

**A LEVOSIMENDAN ELNYÚJTOTT ANTISPASTICUS HATÁSSAL RENDELKEZIK IZOLÁLT
HUMÁN ARTERIA RADIALIS BYPASS GRAFTOKON, ÉS GÁTOLJA A HUMÁN
VÉRLEMEZKÉK THROMBIN-INDUKÁLTA AGGREGÁCIÓJÁT *IN VITRO***

Ph. D. értekezés tézisei

Dr. Ambrus Nóra

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

A keringési rendszer élet- és kórtana, farmakológiája

című Doktori Program



Témavezető:

Dr. Pataricza János

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Szeged

2012

BEVEZETÉS

A miokardium revaszkularizációja közel fél évszázada jelentős szerepet játszik a koszorúér betegségek kezelésében. Az 1960-as évek óta végeznek coronaria bypass graft műtéteket. A műtétek során a graftokat a koszorúerekhez csatlakoztatják a károsodott szakasz(ok)tól disztálisan, ezáltal nő a miokardiumhoz jutó vérmennyiség, ami megakadályozza a proximális obstruktív elváltozás következtében a szívizom esetlegesen kialakuló további károsodását [1].

A coronaria bypass graft műtétek során felhasználható grafttípusok az arteria mammaria interna, az arteria radialis, az arteria gastroepiploica, az arteria epigastrica inferior és a vena saphena. A vena saphena használatát korlátozza az alacsony rövid és hosszú távú nyitvamaradási arány [2,3]. Az arteria mammaria interna jobb hosszú távú nyitvamaradási eredményekkel rendelkezik, és javítja a betegek késői túlélését a vena saphena grafthoz viszonyítva [3,4]. Az arteria gastroepiploica használatát korlátozza az artéria kis átmérője és a donor területen esetlegesen kialakuló ileus. Az arteria epigastrica inferior használatát az ér rövidegsége és az ér preparálási helyén kialakuló komplikációk előfordulása korlátozza. A kétoldali arteria mammaria használata mellett szükség van további bypass graftokra. Az arteria radialis használatával nő a kialakítható anasztomózisok száma. Az arteria radialis közepes méretű, musculoskeletalis artéria, amely az arteria mammaria interna grafthoz képest gyakoribb vazospazmusra hajlamos. Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban – szerotonint (5-HT) alkalmazva – igazolta az arteria radialis fokozott kontrakciós készségét az arteria mammaria internához képest [5], ezt a megfigyelést további kontrakciós ágensekkel végzett vizsgálatokban megerősítettem. Az arteria radialist jelentős spazmuskészsége miatt sokáig nem használták [6,7]. Az arteria radialis graft hosszú távú nyitva maradási eredményei az új technikának köszönhetően azonban jelentősen javultak [8,9]. A perioperatív spazmus csökkentésére kevésbé traumatikus preparálási technikákat dolgoztak ki, a beültetés előtt a graftok tárolása krisztalloid vagy kolloid oldatban történik, illetve a betegek közvetlenül a preparálás előtt és alatt vazodilatátort tartalmazó infúziót kapnak. A mechanikus dilatációt felváltotta a gyógyszeres dilatáció.

A graftokat az implantáció előtt kb. fél órán át műtéti centrumként eltérő oldatokban tárolják. Nincs egyetértés arra vonatkozóan, hogy melyik lehet a legalkalmasabb oldat az arteria radialis graft tárolására. Az „ideális” érfunkciót jelenleg még egyetlen tárolási mód sem biztosítja. Ebből a szempontból a legmegfelelőbb oldat az lenne, amely az arteria radialis érkontrakcióját csökkenti és az ér relaxációját fokozza. A relaxációs funkció növelése az ér endotéliumának védelmére is vonatkozik, amely nem csupán a spazmusra való hajlamot mérsékelheti, hanem az intraoperatív thrombosis valószínűségét is csökkentheti, elsősorban prosztaciklin, valamint nitrogén-monoxid közvetítésével. A leggyakrabban használt előinkubációs oldatok közül a vér ugyan fokozta az acetilkolinnal kiváltott, endotéliumtól függő vazodilatációt, de növelte az arteria radialis kontrakciójának mértékét is [10]. A széleskörűen elterjedt, simaizom-relaxáns hatású papaverint tartalmazó inkubációs oldat viszont

erősen savi karakterével károsítja az endotéliumot [11]. Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy a Biseko[®] kolloid oldat csökkenti a humán arteria radialis graft 5-HT-vel kiváltott kontrakcióját, és nem befolyásolja az ér maximális kontrakciós és dilatációs képességét [12]. Az inodilátor levosimendan relaxálja a 5-HT-vel kontrahált izolált humán arteria radialis graft szegmentumot [5]. Nem ismert azonban, hogy a levosimendan képes-e csökkenteni az arteria radialis bypass graft kontrakcióját az inodilátor szerrel történő előinkubáció után. A szakirodalomból ismert, hogy a levosimendan rendelkezik hosszú távú hatással; egyetlen intravénás levosimendan injekció javította a coronaria bypass graft műtéten átesett betegek hemodinamikai paramétereit. A levosimendan injekció után még 48 órával is emelkedett volt a szívindex és csökkent a perifériás ellenállás [13]. Ismert továbbá, hogy a simendan, a levosimendan anyavegyülete, gátolja a vérlemezke-aggregációt [14]. A vérlemezke-aggregáció elsődleges szerepet játszik az artériás thrombosis kialakulásában, amely a bypass graft műtétek során a graft okklúziójához vezethet [15]. Az irodalomból ismert, hogy a levosimendan a terápiás vérszinttartományban gátolja az adenozin-difoszfát (ADP) és a kollagén által indukált vérlemezke-aggregációt [16]. Amennyiben a levosimendan antithromboticus hatással is rendelkezik, úgy a vazodilatációs hatásával együtt felülmúlhatja a csak antispasticus vegyületeket a radialis graft funkciójának megőrzésében.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. Az izolált arteria mammaria interna és arteria radialis spazmuskészségének összehasonlítása receptor-függő és attól független kontrakciós ágensek alkalmazásával.
2. Az izolált arteria radialis kontrakciójának csökkentése. A vazodilátor levosimendan és a kolloidális Biseko[®] oldat vizsgálata noradrenalinral megnövelt tónuson.
3. A levosimendan és a Biseko[®] oldat tónuscsökkentő hatásának időbeli vizsgálata izolált arteria radialis szegmentumokon.
4. Levosimendan antiaggregációs hatásának összehasonlítása humán vérlemezkegazdag plazmában és mosott vérlemezkéken thrombin aktivációt követően *in vitro*.
5. A megnövelt inkubációs idő és az albumin jelenlétének hatása a levosimendan vérlemezke-gátló hatására humán mosott vérlemezkéken.

MÓDSZEREK

1. Betegek

Vizsgálatunkban a Szegedi Tudományegyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ Szívsebészeti Osztályán kezelt olyan betegek vettek részt, akiknél a működő szíven végzett coronaria bypass graft műtét során graftként arteria mammaria interna, illetve arteria radialis került felhasználásra. A betegek kiválasztása véletlenszerűen történt. Az arteria radialis bypass graftként való felhasználásának feltételei a pozitív módosított Allen teszt [17,18], illetve a 2 mm feletti arteria radialis átmérő volt. Az arteria radialis eltávolítása a „nem domináns” kézről történt. A műtét előtt ultrahang vizsgálattal (Logic 7 készülék, lineáris fej, GE Healthcare, Wisconsin, Amerikai Egyesült Államok) állapítottuk meg az ér átmérőjét.

A vérlemezke-aggregáció méréséhez 14 egészséges önkéntestől vettünk vérmintát az alkar vénájából. A résztvevők nem szedtek gyógyszert a vizsgálat előtt legalább 10 napig.

A vizsgálatra a helyi hatósági felügyeleti bizottság adott engedélyt (Humán Vizsgálatok Etikai Bizottsága, Szegedi Tudományegyetem, 164/2002 és 161/2004). A betegeket részletesen tájékoztattuk a vizsgálatról, és beleegyeztek a vizsgálatban való részvételbe.

2. Arteria mammaria interna és arteria radialis szegmentumok preparálása

Az arteria radialis graftokat atraumatikus úton, Ultracision technikával nyertük (Ultracision Harmonic Scalpel, Ethicon Endo-Surgery, Amerikai Egyesült Államok). A graft korai spazmusának megelőzésére a betegek 0,2-0,4 mg/óra intravénás nifedipin infúziót kaptak. A coronaria bypass graft műtét során *in situ* arteria mammaria interna graft került felhasználásra; az *in vitro* vizsgálathoz a bifurkációból származó 6 mm-es szegmentumot használtunk. A 6 mm-es arteria radialis mintákat az arteria brachialis eredéséhez közeli (proximális) részből vettük. A preparálás után az *in vitro* vizsgálatokhoz a kötőszövetet eltávolítottuk, két 3 mm-es érgyűrűt készítettünk, és az érgyűrűt 45 percre egy tároló oldatba helyeztük.

3. Izometriás tónusmérés és vizsgálati protokoll

A két 3 mm-es arteria mammaria interna vagy arteria radialis szegmentumokat a 45 perc előinkubálás után párhuzamosan rozsdamentes acélhorgokra függesztettük fel, és 2 ml Krebs-Henseleit oldatot tartalmazó, 37°C-os szervfürdőbe helyeztük (pH=7,4). Az oldatba folyamatosan áramoltattunk 95% O₂-t és 5% CO₂-ot tartalmazó gázelegyet. Az érgyűrű egy másik horoggal erőátalakítóhoz (Hugo Sachs Elektronik, Type F30, Németország) kapcsolódott. A 45 perces ekvilibrációs periódus során 20 milliNewton (mN) passzív előfeszítést alkalmaztunk; a mérőoldatot 15 percenként cseréltük. Az arteria mammaria interna és az arteria radialis kontrakciós képességének összehasonlítására kontrakciós ágensként noradrenalin, 5-HT-t, illetve alacsony és magas

koncentrációjú kálium-kloridot használtunk. Az arteria radialis graft esetén a Biseko[®] kolloid oldatban történő előinkubáció hatását 5%-os humán albumin oldatban történő előinkubációval hasonlítottuk össze. E vizsgálatokban kontrakciós ágensként noradrenalinot használtunk. Egy másik vizsgálatban különböző inkubációs oldatok (0,16 $\mu\text{mol/l}$ levosimendan tartalmú oldat, 0,9% NaCl oldat, Bretschneider oldat, 5% albumin oldat és Biseko[®] oldat) hosszú távú hatását vizsgáltuk arteria radialisban. E vizsgálatban az ekvilibrációs periódus után 45, 90 és 120 perccel 5-HT-vel kontraháltuk az arteria radialis érgyűrűket. A 0,16 $\mu\text{mol/l}$ levosimendan tartalmú oldat és a 0,9% NaCl oldat esetén a vizsgálat végén acetilkolinnal értékeltük az endotheliumfüggő vazorelaxációt, 80 mmol/l kálium-kloriddal a maximális kontrakciós képességet, és papaverinnel a maximális vazorelaxációs képességet mértük.

4. Humán artéria szegmentumok nedves súlyának mérése

Az arteria mammaria interna és az arteria radialis szegmentumok összehasonlító vizsgálatában az izometriás tónusmérés után a többlet folyadék eltávolítására a 3 mm-es érszegmentumokat itatós papírra helyeztük. Ez után laboratóriumi mérlegen (Ohaus, Analytical Explorer, Ohaus Europe GmbH, Svájc) megmértük az érgyűrűk súlyát.

5. Vérlemezke-aggregáció mérése

A vérlemezke-aggregációt turbidimetriás elven működő aggregométerrel vizsgáltuk. A fénytranszmisszió kiindulási értékéhez viszonyított emelkedése arányos a vérlemezke-aggregáció mértékével.

6. Vérlemezkegazdag plazma és mosott vérlemezkek előállítása és a vizsgálati protokoll

Az önkéntesektől vett vénás vért Na-citráttal kezeltük, majd lecentrifugáltuk. Az így kapott felülúszó a vérlemezkegazdag plazma, amelyet a vizsgálatok egy részében felhasználtunk. További vizsgálatokhoz a felülúszót prosztaciklin jelenlétében ismét lecentrifugáltuk. Az üledéket kalciummentes Krebs-Henseleit oldatban reszuspendáltuk, majd a szuszpenziót ismét lecentrifugáltuk. Végül az üledéket kalciummentes Krebs-Henseleit oldatban újra reszuspendáltuk, s a szuszpenzió részecskeszámát $3 \times 10^{11}/\text{l}$ értékre állítottuk be (Picoscale részecskeszámláló, Medicor, Budapest).

A levosimendan vérlemezke-aggregációra gyakorolt hatását vérlemezkegazdag plazmán és mosott vérlemezkeken is megvizsgáltuk. A thrombin aggregációs ágens hozzáadása előtt 2 percig inkubáltunk egy koncentráció levosimendannal. Mosott vérlemezkek esetén a vizsgálatot kalcium jelenlétében végeztük. Egy további vizsgálatban 15 perces levosimendan inkubáció hatását vizsgáltuk a thrombin-indukálta vérlemezke-aggregációra mosott vérlemezkeken humán albumin jelenlétében vagy hiányában. E vizsgálatokat is kalcium hozzáadásával végeztük.

EREDMÉNYEK

1. A humán artéria radialis szegmentumok receptor-függő és receptortól független kontrakciós képessége nagyobb, mint a humán arteria mammaria interna kontrakciós képessége *in vitro*.
2. A koloidális Biseko[®] oldat szignifikánsan csökkentette az arteria radialis graft szegmentumok noradrenalin kiváltott kontrakcióját az 5%-os humán albumin oldathoz viszonyítva.
3. A 0,9% NaCl oldatban előinkubált humán artéria radialis szegmentumok 5-HT-indukálta kontrakciója időben változatlan (120 percig vizsgálva). A 0,16 $\mu\text{mol/l}$ levosimendan oldatban előinkubált arteria radialis szegmentumok kontrakciója szignifikánsan csökkent 45 és 90 perccel az előinkubációs oldat eltávolítása után. 120 perccel az előinkubációt követően az 5-HT kontrakciók nem különböztek szignifikánsan. Bretschneider, illetve 5% albumin oldattal történő inkubáció után 45, 90 és 120 perccel az 5-HT kontrakciók mértéke hasonló volt. A koloidális Biseko[®] oldattal történő előinkubáció esetén az oldat kimosása után 45 perccel szignifikánsan csökkent 5-HT-indukálta kontrakciót kaptunk, az 5-HT hatása 120 perc múlva azonban visszatért a kontroll értékre (0,9% NaCl).
4. Az arteria radialis szegmentumok maximális kontrakciós képessége (80 mmol/l kálium-kloridban) hasonló volt a 0,9%-os NaCl és a 0,16 $\mu\text{mol/l}$ levosimendan oldattal történő előinkubáció esetén.
5. A humán arteria radialis szegmentumok endotéliumtól függő vazorelaxációjában nem találtunk szignifikáns eltérést a 0,9% NaCl és a 0,16 $\mu\text{mol/l}$ levosimendan oldattal történő előinkubációk között.
6. A papaverin csaknem teljesen relaxálta az 5-HT-vel kontrahált humán arteria radialis szegmentumokat. Az artériás tónus csökkenésének mértéke nem különbözött szignifikánsan a 0,9% NaCl és a 0,16 $\mu\text{mol/l}$ levosimendan oldattal előkezelt szegmentumok esetén.
7. A nagy konduktanciájú kalcium aktiválta káliumcsatornák nem játszanak szerepet a levosimendan arteria radialis szegmentumok kontrakciós képességét csökkentő elhúzó hatásában.
8. A levosimendan koncentráció-függő módon csökkentette a thrombin-indukálta vérlemezke-aggregációt vérlemezke gazdag plazmában és mosott vérlemezkekben. A levosimendan IC_{50} értéke arra utal, hogy a gyógyszer erős thrombin antagonistá plazmamentes kristalloid oldatban. Az IC_{50} érték jelentősen kisebb volt mosott vérlemezkek esetén a vérlemezkegazdag plazmához viszonyítva.
9. A levosimendan vérlemezke-aggregációt gátló hatása nőtt az inkubációs idő növelésével.
10. Az albumin koncentráció-függő módon csökkentette a levosimendan vérlemezke-aggregációt gátló hatását.

MEGBESZÉLÉS

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként igazoltuk, hogy a kolloidális Biseko[®] oldat a noradrenalin-indukálta kontrakcióval szemben is hatásos humán arteria radialis szegmentumon. 5-HT-indukálta kontrakción a hatás 45 perc után már nem áll fenn, és időben kevésbé elhúzódó antispasticus hatást mutat, mint a levosimendan.
2. Kísérleteinkben elsőként mutattuk ki, hogy a levosimendan hatékonyan csökkenti a humán arteria radialis noradrenalin kiváltott kontrakcióját.
3. Rámutattunk arra, hogy a levosimendan terápiás tartományba eső koncentrációja (0,16 $\mu\text{mol/l}$) elhúzódó hatást fejt ki a humán arteria radialis tónusán.
4. Elsőként mutattuk ki, hogy a levosimendan terápiás tartományba eső koncentrációi ($\leq 0,2 \mu\text{mol/l}$) mérséklék a thrombinnal kiváltott vérlemezke-aggregációt.
5. Igazoltuk, hogy a levosimendan vérlemezke-aggregációt gátló hatását az albumin csökkenti, a levosimendan vérlemezkékre gyakorolt hatása tehát kifejezettebb lehet hypoalbuminaemia esetén.
6. A levosimendan thrombin-indukálta thrombocytáaggregációt gátló hatása jelentősen megnövekedett 15 perces inkubációt követően a 2 perces inkubációhoz képest.

Vizsgálataink első részében igazoltuk, hogy az arteria radialis kontrakciós képessége meghaladja az arteria mamma interna kontrakciós képességét. A különbség részben az arteria radialis nagyobb izomtömegének köszönhető. A receptor-függő és receptortól független kontrakciók mértéke egyaránt nagyobb volt arteria radialis esetén. A két értípus közötti különbség mértéke azonban meghaladta a nedves súly eltéréséből adódó mértéket, ezért arra következtetünk, hogy a kontrakciók közös effektor rendszerének működése kifejezettebb lehet arteria radialison.

Kimutattuk, hogy a levosimendan kontrakciót csökkentő hatása arteria radialison időben elhúzódó. A levosimendan előinkubáció csökkentette az 5-HT-indukálta kontrakciót, és ez a hatás a szer kimosása után 90 perccel is megfigyelhető. A levosimendan vizsgálatainkban alkalmazott koncentrációja 0,16 $\mu\text{mol/l}$ volt, amely az inodilátor terápiás vérszinttartományába esik. E koncentrációban a levosimendan pozitív inotróp és vazodilatátor hatással is rendelkezik [19-22]. Egy újabb vizsgálatban kimutatták, hogy a levosimendan egyetlen dózisban alkalmazva képes a hemodinamikai paraméterek – ideértve a teljes perifériás ellenállást – normalizálására a coronaria bypass graft műtét után napokkal [13]. A levosimendan *in vivo* hosszú távú hatásáért – legalábbis részben – a hosszú féléletidejű aktív metabolitokat tartották felelősnek [23]. A jelenlegi megfigyelésünk azonban alátámasztja azt, hogy az anyavegyület magában, és nem kizárólag az aktív metabolit(ok) felelősek az arteria radialis graft kontrakciójának csökkenéséért.

A levosimendan hosszú távú hatása mellett azt tapasztaltuk, hogy a szer nagyobb mértékben relaxálta az 5-HT-indukálta kontrakciót, mint ahogy az a koncentráció-hatás görbe alapján várható

volt. Az inodilátor EC_{50} értéke arteria radialis graftok esetén a kontrakciót követően adott levosimendannal vizsgálva $0,3 \mu\text{mol/l}$ volt. A levosimendan féléletideje közel 1 óra [19], így azt vártuk, hogy a szer kimosása után 90 perccel jelentősen csökken a vazorelaxációs hatás. Előinkubáció során $0,16 \mu\text{mol/l}$ levosimendan 85%-os relaxációt okozott a kimosás után 45 perccel, és ez az érték 88% volt a kimosás után 90 perccel. A szer tehát hatékonyabb lehet a spazmus prevenciójában, mint annak oldásában.

Vizsgálataink nem támasztották alá a nagy konduktanciájú kalcium aktiválta káliumcsatornák szerepét a levosimendan hosszú távú hatásának mechanizmusában. További lehetséges jelöltek a foszfodiészteráz enzim gátlói [24,25], illetve vaszkuláris mediátorok és effektorok, mint a nitrogén-monoxid, az endothelin-1, a mitokondriális káliumcsatornák, a ciklikus AMP, az Akt, az ERK és a p38 [26]. Az ATP-szenzitív és a feszültség-érzékeny káliumcsatornák szerepe is felmerül [27,28].

Kimutattuk továbbá, hogy a levosimendan hatásosan mérsékli a noradrenalin-indukálta kontrakciót arteria radialis szegmentumok esetén. Az irodalomból ismert, hogy a levosimendan képes csökkenteni a thromboxán A2 és a kálium-klorid által kiváltott kontrakciót is [5,27,29]. Ezek alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a levosimendan egy széles spektrumú, érszűkítést megelőző és vazodilatációs szer, amely hatékonyan használható a graftok előkezelésére a beültetés előtt.

További vizsgálatban igazoltuk, hogy a Biseko[®] oldat, amelyről munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy képes mérsékelni az arteria radialis 5-HT-indukálta kontrakcióját [12], hatásosan gátolja a noradrenalin által kiváltott kontrakciót is. A Biseko[®] oldat vazorelaxációs spektruma hasonló a levosimendanéhoz, azonban hatásideje rövidebb annál.

Fontos azonban megjegyezni, hogy sem a Biseko[®] oldattal, sem a levosimendant tartalmazó oldattal végzett előinkubáció hatásának időtartama nem fedi le a coronaria bypass graft műtét teljes időtartamát. Az extracorporalis keringés nélküli off-pump coronaria bypass graft műtét teljes időtartama kb. 2 óra, ekkor is szükség van szisztémás vazodilatátor egyidejű alkalmazására.

A graftfunkció az inkubációs vizsgálatok végén is megtartott volt. Az arteria radialis graft funkcióját nem károsította sem a levosimendannal, sem az alkalmazott krisztalloid vagy kolloid oldatokkal történő előkezelés.

Az arteria radialis szegmentumok endotéliumtól függő relaxációjának mértéke csak kb. 20%-a volt a papaverinnel kiváltott maximális relaxációs amplitúdónak, amely az irodalomban közölthöz képest lényegesen kisebb érték. A preparálás atraumatikus technikával történt, ezért inkább valószínű, hogy nem az ér mechanikus károsodása, hanem az ereket érintő betegségekre fokozottan érzékeny, eleve károsodott endotheliumfunkció állhat az alacsony endotheliumtól függő relaxáció hátterében. Ezt igazolja, hogy a betegpopulációban nagy arányban fordult elő magasvérnyomás és hypercholesterolaemia, ami a nemzetközi adatokhoz képest súlyosabb kardiovaszkuláris állapotot jelez [30-32].

A vizsgálatok további fontos eredménye, hogy a levosimendan gátolja a thrombin-indukálta vérlemezke-aggregációt. Mosott vérlemezkek esetén – plazmafehérjék nélkül – a számított IC_{50} érték $0,06 \mu\text{mol/l}$, ami arra utal, hogy a levosimendan a terápiás vérszinttartományban rendelkezik vérlemezke-aggregációt gátló hatással.

Vérlemezkegazdag plazma esetén a levosimendan 10%-os gátló koncentrációja ($IC_{10}=0,07 \mu\text{mol/l}$) az *in vivo* mért $0,12-0,2 \mu\text{mol/l}$ terápiás vérszinttartomány alsó értékéhez közel található. Ez a mérsékelt hatás a mosott vérlemezkeken mérthez képest az alacsonyabb *in vitro* kalciumszinttel vagy a plazmafehérjék jelenlétével magyarázható.

A levosimendan erősen (97-98%) kötődik a plazmafehérjékhez [33]. Mivel a vérlemezkegazdag plazma az összes plazmafehérjét tartalmazza, feltételeztük, hogy mosott vérlemezkek esetén az inodilátor szabad koncentrációja lényegesen magasabb. A plazmafehérjék eltávolítása után a levosimendan IC_{50} értéke 50-szer alacsonyabb volt mosott vérlemezkek esetén. Az albumin koncentrációfüggő módon csökkentette a levosimendan vérlemezke-aggregációt gátló hatékonyságát. 5 g/l albumin, amely a fiziológiás koncentráció közel $1/6$ -a, a szer hatását közel a felére csökkentette. Ez arra utal, hogy a levosimendan a plazmafehérjék közül elsősorban az albuminhoz kötődik.

A levosimendan alkalmazásának legfőbb indikációját képező szívelégtelenségben gyakran fordul elő hypoalbuminaemia [34,35]. Ilyen esetben az inodilátor szabad vérszintje és a vérlemezke-aggregációt gátló hatás várhatóan emelkedik.

Az albumin hatásának vizsgálatokor 15 perces levosimendan előinkubációt alkalmaztunk. Mosott vérlemezkek esetén a levosimendan IC_{50} értéke több, mint 80%-ra nőtt, s ez hasonló az arteria radialis graftok esetén kapott eredményhez annyiban, hogy az inkubációs idő növelésével a hatás mértéke is növekszik. Tehát maga a levosimendan vagy a szer hatása kumulálódik nemcsak az érsvetben, hanem a vérlemezkekben is.

A levosimendan vérlemezke-aggregációt csökkentő hatása nem receptorra jellemző, a levosimendan a terápiás koncentrációtartományban csökkenti az ADP-, kollagén- és –a jelen vizsgálatok alapján – a thrombin-indukálta vérlemezke-aggregációt. Az inodilátor levosimendan hatásának pontos mechanizmusa nem ismert, bár a thrombin-indukálta aggregációban központi szerepet játszó intracelluláris kalcium lehet a levosimendan egyik célpontja [36-38]. Az inodilátor széles spektrumú vérlemezke-aggregációt gátló hatása miatt alkalmas lehetne aspirin- és klopido-grelrezisztens betegek kezelésében.

Coronaria bypass graft műtétek esetén megfigyelhető az alvadási rendszer aktiválódása és a thrombinszint emelkedése, ami szerepet játszik a thrombus képződésében és intraoperatív graft-elégtelenséghez vezethet [39]. A levosimendan tehát azon kívül, hogy képes lehet az arteria radialis graft spazmusának megelőzésére, csökkentheti a thrombusképződés előfordulását a coronaria bypass graft műtétek alatt.

PUBLIKÁLT DOLGOZATOK

1. **Ambrus N**, Szolnoky J, Pollesello P, Kun A, Varró A, Papp JG, Pataricza J. Prolonged antispasmodic effect in isolated radial artery graft and pronounced platelet inhibition induced by the inodilator drug, levosimendan. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012; 110(3):269-74. Impakt faktor: 2.371.
2. Pataricza J, Krassói I, **Ambrus N**, Bitay M, Varró A, Papp JG. Interspecies differences and extracellular calcium dependence in the vasorelaxing effect of cromakalim in isolated human, porcine, and canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010;15(3):289-95. Impakt faktor: 1.969.
3. Szolnoky J, **Ambrus N**, Szabó-Biczók A, Bogáts G, Papp JG, Varró A, Pataricza J. Biseko colloidal solution diminishes the vasoreactivity of human isolated radial arteries. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;36(1):143-7. Impakt faktor: 2.397.
4. Szolnoky J, **Ambrus N**, Szabó-Biczók A, Bogáts G, Papp JG, Varró A, Pataricza J. Kolloid és krisztalloid oldatok hatása human arteria radialis bypass graftok tónusán in vitro. *Cardiol. Hung.* 2009; 39:135-9. Impakt faktor: 0.

ELŐADÁSKIVONATOK

1. **Ambrus N**, Szolnoky J, Pollesello P, Varró A, Papp JG, Pataricza J. A levosimendan relaxálja a szerotoninnal kontrahált humán artéria radiális graftot in vitro. (Levosimendan relaxes human radial artery grafts precontracted with 5-hydroxytryptamine in vitro.) A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIV. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) II. közös tudományos konferenciája, Szeged. Abstract Book 145, 2010.
2. **Ambrus N**, Szolnoky J, Pollesello P, Varró A, Papp JGy, Pataricza J. A Levosimendan hatás kumulációja izolált arteria radialis graftok esetén. (Cumulation of the effect of levosimendan in isolated radial artery bypass grafts.) *Cardiol. Hung.* 40. Suppl.G. G55, 2010.
3. **Ambrus N**, Pataricza J, Krassói I, Márton Z, Bitay M, Varró A, Papp JGy. Endothelium in health and disease; species difference in calcium dependency of cromakalim induced relaxation in porcine and human coronary arteries. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 107:(Suppl.1). 175, 2010.

4. **Ambrus N**, Szolnoky J, Szabó-Biczók A, Bogáts G, Papp JG, Varró A, Pataricza J. A kolloidális Biseko® oldat csökkenti az arteria radialis kontrakciós képességét *in vitro*. (Colloidal Biseko® solution decreases the contractility of radial artery in vitro.) Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, Budapest. Abstract Book 191, 2009.
5. **Ambrus N**, Szolnoky J, Pollesello P, Varró A, Papp JG, Pataricza J. Long-lasting effect of Levosimendan against 5-hydroxytryptamine-induced contraction in isolated radial artery bypass grafts. Heart Failure 2009, Nice, France. Abstract book 161, 2009.
6. **Ambrus N**, Szolnoky J, Szabó-Biczók A, Bogáts G, Papp JGy, Varró A, Pataricza J. Tároló oldatok hatása az arteria radialis funkciójának megőrzésében *in vitro*. (Effect of storage solutions in the preservation of radial artery function in vitro.) *Cardiol. Hung.* 39. Suppl.A. A64, 2009.
7. Szolnoky J, Pataricza J, **Ambrus N**, Krassói I, Szabó B. A, Bogáts G. Különböző tárolóoldatok arteria radialis graftok *in vitro* vazoreaktivitására gyakorolt hatása. (Effect of various storage solutions in the vasoreactivity of radial artery grafts *in vitro*.) *Cardiol. Hung.* 37. Suppl.D. D16-D17, 2007.
8. **Ambrus N**, Szolnoky J, Krassói I, Pataricza J. Perioperative preservation of graft function during CABG surgery with colloidal 'Biseko' *in vitro*. Endothelium: The Determinant of Cardiovascular Health and Disease, International Workshop of The Physiological Society, Krakow, Poland. Abstract book 26, 2007.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] European Journal of Cardio-Thoracic Surgery Guidelines on myocardial revascularization 2010.
- [2] Murphy GJ, Angelini GD. Insights into the pathogenesis of vein graft disease: lessons from intravascular ultrasound. *Cardiovasc Ultrasound*. 2004;2:8.
- [3] Risteski PS, Akbulut B, Moritz A, Aybek T. The radial artery as a conduit for coronary artery bypass grafting: review of current knowledge. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2006;6(2):153-62.
- [4] Gansera B, Schmidtler F, Angelis I, Kiask T, Kemkes BM, Botzenhardt F. Patency of internal thoracic artery compared to vein grafts - postoperative angiographic findings in 1189 symptomatic patients in 12 years. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;55(7):412-7.
- [5] Pataricza J, Szolnoky J, Krassói I, Hegedűs Z, Kun A, Varró A, Papp J. Gy. Vasorelaxing effect of levosimendan against 5-hydroxytryptamine-induced contractions in isolated human conduit bypass grafts. *J Pharm Pharmacol*. 2006; 58: 1107-12.
- [6] Fisk RL, Brooks CH, Callaghan JC, Dvorkin J. Experience with the radial artery graft for coronary artery bypass. *Ann Thorac Surg*. 1976;21(6):513-8.
- [7] Curtis JJ, Stoney WS, Alford WC Jr, Burrus GR, Thomas CS Jr. Intimal hyperplasia. A cause of radial artery aortocoronary bypass graft failure. *Ann Thorac Surg*. 1975;20(6):628-35.
- [8] Zacharias A, Habib RH, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah A. Improved Survival With Radial Artery Versus Vein Conduits in Coronary Bypass Surgery With Left Internal Thoracic Artery to Left Anterior Descending Artery Grafting. *Circulation*. 2004; 109:1489-96.
- [9] Possati G, Gaudino M, Prati F, Alessandrini F, Trani C, Glieca F, Mazzari MA, Luciani N, Schiavoni G. Long-term results of the radial artery used for myocardial revascularisation. *Circulation* 2003; 108:1350-1354.
- [10] Tatoulis J, Jiang GC, Moffatt JD, Cocks TM. Storage of radial artery grafts in blood increases vessel reactivity to vasoconstrictors in vitro. *Ann Thorac Surg*. 1999; 68: 2191-5.
- [11] He GW. Verapamil plus nitroglycerin solution maximally preserves endothelial function of the radial artery: comparison with papaverine solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 115:1321-7.
- [12] Szolnoky J, Ambrus N, Szabó-Biczók A, Bogáts G, Papp JG, Varró A, Pataricza J. Biseko colloidal solution diminishes the vasoreactivity of human isolated radial arteries. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009; 36:143-7.
- [13] Tritapepe L, De Santis V, Vitale D, Guarracino F, Pellegrini F, Pietropaoli P, Singer M. Levosimendan pre-treatment improves outcomes in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth*. 2009;102(2):198-204.
- [14] Pataricza J, Papp JGy. Inhibition by Simendan (OR-1259) of collagen- and Ca²⁺-ionophore-induced aggregation of human platelets. *Pharm Res*. 1992; 25:158-9.
- [15] Van der Starre PJ, Reneman RS. The role of serotonin blockers in cardiac anesthesia. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1994;8(4):455-62.

- [16] Kaptan K, Erinç K, Ifran A, Yildirim V, Uzun M, Beyan C, Işık E. Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function. *Am J Hematol*. 2008; 83(1):46-49.
- [17] Asif M, Sarkar PK. Three-digit Allen's test. *Ann Thorac Surg*. 2007;84(2):686-7.
- [18] Szolnoky J, Séllei Á, Földeák D, Morvay Z, Szabó B. A, Bogáts G. Az arteria ulnaris áramlási paramétereinek változása arteria radialis eltávolítása után. *Cardiol. Hung*. 2006; 36:10.
- [19] Lilleberg J, Sundberg S, Häyhä M, Akkila J, Nieminen MS. Haemodynamic dose-efficacy of levosimendan in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1994;47(3):267-74.
- [20] Hasenfuss G, Pieske B, Kretschmann B, Holubarsch C, Alpert NR, Just H. Effects of calcium sensitizers on intracellular calcium handling and myocardial energetics. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26 Suppl 1:S45-51.
- [21] Silva-Cardoso J, Ferreira J, Oliveira-Soares A, Martins-de-Campos J, Fonseca C, Lousada N, Ilídio-Moreira J, Rabaçal C, Damasceno A, Amorim S, Seabra-Gomes R, Ferreira R, Abreu-Lima C; PORTLAND Investigators. Effectiveness and safety of levosimendan in clinical practice. *Rev Port Cardiol*. 2009;28(2):143-54.
- [22] Grossini E, Molinari C, Caimmi PP, Uberti F, Vacca G. Levosimendan induces NO production through p38 MAPK, ERK and Akt in porcine coronary endothelial cells: role for mitochondrial K(ATP) channel. *Br J Pharmacol*. 2009;156(2):250-61.
- [23] Kivikko M, Antila S, Eha J, Lehtonen L, Pentikäinen PJ. Pharmacokinetics of levosimendan and its metabolites during and after a 24-hour continuous infusion in patients with severe heart failure. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2002;40(10):465-71.
- [24] Marijic J, Li Q, Song M, Nishimaru K, Stefani E, Toro L. Decreased expression of voltage- and Ca(2+)-activated K(+) channels in coronary smooth muscle during aging. *Circ Res*. 2001;88(2):210-6.
- [25] Szilágyi S, Pollesello P, Levijoki J, Haikala H, Bak I, Tósaki A, Borbély A, Edes I, Papp Z. Two inotropes with different mechanisms of action: contractile, PDE-inhibitory and direct myofibrillar effects of levosimendan and enoximone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46(3):369-76.
- [26] Salloum J, Tharpe C, Vaughan D, Zhao DX. Release and elimination of soluble vasoactive factors during percutaneous coronary intervention of saphenous vein grafts: analysis using the PercuSurge GuardWire distal protection device. *J Invasive Cardiol*. 2005; 17: 575-579.
- [27] Pataricza J, Krassói I, Höhn J, Kun A, Papp JG. Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17(2):115-21.
- [28] Yokoshiki H, Katsube Y, Sunagawa M, Sperelakis N. The novel calcium sensitizer levosimendan activates the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(1):375-83.

- [29] Harrison WE, Mellor AJ, Clark J, Singer DR. Vasodilator pre-treatment of human radial arteries; comparison of effects of phenoxybenzamine vs papaverine on norepinephrine-induced contraction in vitro. *Eur Heart J.* 2001;22(23):2209-16.
- [30] Wei W, Chen ZW, Yang Q, Jin H, Furnary A, Yao XQ, Yim AP, He GW. Vasorelaxation induced by vascular endothelial growth factor in the human internal mammary artery and radial artery. *Vascul Pharmacol.* 2007;46(4):253-9.
- [31] Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *Int J Cardiol.* 2005 2;105(2):209-15.
- [32] He GW, Liu MH, Yang Q, Furnary A, Yim AP. Role of endothelin-1 receptor antagonists in vasoconstriction mediated by endothelin and other vasoconstrictors in human internal mammary artery. *Ann Thorac Surg.* 2007;84(5):1522-7.
- [33] Sandell EP, Hayha M, Antila S, Heikkinen P, Ottoila P, Lehtonen LA, Pentikainen PJ. Pharmacokinetics of Levosimendan in healthy volunteers and patients with congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995; 26: S57-S62.
- [34] Horwich TB, Kalantar-Zadeh K, MacLellan RW, Fonarow GC. Albumin levels predict survival in patients with systolic heart failure. *Am Heart J.* 2008;155:883-9.
- [35] Arques S, Roux E, Sbragia P, Gelisse R, Pieri B, Ambrosi P. Usefulness of serum albumin concentration for in-hospital risk stratification in frail, elderly patients with acute heart failure. Insights from a prospective, monocenter study. *Int J Cardiol.* 2008;125(2):265-7.
- [36] Chackalamannil S, Wang Y, Greenlee WJ, Hu Z, Xia Y, Ahn HS, Boykow G, Hsieh Y, Palamanda J, Agans-Fantuzzi J, Kurowski S, Graziano M, Chintala M. Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity. *J Med Chem.* 2008;51(11):3061-4.
- [37] Kroll MH, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood.* 1989;74(4):1181-95.
- [38] Pataricza J, Papp JGy. Inhibition by Simendan (OR-1259) of collagen- and Ca²⁺-ionophore-induced aggregation of human platelets. *Pharm Res.* 1992; 25:158-9.
- [39] Paparella D, Galeone A, Venneri MT, Coviello M, Scrascia G, Marraudino N, Quaranta M, de Luca Tupputi Schinosa L, Brister SJ. Activation of the coagulation system during coronary artery bypass grafting: comparison between on-pump and off-pump techniques. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131(2):290-7.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki elsősorban témavezetőmnek, Dr. habil. Pataricza Jánosnak, akinek értékes tanácsaira és személyes segítségére mindenkor számíthattam a doktori munkám során.

Köszönöm Prof. Dr. Papp Gyulának a segítséget és támogatást.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Varró Andrásnak a SZTE ÁOK Farmakológia és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének a lehetőségért, hogy intézetében dolgozhattam az elmúlt évek során.

Megköszönöm Dr. Szolnoky Jenőnek a segítséget és hogy kísérleteimhez rendelkezésemre bocsátotta a humán artéria szegmentumokat.

Hálás vagyok Süli Lászlónénak a kísérletek során nyújtott kiváló szakértelméért, sokoldalú segítségéért.

Köszönetem fejezem ki Dr. Krassói Irénnek, Dr. Márton Zoltánnak és Dr. Kun Attilának, akikre a munkában messzemenően számíthattam.

Végül szeretném köszönetem kifejezni családomnak és barátaimnak, hogy szeretetükkel és megértésükkel nyugodt háttérrel biztosították a doktori munkámhoz.