenicus-diaphragma preparátumain, mi is egy új izomrelaxáns függesztő szer hatékonyságát vizsgáltuk. Az általunk használt vegyület is egy γ -ciklodextrin származék, a carboxymethyl- γ -ciklodextrin, 4,1-es szubsztitúciós fokkal. Kísérleteink eredménye azt hozta, hogy bár a carboxymethyl- γ -ciklodextrin is hatékonyan függeszti a rocuronium és pipecuronium kiváltotta izomrelaxációt, a sugammadex 15–20-szor hatékonyabban függeszti ezen izomblokkoló vegyületek hatását. Javasolt lenne a carboxymethyl- γ -ciklodextrin szubsztitúciós fokának optimalizálása, hogy javuljon a vegyület affinitása az izomrelaxánsokhoz, és csökkenthető lehessen a koncentrációja. Az izomrelaxánsok hatását, kiszámíthatóságát és függeszthetőségét, számos tényező befolyásolja, melyek mind hozzájárulnak a posztoperatív reziduális neuromuszkuláris blokk rizikójának a növeléséhez. Egyik ilyen befolyásoló tényező a magnézium. Második kísérlet sorozatunkban ennek az ionnak a rocuroniummal kiváltotta izomrelaxációra kifejtett hatását, és függeszthetőségét vizsgáltuk az ex vivo patkány nervus phrenicus-diaphragma preparátumon. A magnézium koncentráció dependens módon növelte a rocuronium kiváltotta izomrelaxáció mértékét. Amikor azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a megnövelt magnézium koncentráció a rocuroniummal kiváltott izomrelaxáció függeszthetőségét sugammadexszel, azt találtuk, hogy 1,0 mM magnézium koncentráció megemelése 1,5 mM magnézium koncentrációra, nem befolyásolta szignifikánsan a teljes függesztéshez szükséges sugammadex koncentrációját. A már sugam-

madexszel függesztett rocuronium relaxációja után adminisztrált magnézium pedig rekurarizációt váltott ki még 2 mM magnézium koncentráció mellett is, amennyiben TOFR > 0,9 szintig volt függesztve az izomblokk. A magnézium hatására fellépő rekurarizációt, csak az izomblokk teljes mértékű függesztése akadályozta meg. Az izomrelaxáció függesztését követően adminisztrált magnézium fokozott odafigyelést igényel a klinikusok részéről, és az izomfunkció kvantitatív monitorozása elengedhetetlen az izomrelaxánsok megfelelő függesztésének biztosítása érdekében, hogy a posztoperatív reziduális neuromuszkuláris blokk megelőzhető legyen.

8. Summary

The incidence of postoperative residual neuromuscular block is still high and can have serious consequences for patients. Over the decades, many innovations have appeared to prevent it, such as medium-acting muscle relaxants, quantitative monitoring devices, selective relaxant binding agents, but even these have failed to reduce its incidence. With the introduction of the γ -cyclodextrin derivative sugammadex, rapid reversal of neuromuscular block of any depth was possible. But this compound is also far from being the ideal muscle relaxant reversal agent. Among other things, it can only reverse the aminosteroid type muscle relaxant, and has been described as having serious side effects when used, as well as being very expensive. *Ex vivo*, using rat phrenic nerve-diaphragm preparations, we have also investigated the efficacy of a new muscle relaxant binding agent. The compound we used is also a γ -cyclodextrin derivative, carboxymethyl- γ -cyclodextrin, with a substitution degree of 4.1. The results of our experiments showed that although carboxymethyl- γ -cyclodextrin is also effective in inhibiting rocuronium and pipecuronium-induced muscle relaxation, sugammadex is 15–20 times more effective in inhibiting the effects of these muscle-blocking compounds. It would be advisable to optimize the degree of substitution of carboxymethyl- γ -cyclodextrin to improve the affinity of the compound for muscle relaxants and to reduce its concentration. The efficacy, predictability and reversibility of muscle relaxants are influenced by a number of factors, all of which contribute to the increased risk of postoperative residual neuromuscular block. One of these influencing factors is magnesium. In our second series of experiments, we investigated the effect of this ion on rocuronium-induced muscle relaxation and its reversibility in the *ex vivo* rat phrenic nerve-diaphragm preparation. Magnesium increased the degree of rocuronium-induced muscle relaxation in a dose dependent manner. When we examined how increased magnesium concentration affected the ability of sugammadex to reverse rocuronium-induced muscle relaxation, we found that increasing the magnesium concentration from 1,0 mM to 1,5 mM did not significantly affect the concentration of sugammadex required for complete reversal. Magnesium administered after rocuronium induced

muscle relaxation reversed by sugammadex to a TOFR > 0.9 caused recurarization even at a magnesium level of 2 mM. The magnesium-induced reanalysis was prevented only by the complete reversal of the muscle block. Magnesium administered after reversal of muscle relaxation requires increased attention by clinicians and quantitative monitoring of muscle function is essential to ensure adequate inhibition of muscle relaxants to prevent postoperative residual neuromuscular block.

9. Publikációs jegyzék



**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/320/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csernoch Vera
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fábíán, Á. I., Tassonyi, E., **Csernoch, V.**, Fedor, M., Sohajda, T., Sente, L., Füleddi, B.:
Carboxymethyl- γ -cyclodextrin, a novel selective relaxant binding agent for the reversal of neuromuscular block induced by aminosteroid neuromuscular blockers: an ex vivo laboratory study.
BMC Anesthesiol. 21 (1), 1-9, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12871-021-01424-4>
IF: 2.376
2. Fábíán, Á. I., **Csernoch, V.**, Tassonyi, E., Fedor, M., Füleddi, B.: The effect of magnesium on the reversal of rocuronium-induced neuromuscular block with sugammadex: an ex vivo laboratory study.
BMC Anesthesiol. 19 (64), 1-8, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12871-019-0734-6>
IF: 1.695

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,071

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,071

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

Debrecen, 2023.07.03.



10. Tárgyszavak

10.1. Magyar

Nervus phrenicus-diaphragma preparátum, neuromuszkuláris blokk, rocuronium, pipecuronium, vecuronium, carboxymethyl- γ -ciklodextrin, sugammadex, magnézium

10.2. Angol

Phrenic nerve-diaphragm preparation, Neuromuscular block, Rocuronium, Pipecuronium, Vecuronium, Carboxymethyl- γ -ciklodextrin, Sugammadex, Magnesium

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Fülesdi Bélának bizalmáért, támogatásáért és a munkámhoz nyújtott rengeteg segítségéért.

Köszönettel tartozom társtémavezetőmnek Dr. Fábíán Ákos Istvánnak a rengeteg segítségért és munkáért mind a kísérletek kivitelezésében és mind a közlemények írásakor.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tassonyi Edömérnek, akinek a több évtizedes tapasztalata hatalmas segítséget jelentett a vizsgálatok tervezésében, és felállításukkor.

Köszönettel tartozom a Cyclolab Ltd munkatársainak, Sente Lajosnak, és Sohajda Tamásnak a vegyületek előállításáért, és a kísérletek megvalósításához való hozzájárulásukért.

Köszönöm dr. Fedor Mariannának a vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Nagyon köszönöm a Klinikai Fiziológiai tanszék vezetőjének Prof. Dr. Papp Zoltánnak és munkatársának dr. Csípő Tamásnak, hogy lehetővé tették, hogy a kísérleteinket megvalósíthassuk, és segítséget nyújtottak a kísérleti állatok kezelésénél.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a türelmüket, a támogatásukat, és a sok biztatást, amit az évek alatt tőlük kaptam.