

A H₂O₂ szerepe a kis vénák vazomotor működésének szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Debreczeni Béla Zoltán

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Koller Ákos egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Bari Ferenc egyetemi tanár, MTA doktora

Dr. Ivanics Tamás egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Monos Emil professor emeritus, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hamar János egyetemi magántanár, Ph.D.

Dr. Nádasy L. György egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2.	BEVEZETÉS	5
2.1.	A VÉNÁS EREK BIOMECHANIKAI TULAJDONSÁGAI.....	8
2.2.	A MIOGÉN MECHANIZMUS	10
2.2.1.	A miogén mechanizmus az artériás rendszerben	10
2.2.2.	A miogén mechanizmus a vénás rendszerben.....	11
2.2.3.	A miogén mechanizmust befolyásoló tényezők.....	13
2.2.4.	Az endothelium szerepe a vénás tónus humorális szabályozásában.....	15
2.3.	A H ₂ O ₂ FIZIOLÓGIAI ÉS PATOFIZIOLÓGIAI SZEREPE A MIKROEREKEN	17
2.3.1.	A H ₂ O ₂ élettani szerepe.....	17
2.3.2.	Exogén H ₂ O ₂ hatása artériás ereken.....	19
2.3.3.	A H ₂ O ₂ szerepe a vazomotor értónus szabályozásában	22
2.3.4.	A H ₂ O ₂ klinikai vonatkozásai a plasztikai sebészetben	24
3.	A KUTATÁS HIPOTÉZISEI	27
4.	CÉLKITŰZÉSEK	28
5.	MÓDSZEREK	29
5.1.	VENULÁK IZOLÁLÁSA	29
5.2.	FELHASZNÁLT ANYAGOK	32
5.3.	KÍSÉRLETI PROTOKOLLOK.....	33
5.3.1.	Spontán vazomotor válaszok vizsgálata	33
5.3.2.	Az intraluminális nyomás emelésére adott vazomotor válaszok vizsgálata	33
5.3.3.	A vazomotor válaszok jelátviteli mechanizmusainak vizsgálata.....	34
5.3.4.	Arachidonsav és H ₂ O ₂ direkt vazóaktív hatásának vizsgálata	34
5.4.	STATISZTIKAI MÓDSZEREK.....	34
6.	EREDMÉNYEK	35
6.1.	MIOGÉN TÓNUS KIALAKULÁSA A KIS VÉNÁKON	35
6.2.	INDOMETACIN HATÁSA A KIS VÉNÁK MIOGÉN TÓNUSÁRA	39
6.3.	SQ 29,548 HATÁSA A KIS VÉNÁK MIOGÉN TÓNUSÁRA.....	40
6.4.	KATALÁZ HATÁSA A KIS VÉNÁK MIOGÉN TÓNUSÁRA	41
6.5.	ARACHIDONSAV DIREKT VAZOAKTÍV HATÁSA A KIS VÉNÁKON.....	42

6.6.	H ₂ O ₂ DIREKT VAZOAKTÍV HATÁSA A KIS VÉNÁKON	44
6.7.	ÖSSZEFOGLALÓ EREDMÉNYEK.....	46
7.	MEGBESZÉLÉS.....	47
7.1.	MIOGÉN VÁLASZ A KIS VÉNÁKBAN	48
7.2.	H ₂ O ₂ VAZOMOTOR HATÁSA KIS VÉNÁKBAN	49
7.3.	A H ₂ O ₂ ÁLTAL INDUKÁLT INTRACELLULÁRIS VAZOMOTOR JELUTAK.....	50
7.4.	A VÉNÁS EREKBE KIALAKULÓ OXIDATÍV STRESSZ ÉR- ÉS A PLASZTIKAI SEBÉSZETI ASPEKTUSAI	51
7.4.1.	A H ₂ O ₂ akut hatásai.....	51
7.4.2.	A H ₂ O ₂ krónikus hatásai.....	52
8.	KÖVETKEZTETÉSEK	54
9.	TOVÁBBI TERVEK.....	56
10.	ÖSSZEFOGLALÁS	57
10.	SUMMARY.....	58
11.	IRODALOMJEGYZÉK.....	59
12.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	72
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
14.	TÁMOGATÁS.....	74

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AA	arachidonsav (arachidonic acid)
ACh	acetilkolin
ADMA	aszimmetrikus dimetil arginin
AP-1	transzkripció faktorot aktíváló fehérje
CAT	kataláz
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
COX	ciklooxygenáz
EDHF	endothelium-eredetű hyperpolarizációs faktor
FID	áramlás-indukálta dilatáció (flow-induced dilation)
fvs	fehérvérsejt
H₂O₂	hidrogén peroxid
Hgmm	higanymilliméter
INDO	indometacin
I/R	iszkémia - reperfüzió
LDM	latissimus dorsi izom
mM	millimoláros
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MMP-9	matrix metalloproteinase-9
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NE	noradrenalin (norepinephrine)
NO	nitrogén-monoxid
Pa	Pascal
PD	passzív átmérő (diaméter)
PGE₂	prostaglandin E ₂
PGG₂	prostaglandin G ₂

PGH₂	prostaglandin H ₂
PGI₂	prostaglandin I ₂
PKC	protein kináz
PLA	phospholipaz A
PLC	phospholipaz C
PSS	fiziológiás sóoldat (physiological salt solution)
ROS	reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)
SNP	nátrium-nitroprusszid (Sodium nitroprusside dihydrate)
SOD	szuperoxid dizmutáz
SQ 29,548	thromboxán A ₂ receptor antagonist
sec	másodperc
TP	thromboxán protein
TXA₂	thromboxán A ₂
WSS	érfali nyírófeszültség (wall sheer stress)

2. BEVEZETÉS

A helyreállító plasztikai sebészetben alkalmazott legkorszerűbb műtéti módszer a szövetek (bőr, zsír, izom, csont) átültetése érnyeles technikával, vagy szabad lebenyként mikrovaszkuláris anasztomózis létrehozása céljából. Ilyen esetekben a lebeny túlélésének záloga a megfelelően atraumatikus sebészi műtéti technika és a lebeny keringésének posztoperatív támogatása. A műtétek sikere nagyban függ az artériás befolyás biztosításán, de a vénás kifolyás megfelelő mértékének megléte legalább olyan fontos. A vénás keringés elégtelensége, az érintett érszakasz spazmusa és/vagy trombózisa vénás pangás kialakulásához és következményes lebeny-nekrózishoz vezethet, mely a műtét sikertelenségét okozhatja [1].

A rekonstrukciós plasztikai sebészetben az iszkémia reperfúzió (I/R) okozta károsodás jelentősen befolyásolja az izomlebenyek túlélését. Azonban, kevés ismerettel rendelkezünk az I/R során a haemorheológiai paraméterek és az oxidatív stressz hatásairól, különösen ezen tényezők hatásáról a lebenyek nutritív ellátásáért felelős vénás mikroerek működésére [2].

Az artériás rendszer fiziológiás és patológias működési mechanizmusainak vizsgálata széles körben zajlik az alap- és klinikai- orvostudományi kutatásokban, ugyanakkor máig is kevés kutatócsoport foglalkozik a vénás rendszer szerkezetével, felépítésével, funkciójával és a vénás rendszer általános működésével.

Az emberi szervezetben a teljes vértérfogat ~60-80%-a a tágulékony, alacsony nyomású, ~450-500 km hosszúságú vénás rendszerben lokalizálódik, és ennek ~25-50%-a a kis vénákban és venulákban oszlik el [3]. Ezért a kardiovaszkuláris megbetegedések patofiziológiájának pontos megismerésében kulcsszerepű a vénás rendszer haemorheológiai és funkcionális működésének pontos megismerése. Az elmúlt évtized eredményei rávilágítottak, hogy a vénák nemcsak passzív vérvezető csövek, hanem számos fontos élettani funkcióval is rendelkeznek. A vénás kapacitancia erek, a szervezet ortosztatikus toleranciájának szabályozásában, míg a vénás mikrocirkuláció a posztkapilláris vénás ellenállás és számos bioaktív anyag felszabadulása révén a vénák simaizom és endothélium működését szabályozzák [4].

A vénák fiziológiás szerepének, illetve kóros állapotban a vénás funkciót befolyásoló tényezők pontosabb megismerése és a háttérben működő szabályozó folyamatok felderítése nagyban elősegítheti a műtéttechnika fejlődését és mikrosebészeti módszerek kidolgozását is, de igen fontos a lebenykeringés perioperatív támogatását célzó kezelések kidolgozásában is.

A vénák hemodinamikai funkcióinak, az aktív és passzív érátmérőnek meghatározója a vénák falának passzív biomechanikai karakterisztikája (kapacitancia), a vénák falában működő aktív simaizom tónus és az un. miogén válasz [5]. Korábbi tanulmányok részletesen elemezték a vénák biomechanikai tulajdonságait [6-10], azonban a vénák miogén tónusának szabályozása mindmáig kevésbé ismert terület. A különböző méretű vénák és venulák tónusát szabályozó lokális mechanizmusokat [7] és az endothelium szerepét a vénás érátmérő változásokban [8] korábbi közlemények ismertették. A nyomás hatására kialakuló spontán vénás miogén tónus jellemzésével, valamint a miogén válaszban szerepet játszó mechanizmusokkal kapcsolatban eddig kevesen végeztek kutatásokat [9, 10].

A kardiovaszkuláris megbetegedések világszerte és hazánkban is vezetnek a morbiditási és mortalitási mutatókat, ezért kiemelt jelentőségű a megbetegedések háttérében álló kóros folyamatok tanulmányozása. Az elmúlt évtizedben a kardiovaszkuláris kutatások jelentős része a nagy artériákban végbemenő patofiziológias folyamatokat vizsgálta. Számos kardiovaszkuláris kórállapotban a nagyerekben végbemenő változások mellett a kiserek (arteriolák, venulák és nyirokerek) funkciójának károsodása is a szöveti vérkeringés zavarához vezetnek. Ezekben a kórállapotokban az arteriolák patofiziológias szerepe jelentős, azonban nem hanyagolható el a kis vénák és venulák szabályozó szerepe sem, a mikrocirkuláció és a prekapilláris arteriolák működésére gyakorolt hatásában.

Érdekes megfigyelés, hogy a legtöbb vaszkuláris károsodás háttérében (atherosclerosis, diabetes mellitus, hyperhomocysteinemia, stb.) a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) megemelkedett szöveti szintje áll [11-18], mely közös hatásmechanizmust feltételez.

Különböző kardiovaszkuláris kórállapotokban, mint hipertónia [19-21], diabetes mellitus [15] és hyperhomocysteinemia [22-26] emelkedett a vaszkuláris H_2O_2 képződés is, mely szubcelluláris jelátviteli mechanizmusokon keresztül funkcionális és morfológiai változásokat okoz az erekben.

Az oxidatív stressz emelkedett ROS (szuperoxid-anion, H_2O_2 , hidroxiszabadgyök) koncentráció és/vagy csökkent antioxidáns hatás miatt alakul ki, amiért főleg a csökkent antioxidáns enzimszintek felelősek (glutathion, E-vitamin, aszkorbinsav, glutathion peroxidáz, szuperoxid dizmutáz, kataláz). Az oxidatív stressz szignifikáns szerepet játszhat a mikrovaskuláris diszfunkció kialakulásában [18].

Ezen túlmenően, szöveti sérüléssel és/vagy gyulladással járó patológiás állapotokban aktivált leukociták kerülnek az extravaszkuláris térbe, melyek számos vazoaktív ágenszt szekretálnak. Az aktivált leukociták oxidatív működésük következtében H_2O_2 -t termelnek, amelynek az extracelluláris koncentrációja a mikrocirkuláció környezetében magas szintre emelkedhet (0.3 mM-ig) [27-30].

Az I/R mechanizmusa hatással van a vaszkuláris és szöveti funkciókra, és komplex patofiziológiai és morfológiai elváltozásokat okoz. Az oxigén derivált szabadgyökök keletkezése befolyásolja az endotheliális diszfunkció kialakulását, helyi és szisztémás hemodinamikai és metabolikus változásokat okozhat, amelyek komplement választ és gyulladási kórfolyamatokat aktiválnak [31, 32].

A haemorrheológiai paraméterek, mint a teljes vér és vérplazma viszkozitása, a hematokrit, a vörösvérsejt deformabilitás és aggregáció, és az azokat szabályozó faktorok szintén szerepet játszanak az I/R jelenségében. [33, 34]. A szisztémás változások mellett a reperfundált területen zajló patológiás mechanizmusok vizsgálata is élénk tudományterület [35-39].

Az érintett iszkémiás területen a lokális vérkeringés tulajdonságainak megváltozásával és a reperfúzió során beáramló vérnek a reperfundált területre gyakorolt hatásaival kapcsolatban még több kérdés tisztázásra vár.

2.1. A vénás erek biomechanikai tulajdonságai

- *Intrinzik mechanizmusok*

A vénák biomechanikai viselkedését elsősorban intrinzik mechanizmusok szabályozzák. Az intrinzik tényezők passzív és dinamikus aktív elemekből tevődnek össze. A vénafal fő passzív komponensei a kollagén és az elasztin, míg a simaizomsejtek biztosítják a vénafal biomechanikai szabályozásának dinamikus részét. Az erek biomechanikai tulajdonságai különböző geometriai (pl. külső-, belső átmérő, falvastagság, miogén tónus, érkapacitás) és rugalmassági (pl: elasztikus modulus, disztenzibilitás) paraméterekkel jellemezhetők [40]. Ezeknek az értékeit az *in vitro* kísérletek során regisztrált nyomás-átmérő jelleggörbékből, továbbá az érszegmensek hosszából és nedves súlyából lehet kiszámítani.

Az elasztikus modulus az erek falában a mechanikai feszültség és megnyúlás kapcsolatát jellemző arányossági együttható. Nagysága az érfal merevségével arányos és értéke a belső nyomás függvényében változik. Ezért az érfal rugalmasságát az egy-egy szűk nyomástartományra vonatkoztatott, úgynevezett inkrementális elasztikus modulussal szokták jellemezni. Ennek nagysága az érfal rugalmasságával fordítottan arányos, és az érfalban a mechanikai feszültség és a megnyúlás közötti nem-lineáris kapcsolatot jellemzi.

Az artériák elasztikus modulusa 50-200 Hgmm nyomástartományban 10^5 - 10^7 Pa között mozog, a középmeretű vénáké a vénás nyomástartományban hozzávetőleg egy nagyságrenddel kisebb.

Az érrendszer legtágulékonyabb szakaszát a vénás mikroerek (<200 μ m) képezik.

A disztenzibilitás, vagy tágulékonyosság, az egységnyi statikus nyomásváltozás hatására bekövetkező relatív lumentérfogat változás mértékét adja meg. Az elasztikus modulussal fordítottan arányos, de értékét az ér geometriai paramétereinek a megváltozása is befolyásolja, így bizonyos esetekben az elasztikus modulus változása ellenére is változatlan maradhat.

Az artériákhoz képest a vénákban a falvastagság/sugár arány mértéke sokkal kisebb. Az inkrementális disztenzibilitás az alacsony nyomástartományban (<50 Hgmm) nagyobb, ami magyarázatot ad arra, hogy az artériás nyomásértékeknél (pl. artériás szakaszba ültetett vénás graftokban) a vénák 2-5-ször merevebb csövekként viselkednek, mint az artériák [41].

A vénák pillanatnyi geometriai és rugalmassági paramétereit elsősorban a transzmurális nyomás és a simaizom tónus határozza meg.

A fiziológias nyomástartományon belül a rugalmassági paraméterek több nagyságrenddel változhatnak, és a vénás rendszerben az erek rugalmas tulajdonságai között nagyobbak a különbségek, mint az artériás oldalon [45]. Az érfalsimaizomzat reaktivitása függ a nyugalmi, passzív mechanikai állapottól, a maximális reaktivitását a fiziológiához közeli nyomásnál éri el.

- ***Extrinzik mechanizmusok***

Az extrinzik szabályozó tényezők sorába a szimpatikus idegek által létrehozott alaptónus és az erre rátevődő venomotor reflexek, továbbá a hormonális és egyéb humorális mechanizmusok tartoznak [43].

Vazokonstriktió (pl. noradrenalin-indukált hatás) csökkenti, vazodilatáció (pl. nitrogén-monoxid hatás) pedig növeli az inkrementális elasztikus modulust [44].

A különböző humorális és neurális stimulusokra bekövetkező simaizom válasz hatékonyságát az érfal pillanatnyi mechanikai állapota is befolyásolja [44].

2.2. A miogén mechanizmus

2.2.1. A miogén mechanizmus az artériás rendszerben

Az értónust meghatározó egyik fontos lokális szabályozó mechanizmus a nyomás-érzékeny miogén érválasz, amely során az intraluminális nyomás növekedésekor az erek átmérője csökken, a nyomás csökkenésekor viszont az átmérő növekszik.

A miogén választ először Bayliss írta le kutya *a. carotis* szegmenteken végzett kísérletei alapján 1902-ben [42], és a későbbiekben több kutatócsoport megerősítette az elmélet helyességét [46]. Az artériák és arteriolák nyomás-indukált miogén válaszait számos species különböző szerveiben vizsgálták *in vivo* és *in vitro*.

A megfigyelések azt igazolják, hogy a nyomás-érzékeny miogén érválasz a különböző speciemek számos szervében, eltérő érterületeken megtalálható mechanizmus [47-49], és meghatározó szerepe van a véráramlás autoregulációjában [50].

A miogén érválasz sejtszintű szabályozó folyamataira több hipotézis létezik. Egyes feltételezések szerint a nyomás növekedése különböző ioncsatornák aktiválását idézheti elő, megváltoztatva a szignál transzdukciós folyamatokat a simaizom sejtekben. Továbbá a simaizom hosszának változása szabályozza a kontrakciós fehérjék működését.

Más nézetek szerint az intraluminális nyomás változására az endotheliumból különböző anyagok szabadulhatnak fel, amelyek megváltoztathatják a simaizom tónust.

A nyomásváltozás érzékelésében és a mechanikai jel szubcelluláris továbbításában az endotheliális felszíni réteg glikokalix kiemelten fontosnak tűnik [51, 52].

2.2.2. A miogén mechanizmus a vénás rendszerben

A vénákban a transzmurális nyomás jelentős változásokat mutat a gravitációs és egyéb külső erők függvényében. A kis vénák intrinzik miogén mechanizmusairól az artériás erekkel kapcsolatos kutatási eredményekhez képest kevés adat található az irodalomban.

A vénás rendszerben a transzmurális nyomás-indukálta érválaszokat rendkívül kismértékűnek vélték, a vénás tónus szabályozásában nem tulajdonítottak neki szerepet. Ráadásul a vékonyfalú vénák, különösen a venulák rendkívül sérülékenyek, így funkcionális vizsgálatuk speciális körülményeket és nagy gyakorlatot igényel, valamint számos technikai nehézséggel bír. Ezért csak kevésbé kutatták ezt a mechanizmust a vénás rendszerben.

Jones számolt be elsőként a denevér szárny vénák miogén aktivitására vonatkozó megfigyeléseiről [53]. A későbbiekben, egyes speciális funkciót ellátó vénákban vizsgálták a vénás tónus lokális miogén szabályozását, pl. denevér szárnyból izolált venulákban, több faj portális vénáiban, [54], valamint tengerimalac mezenterialis vénákban [55]. Denevér szárny venulákban az intraluminális nyomás változásai jelentősen befolyásolják az erek spontán kontrakciójának frekvenciáját és amplitúdóját [56].

Összehasonlítva az arteriolákon végzett kísérletek eredményeivel valószínű azonban, hogy a venulák sokkal érzékenyebbek az intraluminális nyomás változásaira, mint az arteriolák.

In vivo és *in vitro* kísérletekben is kimutatták, hogy patkány *v. saphenában* akut nyomásterhelés hatására jelentősen megnőtt a vénák miogén válaszképessége.

Ezek a kísérletek igazolták, hogy az intraluminális nyomás emelkedésére fokozódott az aktív mechanikai feszültség a vénák falában [57]. Ez a nyomás-indukált miogén mechanizmus a teljes vénás kapacitás ~30 %-át képes szabályozni.

Ugyancsak patkány *v. saphenában* a krónikus vénás nyomásterhelés megduplázta a vénák akut nyomás-indukált miogén válaszait a kontroll állatokéhoz képest [58]. A krónikus vénás nyomásterhelést ún. head-up tilt rendszerben (patkányok fejjel felfelé 45°-ban megdöntött csőketrecben voltak 2 hétig) érték el, a kontroll állatok nyugalmi pozícióban (vízszintes csőketrec) voltak [59].

Továbblépve, az alapkutató eredményeiről a klinikumban pletizmográfias vizsgálattal mutatták ki, hogy az emberi ujjbegy kisvénái a nyomás növelésére aktív konstriktóval válaszolnak [58].

A vénulák nyomás-indukált miogén válaszairól a kisszámú irodalmi adat miatt keveset tudunk.

Sertésből izolált szubepikardiális koronária vénulák nyomás-átmérő kapcsolatának vizsgálata során kimutatták, hogy a koronária vénulák az intraluminális nyomás növelésekor miogén aktivitást mutatnak [60]. Ez a nyomás-indukált miogén tónus kisebb, mint amit hasonló méretű arteriolákban megfigyeltek.

Az artériákhoz hasonlóan a nyomás-érzékeny miogén mechanizmus szerepet játszhat a vénák ellenállásának a szabályozásában, és ez által befolyásolja a vénás visszaáramlást és a kapilláris anyagtranszportot.

Az artériolák nyomás-indukált miogén tónusának és áramlás függő válaszának sejtszintű mechanizmusa a közelmúltban vált ismertté [61-64].

Ezzel ellentétben, a vénák miogén válaszainak sejtszintű történéseiről csak kevés adat található az irodalomban [7, 8, 60]. A vénás miogén tónus és reaktivitás celluláris folyamatainak pontos megismeréséhez még további megfigyelésekre van szükség.

2.2.3. A miogén mechanizmust befolyásoló tényezők

2.2.3.1. Az endothelium szerepe a miogén érválaszban

Jelenleg is nagy az érdeklődés az erek endotheliumából felszabaduló vasoaktív anyagok élettani szerepe iránt, amelyeknek szerepe lehet a nagy- [65] és kiserek [66, 67] tónusának szabályozásában.

Azonban, ellentmondásos adatokat találhatunk az irodalomban arról a kérdéstről, hogy a nyomás-szenzitív mechanizmus kizárólag az érfali simaizomzatban lokalizálódik-e (az érfali simaizomat intrinzik tulajdonsága), vagy a nyomás növekedés hatására bekövetkező miogén válaszból endotheliális faktorok is szerepet játszanak.

Korai, állatkísérletes modellekben [68-71] úgy észlelték, hogy a funkcionálisan ép endothelium szükséges a nyomás-indukált érválasz létrejöttéhez. Eszerint, az endothelium olyan nyomásérzékelőként működik, amely képes átalakítani az érzékelt mechanikai erő növekedését a vaszkuláris simaizomtónus növekedésévé a vazodilatátor faktor(ok) termelésének csökkentése révén [72].

A különböző endotheliális konstriktor [73] és dilatátor [74-77] anyagok értónust módosító szerepét több artériában és arteriolában megfigyelték.

Az előbbiekkal ellentétben, patkány *a. cerebri posteriorban* [78], nyúl- és nyúl- artériákban [79, 80], disznó koronária- [47], patkány cremaster- [81] és patkány mezenterialis arteriolákban [82] azt tapasztalták, hogy a nyomás-indukált érválaszokban az endothelium nem játszott szerepet. Később, feltételezték, hogy az endothelium mégsem játszik szerepet, hanem módszertani hiba miatt gyengült meg a miogén válasz az endothelium eltávolítása során [83].

Az endothelium esetleges szerepét a vénák és venulák nyomás-érzékeny miogén válaszaiban csak nagyon kevesen vizsgálták.

Kimutatták, hogy sertésből izolált koronária venulákban, az endothelium-roncsolt erek miogén válaszképessége nem különbözött az ép endotheliummal rendelkező kontroll erekétől [60].

Kutatások igazolták azt is, hogy patkány *v. saphenában* a nyomás-indukált miogén mechanizmus független az endotheliumtól [9].

Az endothelium eltávolítása nem változtatta meg szignifikánsan a nyomás-átmérő görbe karakterisztikáját sem kontroll állapotban, sem noradrenalin (NE) jelenlétében [8, 9].

Az alacsonyabb nyomásértékeknél az endothelium eltávolítása után csökkent a venulák átmérője, jelezve, hogy endotheliális dilatátor faktorok módosítani képesek a venulák miogén válaszát.

Az eredmények alapján patkány *v. saphenában* olyan endothelium függő mechanizmus működését feltételezik, amely az endotheliumból felszabaduló hiperpolarizáló és/vagy relaxáló faktorok révén védelmet nyújt az érspazmus ellen az ér túlnyújtott állapotaiban. Ismert, hogy a patkány *v. saphena* fiziológiás körülmények között axiális irányban megnyúlhat.

Megállapították azt is, hogy a vázizom venulák endotheliuma részt vesz a venulák ellenállásának szabályozásában ez által befolyásolva a vénás visszaáramlást és a kapilláris funkciót; továbbá, hogy a venulák endotheliumának működése különbözik az arteriolákétól [8, 9]

Érdekes megfigyelés, hogy hím és nőstény kísérleti állatokban az arteriolás rezisztencia lokális szabályozásában nemi különbségek tapasztalhatók [17]. Az endothelium-függő miogén tónus modulációja szintén eltérő lehet hím és nőstény kísérleti állatokban.

Hím és nőstény patkányokból izolált koronária artériákban [84] és gracilis izom arteriolákban [85] kimutatták, hogy a hím patkányokból származó erekben az endothelium jelenlétében a nyomás-indukált miogén konstriktó mértéke nagyobb, mint a nőstény állatokból származó arteriolákban.

A tapasztalt különbségnek feltehetőleg az az oka, hogy a nőstény állatokban a keringő 17- β -ösztradiol hormon fokozza az endothel sejtek nitrogén-monoxid termelését, ami csökkenti az erek bazális miogén tónusát.

Ez magyarázatot adhat arra a megfigyelésre, hogy a menopauza előtt a nők vérnyomása alacsonyabb és szignifikánsan kevesebbszer fordulnak elő egyes kardiovaszkuláris betegségek (pl: hipertónia, atherosclerosis), mint az azonos korcsoportú férfiaknál.

2.2.4. Az endothelium szerepe a vénás tónus humorális szabályozásában

A vaszkuláris endothelium számos vasoaktív anyag szintézisére képes: pl. nitrogén-monoxid, az arachidonsav metabolizmus vazodilatátor és vazokonstriktor termékei, endothelin, hiperpolarizációs faktor, hisztamin, oxigén szabadgyökök [86-92].

Számos vasoaktív anyagról igazolták, hogy hatásukat a kardiovaszkuláris rendszer, különböző szövetein az endothelium által termelt vasoaktív faktorok felszabadításán keresztül fejtik ki.

Különböző mechanikai stimulusok (pl. nyomás, áramlás) hatására is növekedhet az endotheliális anyagok szintézise és felszabadulása.

Az endotheliumból felszabaduló vasoaktív anyagok és mediátorok a különböző fiziológiás és kóros állapotokban egymással és egyéb lokális és neurális tényezőkkel szoros kölcsönhatásban befolyásolják a vaszkuláris rezisztenciát.

Az endothelium egy bonyolult rendszer tagjaként vesz részt az értónus, így a vénák és venulák ellenállásának szabályozásában.

2.2.4.1. Az endothelium eredetű prosztaglandinok szerepe

A vaszkuláris endotheliumban különböző vasoaktív prosztaglandinok szintézise is folyik, amelyek szintén szerepet játszanak az értónus szabályozásában. Egyes kísérleti megfigyelések azt mutatják, hogy a vénákban kevesebb arachidonsav metabolit keletkezik, mint az artériákban [93, 94], ugyanakkor megegyező [95], sőt nagyobb mennyiségű [96] prosztaciklin termelést is tapasztaltak vénákban, mint artériákban.

Az egyes prosztaglandinok vasoaktív hatása is különböző lehet az artériákban és a vénákban, továbbá régió- és fajfüggő különbségekről is beszámoltak [97, 98].

Humán *v. saphenában* a prosztaciklin kontrakciót okozott, míg humán kézvénákban, kis koncentrációban relaxációt idézett elő [99].

A bazális értónust befolyásoló tényezők között szerepet játszhatnak az arachidonsav metabolitok is. Ezt a feltételezést alátámasztja az a megfigyelés, hogy kutyában *in vivo* a ciklooxygenáz enzim gátlása vénás konstriktiót eredményezett [100].

Az arachidonsav metabolitok szerepét a vénás tónus szabályozásában megerősíti az a vizsgálat is, miszerint kutya vénákban az arachidonsav endothelium-függő kontrakciót okozott, melyet COX-inhibitor gátolt. [101].

Kutya szisztémás- és tüdő vénákban az arachidonsav endothelium-függő mechanizmussal fokozta a noradrenalin-indukált kontrakciót [102].

Számos vazóaktív anyagról igazolták, hogy módosítani képes a különböző prosztaglandinok felszabadulását a vaszkuláris endotheliumból.

Macska és patkány *v. cavaban in vitro* noradrenalin és dopamin fokozta a prosztaglandin I₂ (PGI₂) és thromboxán A₂ (TXA₂) felszabadulást. Ugyanezek a preparátumokon vazopresszin növelte a thromboxán-, míg bradikinin a prosztaciklin felszabadulást [98].

Kutya vénákban kimutatták, hogy a bradikinin-indukált kontrakcióban TXA₂/Prosztaglandin H₂ (PGH₂) receptor-aktiváció játszik szerepet [103]. Izolált vénákban a trombin fokozta a prosztaciklin felszabadulást [104]. Kutyaéból izolált szisztémás és tüdő vénákban trombin hatására endothelium-függő mechanizmussal noradrenalin-indukált kontrakció alakult ki [102].

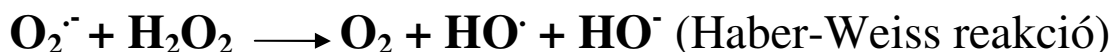
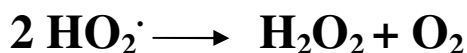
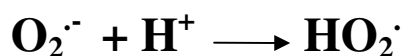
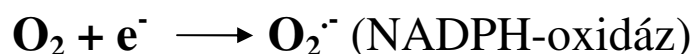
A különböző humorális anyagok mellett mechanikai faktorok is befolyásolják az érfal prosztaglandin termelését. Kutya *v. jugularis externa* érszegmentumban a megnövekedett intraluminális nyomás PGI₂ felszabadulást okozott, amit az intraluminális áramlás növelése nem fokozott tovább [105]. Tehát a prosztaglandin termelést az intraluminális nyomás stimulálja.

Feltételezhető, hogy a különböző lokális humorális- és biomechanikai tényezők egymás hatását is szabályozva, együttesen határozzák meg a vaszkuláris endothelium prosztaglandin termelését, és ezáltal szabályozzák az értónust.

2.3. A H₂O₂ fiziológiai és patofiziológiai szerepe a mikroereken

2.3.1. A H₂O₂ élettani szerepe

A H₂O₂ egy színtelen, szobahőmérsékleten folyékony anyag. Kimutatható az ivóvízben, esővízben és a tengervízben is [106-108]. A H₂O₂ élettani szempontból fontos molekula, kilélegezzük, kiválasztjuk és étkezéskor elfogyasztjuk [109]. *In vivo*, fiziológiai körülmények között a szöveti oxidatív mechanizmus egyik terméke a szuperoxid anion, mely gyorsan, 10⁻⁹s alatt, átalakul hidrogén peroxiddá (H₂O₂). A folyamatot a szuperoxid dizmutáz enzim katalizálja (1. ábra). A H₂O₂ szintén reaktív, de sokkal stabilabb, kevésbé károsító és erősen diffúzibilis vegyület [110]. Korábbi tanulmányok ismertették, hogy a H₂O₂-ot számos sejttípus termeli és szekretálja, így a vaszkuláris endothel és a simaizom sejtek is. A vaszkuláris struktúrákból felszabaduló H₂O₂ parakrin és/vagy autokrin szabályozó funkciót tölt be [29, 111, 112].



1. ábra: H₂O₂ keletkezése és eliminációja: NADPH-oxidáz enzim hatására oxigén szabadgyök keletkezik, mely hidrogén atommal redukálódva hidroxil-szabadgyököt képez. A hidroxil-szabadgyök hidrogén peroxiddá (H₂O₂) alakulhat. A H₂O₂ eliminációjának egyik módja az enzimatis lebontás szuperoxid dizmutáz, vagy kataláz enzim hatására. A Haber-Weiss reakcióban a H₂O₂ szuperoxid-gyök társaságában hidroxil-szabadgyököt hoz létre. Fenton reakcióban a H₂O₂ lebontását vas katalizálja.

A H_2O_2 nagyfokban vízdékony és szabadon átjut a sejtmembránokon, azonban a diffúzió/transzport mechanizmusa még nem tisztázott [113].

Számos publikáció szólt róla, hogy a magas H_2O_2 szint ($\geq 50 \mu\text{M}$) citotoxikus számos állati, növényi és baktérium sejt kultúra számára. Az LD_{50} érték és sejthalál módja (apoptosis vagy necrosis) a sejtek típusától, fiziológiai állapotától és a H_2O_2 hatásának hosszától és koncentrációjától függenek [113-117].

Közismert, hogy magas koncentrációban a H_2O_2 toxikus *in vivo*, és eliminálása fontos a szervezet fiziológiai működése szempontjából. Enzimatis lebontását a kataláz és peroxidáz enzimek (különösen a glutation peroxidáz) végzik el [113, 118-121]. Paradox módon humán szervezetben a veleszületett kataláz enzim hiány nem jár H_2O_2 toxicitás megjelenésével [113].

Kémiai szempontból a H_2O_2 oxidáló és redukáló szerként is funkcionálhat [113, 116, 122]. A vegyület toxicitását a belőle képződő hidroxil-gyök ($\text{OH}\cdot$) jelenti. A hidroxil-gyök képződés UV-sugárzás [123] és fém ionokkal ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) való interakció közben történik [113, 124].

In vivo a H_2O_2 a szuperoxid gyök ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dizmutációja révén keletkezik. Enzimatisan a szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) katalizálja a H_2O_2 képződését és nem-enzimatis folyamat során is keletkezhet. H_2O_2 termelődhet más enzimek segítségével is, így számos oxidáz, köztük glikolát- és monoamin oxidáz a zsírsejtek-oxidációja révén serkenti a H_2O_2 termelődését [113, 119, 125].

2.3.2. Exogén H₂O₂ hatása artériás ereken

Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a H₂O₂ egyaránt okozhat kontrakciót [20, 126-128] és relaxációt [129-132] nagyereken. A H₂O₂ vazóaktív hatásai a vizsgált fajtól, az erek típusától vagy a vizsgálati protokolltól függenek. A mM-os koncentrációjú H₂O₂ adminisztrációja különböző szövetekben vizsgált erekben és izolált artériákban növelte az izometriás falfeszülést [127]. H₂O₂ vazokonstriktiót okozott izolált, kanulált egér fark arteriolában [133]. Ezzel ellentétben, további tanulmányok azt mutatták, hogy a H₂O₂ dilatációt indukált macska és tengerimalac vese arteriolában [134, 135] és patkány *cremaster* izom arteriolában [136].

A felsorolt ellentmondó eredmények háttérében az eltérő értípusok, a különböző kísérleti feltételek és a H₂O₂ eltérő koncentrációi szerepelhetnek [20, 130].

A korábbi tanulmányok eltérő eredményeiben szerepet játszik, hogy az egyes kísérleti protokollok más módszert alkalmaztak a kísérlet során kontrollként használt nyugalmi (bazális) értónus felvételére. Egyes kutatók az ér spontán tónusát értelmezték bazális értónusnak, más csoportok a bazális vaszkuláris tónust különböző vazóaktív szerekkel hozták létre.

A vazóaktív bazális tónus beállításában az adrenalin, a thromboxán analógok és kálium-klorid szerepeltek [130-132, 137]. Ezek a vegyületek a H₂O₂-aktiválta celluláris mechanizmusokkal interferálnak. Emiatt korábbi kísérletekben a H₂O₂ vázizom arteriolák átmérőjére gyakorolt hatásának mechanizmusa rejtve maradt, vagy jelentősen módosulhatott az egyidejűleg alkalmazott erős vazóaktív szerek hatására.

2.3.2.1. A H₂O₂ vazomotor szerepe izolált arteriolákon

Kutatócsoportunk korábbi tanulmányok során vizsgálta a H₂O₂ direkt vazomotoros választ patkány vázizom arteriolákon [46]. A szerteágazó és gyakran ellentmondó irodalmi adatok mellett *in vitro* vizsgálatok során tanulmányoztuk a H₂O₂ hatását arteriolák miogén tónusára és tisztáztuk a háttérben álló szabályozó mechanizmusokat.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a H₂O₂ jelentős vazoaktív hatással bír az arteriolákon. A kísérletek során alkalmazott H₂O₂ koncentrációk közelítőleg a fiziológiásan is jelen levő koncentrációkat jelentették. Mikroerek környezetében a fiziológiás H₂O₂ koncentráció ~10⁻⁶M [46].

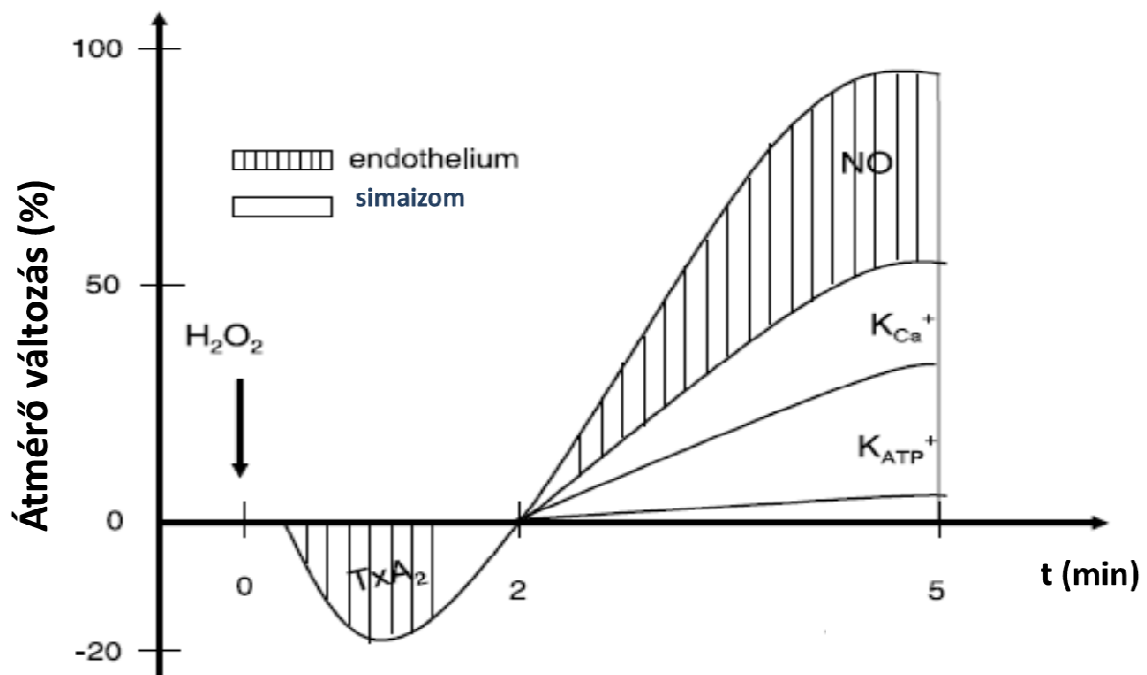
Arteriolákon végzett kísérletekben a H₂O₂ koncentrációtól függően bifázisos választ hozott létre. Az alacsonyabb koncentrációk (10⁻⁶ – 3x10⁻⁵M) konstriktiót, míg a magasabb koncentrációk (6x10⁻⁵ – 3x10⁻⁴M) a kezdeti konstriktiót követően dilatációt okoztak.

A hatásmechanizmus feltérképezése során az eredmények alapján a konstriktióért COX-enzim által termelt konstriktor prosztaglandinok, a PGH₂/TXA₂ felelősek. A dilatációs választ részben, NO, részben K⁺ csatornák aktiválása mediálja.

A **2. ábra** összefoglalóan mutatja a H₂O₂ hatását patkány gracilis izom arteriolák miogén tónusára.

Exogén H₂O₂ hatására a humán koronária arteriolák dilatáltak és simaizomsejtek hiperpolarizált állapotba kerültek. A H₂O₂ okozta dilatáció csökkenthető volt katalázzal, kálium-kloriddal és apaminnal. Az endothelium denudációja nem volt hatással az exogén H₂O₂ vazoaktív működésére.

Tehát a H₂O₂ vazodilatatív válaszai nem endothelium-függő mechanizmussal zajlanak humán koronária arteriolákban.



2. ábra: H₂O₂ hatása az arteriolák miogén tónusára:

H₂O₂ adminisztrációja kezdetben vazokonstriktiót, majd a konstriktió mértékét meghaladó vazodilatációt idézett elő. Az x tengely az időt, az y tengely a bazális értónushoz viszonyított százalékos érátmérő változást ábrázolja.

A konstriktiót nagy részben thromboxán A₂ közvetítette endothelium-függő módon.

A vazodilatáció K⁺ csatornák és nitrogén-monoxid által mediált, endothelium-függő és független mechanizmussal [47]

2.3.3. A H₂O₂ szerepe a vazomotor értónus szabályozásában

2.3.3.1. A H₂O₂ szerepe az arteriolák miogén válaszában

Korábban említettük, hogy elsőként 1902-ben Bayliss tanulmányozta arteriolákban az intraluminális nyomás hatására bekövetkező érátmérő változásokat [42]. Kísérletei alapján leírásra került a miogén autoreguláció jelensége. Az emelkedett intraluminális nyomás hatására az érfali simaizomsejtek fokozott feszülésnek vannak kitéve. Ez a fokozott nyomás-indukálta stressz és a megváltozó áramlási viszonyok közvetlenül hatnak a simaizom sejtek membránjain elhelyezkedő ioncsatornákra. Fokozódik a Na⁺, K⁺ és Ca²⁺ csatornák konduktanciája, mely a kationok intracelluláris beáramlásával és következményes membrán depolarizációval jár. A depolarizáció hatására aktiválódnak a feszültség-függő Ca²⁺ csatornák, Ca²⁺ áramlik a sejtekbe és konstriktiót okoz az érfali simaizomzatban [75, 138].

Számos tanulmány felveti a lehetőségét, hogy a H₂O₂ befolyásolja a miogén autoregulációt. Ezeket a vizsgálatokat nagy részben arteriolákon végezték, H₂O₂ hatásáról kis vénákon kevés adat áll rendelkezésre.

A meglévő tanulmányokban ellentmondó adatok vannak a H₂O₂ hatásáról a miogén válaszra. Egyes tanulmányok konstriktiót, mások dilatációt írnak le. A konstriktió hátterében feltehetően a TXA₂ és származékainak fokozott termelődése állhat [139].

Más nézetek szerint a H₂O₂ közvetlenül aktivál K⁺ csatornákat, és így okoz membrán depolarizációt és konstriktiót a simaizom sejtekben [140]. A jelátviteli utak, amelyeken keresztül a H₂O₂ a vazoaktív hatásait kiváltja, mostanig nem pontosan ismertek. Előzetes tanulmányainkban izolált kisartériákon kimutattuk, hogy az intraluminális nyomás emelése reaktív oxigén gyökök termeléséhez vezet [141].

A jelenlegi tanulmányok a miogén válasz létrejöttében a prosztaglandinok szerepét hangsúlyozzák [64]. Ugyanakkor egérfarok artériában kimutatták, hogy a nyomásindukálta miogén tónus H₂O₂ által mediált [133].

A kis vénák vazomotor tónusa részt vesz a szív irányába történő véráramlásának, a kapilláris keringés és a filtrációs-reabszorpciós folyamatokhoz szükséges kapilláris intraluminális nyomás szabályozásában [142].

A kis vénák miogén válaszában mechanizmusát még nem jellemezték, azonban ismert, hogy a vénás keringésben igen gyakran emelkedett a reaktív oxigén gyökök termelése [143].

Korábbi vizsgálataink továbbá megmutatták, hogy különböző méretű vénás ereken a vazomotor válaszok szabályozásában a konstriktor prosztoglandinoknak fontos szerepe lehet, mind fiziológias és patológias körülmények között [144].

A COX enzimek az arachidonsavat PGH₂-é konvertálják, melyből a prosztaciklin szintáz által PGI₂ [145], vagy a thromboxán szintáz által TXA₂ keletkezik [146]. PGI₂ a prosztaciklin receptorhoz kötődik [147], mely receptor a vérlemezkéken és a vaszkuláris simaizom sejteken helyezkedik el [148].

A vérlemezke prosztaciklin receptorok általi aktivációja a vérlemezke aggregáció gátlásához vezet [149]. A PGI₂ a simaizom sejtek prosztaciklin receptorán hat. Az IP receptorhoz való kötődése ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) szintézist indukál, mely simaizom relaxációhoz vezet [150].

A koronáriabetegség műtété során a szív fülcséjéből nyert koronária arteriolákban azt mutatták ki, hogy az áramlás/nyírófeszültség endotheliális H₂O₂ termelődést indukál, amely az endotheliumhoz kötődő hiperpolarizációs faktorként (EDHF) jellemezhető, így az a vaszkuláris simaizomsejtek hiperpolarizációját, majd következményes ellazulását és dilatációját okozza. [151].

Szívsebészeti beavatkozás közben a jobb pitvari fülcséből izolált arteriolákat (passzív átmérő: 135±7µm, n=71) üveg mikropipettákkal kanulálták. A nyírófeszültség, a H₂O₂ és a Ca²⁺ csatorna-blokkoló papaverin hatására kialakult belső érátmérő változásokat videomikroszkóppal rögzítették. Regisztrálták a vaszkuláris simaizomsejtek membránpotenciál változásait is. Néhány ér esetében a nyírófeszültség hatására endothelialis H₂O₂ termelődést igazoltak. A H₂O₂ felszabadulását fluoreszcens festék segítségével (2',7'-diklorofluorescein-diacetát) jelölték és konfokális mikroszkóppal végeztek képalkotó felvételeket. Az elektronmikroszkópos képalkotásokhoz cérium-kloriddal jelölték a felszabaduló H₂O₂-t.

Kataláz jelenléte gátolta az áramlás függő dilatációt, azonban kataláz hatása mellett a papaverin okozta dilatáció megtartott volt. A nyírófeszültség hatására az endotheliális felszíni rétegben azonnali fluoreszcencia növekedést lehetett kimutatni. Kataláz kezelés hatására ez a fluoreszcens válasz elmaradt. Cérium-klorid jelölés esetén elektronmikroszkópiával

kimutatható volt a WSS-indukálta cérium depozíció az intimális területet körülvevő endothel sejtekben.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy WSS hatására ROS jelenléte bizonyítható az endotheliumban.

Ezek az adatok bizonyítékkul szolgálnak, hogy a nyírófeszültség endotheliális H_2O_2 termelődést indukál. Az izolált arteriolákon elvégzett kísérletek szerint a H_2O_2 egy endotheliumhoz kötődő hiperpolarizációs faktor, mely áramlásfüggő dilatációt okoz szívbeteg páciensek koronária arterioláiban *in vitro* körülmények között.

2.3.4. A H_2O_2 klinikai vonatkozásai a plasztikai sebészetben

A szöveti sérülés, a reperfúzió és az infekció összefüggésben van az oxidatív stresszel [152]. A H_2O_2 antiszeptikus ágensként való klinikai alkalmazása sebészeti beavatkozások során rutinszerű [153]. H_2O_2 oldat használata patkányokban és humán gyógyászatban elősegíti a var leválását és rövidíti a gyógyulási időt. Azonban jellegzetes bullaképződés és ulceráció jelenik meg, ha H_2O_2 kezelést alkalmaznak az új hám láthatóvá válásakor, a pörk leválása után [153].

A H_2O_2 sebgyógyulást befolyásoló hatásait vizsgáló limitált tanulmányok ellentmondó eredményeket közölnek az irodalomban. Néhány tanulmány szerint az antiszeptikus hatása és angiogenezist serkentő hatásai révén a H_2O_2 támogatja a sebgyógyulást. Más tanulmányok szerint a H_2O_2 a ROS-ok által okozott gyulladásban és sejtkárosodás kialakulásában játszik szerepet.

Számos további tanulmány vizsgálta a H_2O_2 direkt dózis-függő citotoxikus hatását. Idetartoznak a keratinocita gátlás/életképesség vizsgálatok, a reepithelizációs vizsgálatok, az apoptózis indukálása és a DNS szintézis-repair mechanizmusok. Ezek a folyamatok főként a fibroblasztok aktiválása révén kóros hegeképződést okozhatnak.

Az eddig közölt eredmények ellentmondásosak és nem egységesek az *in vivo* felhasználás vonatkozásában. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei gyakran utalnak a klinikai irányvonalakra, azonban az *in vitro* eredmények közvetlen átültetése a klinikumba gyakran nem a várt eredményt hozta [154].

Újabb kísérletekben kimutatták a H_2O_2 koncentráció hosszantartó emelkedését a sebszélén. A koncentráció-emelkedés hozzávetőlegesen 3 perccel a sebzést követően kezdődik el, a csúcstól körülbelül 20 perc után éri el, és megközelítően $1-2 \times 10^{-4}$ M koncentráció mérhető. A vizsgálatokat Zebradánio hallárva farokúszójának epitheliumában végezték. Niethammer és munkatársai kimutatták, hogy a sebszélben megjelenő H_2O_2 a gyors leukocita-aktiválódást szabályozza és a H_2O_2 szignál-molekulaként szolgál a gyulladáshoz vezető szövetekben, ezáltal antiszeptikus hatású [151].

A rekonstruktív sebészetben az átültetett lebeny szövetet (bőr, izom, zsír) gyakran kezelik 0,75 – 3% koncentrációjú ($2-8 \times 10^{-2}$ M) H_2O_2 oldattal seb- és szövettisztítás céljából. A H_2O_2 feloldja a véralvadékokat és eltávolítja az elhalt sejteket és vért mind a donor, mind a recipiens területeken, hogy megelőzze a fertőzést [155].

H_2O_2 alkalmazásakor az átültetett szövetekben oxidatív stressz fejlődhet ki a mikrosebészeti beavatkozások során [154]. A H_2O_2 termelődés és a következményes konstriktor prosztaglandin hatás a vénás mikrocirkuláció csökkenéséhez vezethet, megnövekedett thrombus képződéssel. A H_2O_2 hatást gyakorolhat a lebeny mikrocirkulációjára és annak túlélésére.

Az oxidatív stressz szövetsérülései következményei a jövőben csökkenthetők lesznek helyi antioxidáns terápia és/vagy COX gátló, vagy TXA_2/PGH_2 receptor blokkolók alkalmazásával. A jövőbeni új terápiás lehetőségek megelőzhetik a nagyobb szövődeményeket a vénás mikrocirkulációban és fokozhatják a szövetek túlélését.

A kardiovaszkuláris rendszer számos kór állapotában és az I/R [2] kapcsán is megnő a ROS-ok képződése, köztük a legstabilabb, nem túl reaktív H_2O_2 szintje.

A H_2O_2 -t számos sejttípus termelheti (aktivált leukociták, makrofágok, vérlemezkék, stb.). A H_2O_2 hatását az arteriolákra már jellemezték, azonban nincsenek adatok a H_2O_2 vázizom vénulák spontán tónusára gyakorolt direkt hatásáról.

A H_2O_2 exogén adminisztrációja a műtéti sebek dezinfekciója céljából széles körben alkalmazott módszer. A vénás mikrocirkuláció megváltozása különböző kór állapotokban (atherosclerosis, diabetes mellitus, hypertonia, hyperhomocysteinemia) feltételezi az endogén H_2O_2 szerepét a szöveti vérkeringésben.

A kutatás kérdései:

- A H_2O_2 hatással van-e a vázizom venulák spontán tónusára?
- A H_2O_2 milyen koncentrációban hat a kis vénák spontán tónusára? Ez a fiziológias vagy patológias tartományba esik-e?
- Milyen sejtszintű mechanizmusok játszanak szerepet a H_2O_2 vazomotor hatásaiban?
- Az intraluminális nyomás változása befolyásolja-e a vázizom venulák átmérőjét?
- Milyen celluláris mechanizmusok játszanak szerepet a vázizom venulák miogén vazomotor válaszában?

3. A KUTATÁS HIPOTÉZISEI

Előzetes tanulmányok alapján [20, 46] feltételezzük, hogy az endogén és az exogén H_2O_2 -nak fontos szerepe van a kisvénák átmérőjének szabályozásában.

1. Feltételezzük, hogy az intraluminális nyomás emelkedése spontán miogén választ (átmérőcsökkenést) hoz létre az endogén H_2O_2 felszabadulása révén.
2. Az exogén H_2O_2 az arachidonsav származék prosztaglandinok révén jelentős átmérő változást hoz létre.
3. Az exogén arachidonsav a prosztaglandinok termelődése révén jelentős átmérő változást hoz létre.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Célul tűztük ki, hogy izolált kis vázizom vénákban jellemezzük:

1. Az emelkedő intraluminális nyomás hatását az ér átmérőjére, aktív és passzív (Ca^{2+} -mentes) körülmények között.
2. A miogén válasz alakulását kataláz jelenlétében.
3. A miogén válasz alakulását a nem szelektív COX1 es COX2 gátló indometacin jelenlétében.
4. A miogén válasz alakulását a szelektív $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ receptor blokkoló jelenlétében.
5. A H_2O_2 növekvő (10^{-6} - 10^{-4} M) koncentrációinak hatását izolált vázizom venula átmérőjére, és annak vizsgálatát, hogy milyen sejtszintű mechanizmusok felelősek a vazomotor aktivitásért;
6. Az exogén AA növekvő (10^{-6} - 10^{-4} M) koncentrációinak hatását izolált vázizom venula átmérőjére, és annak vizsgálatát, hogy milyen sejtszintű mechanizmusok felelősek a vazomotor aktivitásért.
7. A kataláz hatását a vázizom kisvéna nyomás H_2O_2 , AA által kiváltott érátmérő változásokra.

5. MÓDSZEREK

A vénás mikroerekkel kapcsolatban végzett kísérleteinket a Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc – Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság, Járványügyi és Állatvédelmi Osztálya a 22.1/3118/003/2007 számú határozatával engedélyezte.

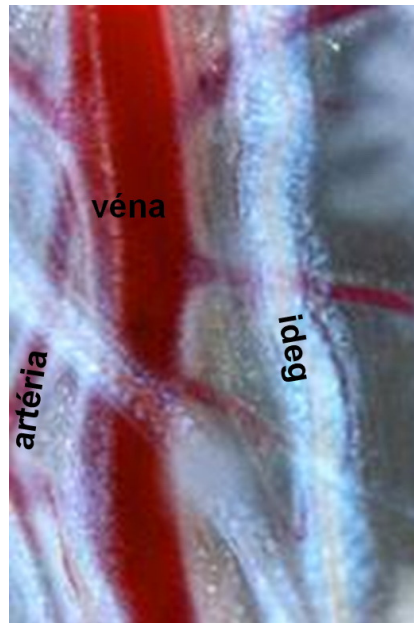
A munkánkhoz használt hím Wistar patkányokat elkülönítve tartottuk, standard táplálékot kaptak *ad libitum* és az ivóvízhez szabad hozzáférésük volt.

Kísérleteink során 250-300 grammos állatokkal dolgoztunk. Az altatáshoz Pentobarbitál-nátriumot (Nembutal) használtunk, intraperitoneális injekció formájában, 50 mg/kg-os dózisban. Az állatok életének kioltása (eutanázia) 150 mg/kg dózisú Pentobarbital intraperitoneális injekciójával történt.

5.1. Venulák izolálása

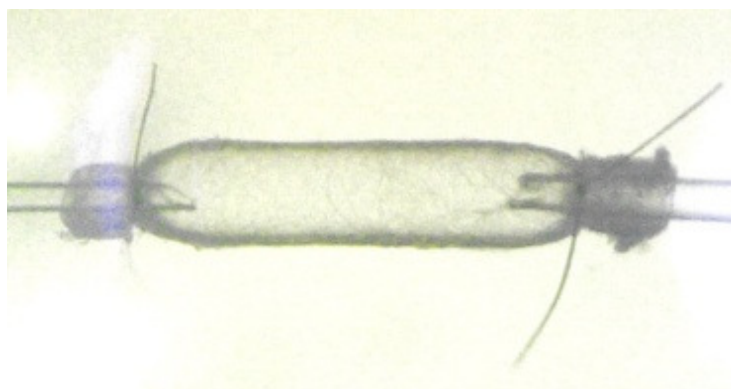
Kísérleteinket hím Wistar patkányok gracilis izmából izolált kis vénákon végeztük. Altatott állatokból a gracilis izom kivételre került, melyet ezt követően 0 - 4 °C-os standard Krebs oldatot tartalmazó, szilikonnal bélelt Petri csészébe helyeztünk. A sóoldat összetétele (mmol/L-ben): 110 NaCl, 5.0 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.0 MgSO₄, 1.0 KH₂PO₄, 5.5 glükóz, 24.0 NaHCO₃ volt. A kísérleteket megelőzően a sóoldatot 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂ tartalmú gázkeverékkel 20 percig oxigenizáltuk. Az oldat pH-ját 7,4-re állítottuk be. A gracilis izomból mikrosebészeti eszközök és operációs mikroszkóp segítségével izoláltuk a *v. gracilist*. Az intramuszkulárisan haladó vénát, a környező izom és kötőszöveti képletektől, valamint a mellette futó idegtől és gracilis arteriolától kellett a preparálás során elválasztani. (3. ábra). Az izolált véna ~1.5 cm-es szakaszát szegmentáltuk és egy speciális, két üvegkanült tartalmazó érkamrába helyeztük. A kamra és az üvegkanülok szintén hűtött, oxigenizált fiziológiás sóoldattal voltak feltöltve. A preparálás során megismert áramlási viszonyoknak megfelelően először a proximális, majd a disztális végét kanüláltuk az érszegmensnek, majd csomózással rögzítettük az üvegkanülokhöz (4. ábra).

Az üvegkanülok átmérője megegyezett - 110 µm volt - annak érdekében, hogy a miográf rendszerben azonos ellenállási viszonyokat hozzanak létre az érszegmens két végén. Mindkét kanül szilikon csövekben folytatódva kapcsolódott be az izotóniás nyomás- miográf rendszerbe.



3. ábra: Eredeti felvétel a preparálás során látott anatómiai viszonyokról: gracilis artéria, véna és ideg

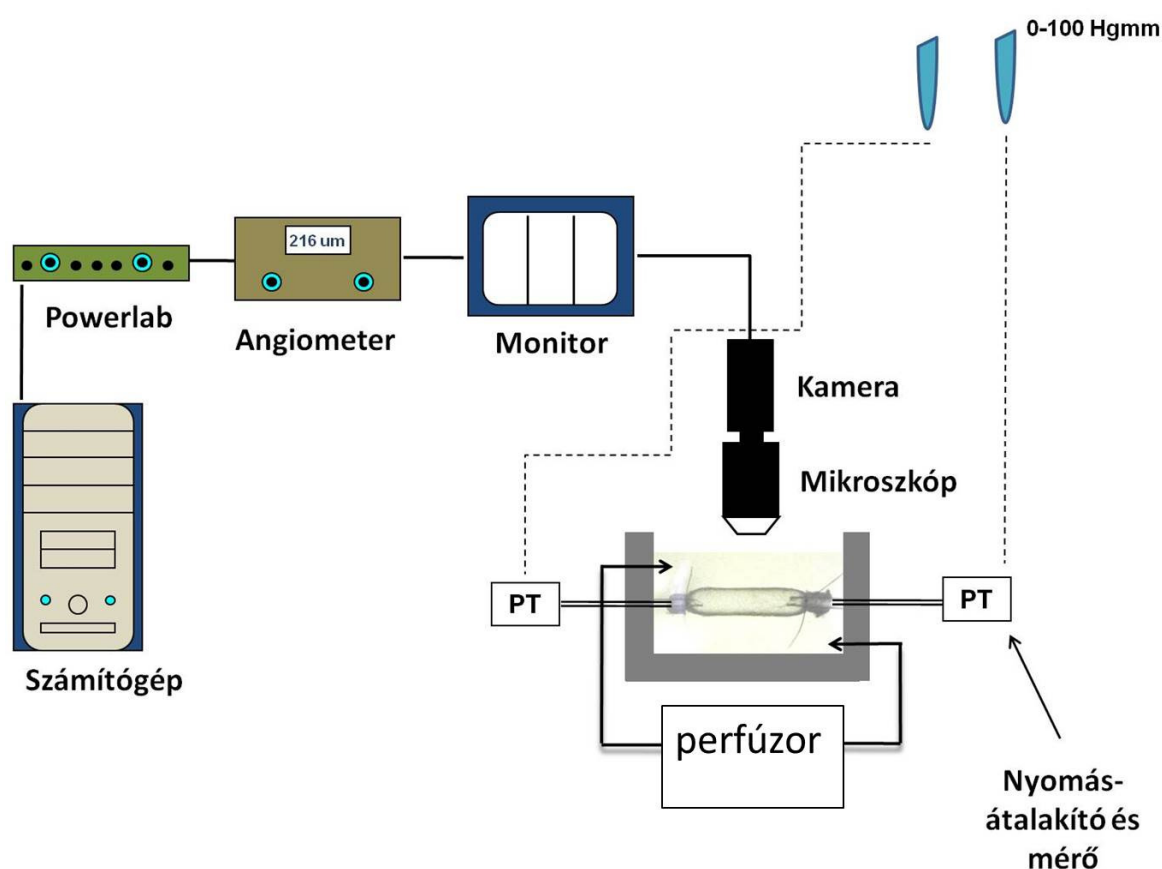
Hím Wistar patkányok gracilis izmának felvétele operációs mikroszkópban. A gracilis artéria, véna és ideg intramuszkulárisan, egymás környezetében futnak. Az izomdarab izolálása során a vénaszakasz gyakran vérrel telt marad.



4. ábra: Mindkét végén kanülált venula-szegmens

Eredeti felvétel izolált, kanülált v. gracilis szegmensről. Az érszakasz két végén látható üveg mikrokanülök átmérője egységes (110 μm). Az érszegmens kanülálását és a mikrokanülökön való rögzítését mikrosebészeti csipeszekkel és speciális mikro-fonállal végeztük operációs mikroszkóp segítségével.

A rendszer felépítésére jellemző, hogy egy infúziós pumpa (*Cole-Palmer Instrument Company*) biztosította a 37 °C-os, korábban leírt gáz eleggyel oxigenizált, 7,4-es pH-jú standard Krebs oldat áramlását az érkamrában és a rendszerben. Az állandó hőmérséklet beállítását az érkamrába helyezhető hőmérővel ellenőriztük (*Grant Instruments*), a szuperfúziós oldatot termosztát melegítette. Az üvegganülökhöz csatlakozó rendszeren keresztül az intraluminális nyomást tetszőlegesen szabályoztuk a falon rögzített, vízcentiméter alapján kiszámolt és beállított nyomás szabályozó tubusok segítségével. A rendszerbe két nyomásmérő (mindkét kanül mellett) és egy áramlásmérő is be volt építve. A vénák belső átmérőjét video-mikroszkóphoz csatlakozó mikroangiometer segítségével mértük. Az adatokat digitális adatgyűjtő rendszer (*Powerlab*) továbbította a számítógép felé (5. ábra).



5. ábra: A nyomás-miográf rendszer felépítését bemutató sémás rajz

A rendszerben speciális érkamrában helyezkedik el a mindkét végén kanülált ér-szegmens. A mikrokanülök mindkét végén nyomás mérő és átalakító eszköz van beépítve. Vízcentiméter alapján kalibrált fecskendő segítségével az ér-szegmensek végén változtatható az intraluminális nyomás, így áramlás is generálható. A rendszerben az érátmérő változásokat videomikroszkóp segítségével monitoron lehet követni. Az angiometer manuális beállítást igényel az érátmérő változása szerint. Az adatokat digitális rögzítő rendszer továbbítja a számítógépre.

Minden kísérlet kezdetén az ereket ~90 percig inkubáltuk 37 °C-on, oxigenizált Krebs oldatban, pH 7.4 mellett. Az erek bazális – nyugalmi állapotának az inkubációs periódus során felvett értónust tekintettük.

5.2. Felhasznált anyagok

A kísérleteink során használt vasoaktív anyagokat a gyártók leírása szerint tároltuk és kezeltük. Oldószerként a gyártó által javasolt anyagokat használtuk. Minden oldatot a kísérlet napján készítettünk el. A kísérletek kezdetén a kis vénák funkcionális épségét az endothelium-dependens vazodilatátor acetilkolin (ACh, Sigma Aldrich, 10^{-5} M), és az endothelium-independens vazodilatátor nátrium nitroprusszid (SNP, Sigma Aldrich, 10^{-6} M) egyszeri hozzáadásával vizsgáltuk.

Kísérleteink során a következő vasoaktív anyagok és gátlószerek kerültek felhasználásra:

- indometacin (INDO): a ciklooxygenáz enzim nem szelektív gátlószere
 $2,5 \times 10^{-6}$ M, 30 perces inkubáció (Sigma-Aldrich)
- SQ 29,548 (SQ): a PGH_2/TXA_2 receptor specifikus blokkolója
 10^{-6} M, 20 perces inkubáció (Cayman Chemical Company)
- Kataláz (CAT): a H_2O_2 -t metabolizáló enzim
120 U/ml, 30 perces inkubáció (Sigma-Aldrich)
- Arachidonsav (AA): prosztaglandin prekursor
 $10^{-7} - 10^{-4}$ M (Sigma-Aldrich)
- H_2O_2 : $10^{-9} - 10^{-5}$ M (Sigma-Aldrich)

Minden kísérlet végén felvettük az erek maximális passzív átmérőjét, ehhez a rendszerben áramló standard Krebs oldatot lecseréltük Ca^{2+} mentes fiziológiás sóoldatra és a Ca^{2+} csatornablokkoló papaverinnel (10^{-6} M, Sigma-Aldrich) 10 percig inkubáltuk.

Ezzel az eljárással a kísérletek végén meggyőződünk arról, hogy a korábban alkalmazott vasoaktív anyagok és gátlószerek nem sértették az ér simaizom viabilitását és egészében az érszégmens funkcionális épségét.

A vasoaktív anyagokat és gátlószereket extraluminálisan juttattuk az érkamrába, a felhasznált anyagoknál a végső koncentrációk értékeit tüntettük fel. Az enzimeket gátló szerek és vasoaktív anyagok oldására használt vegyszerek nem befolyásolták az érátmérőt.

Minden esetben külön kísérletben vizsgáltuk az oldószerek esetleges hatását az érátmérőre. Az egyes vasoaktív ágensek hatásainak vizsgálatát követően az érkamrát friss Krebs oldattal átmostuk.

5.3. Kísérleti protokollok

5.3.1. Spontán vazomotor válaszok vizsgálata

Kísérleteink kezdetén a korábban ismertetett nyugalmi kondíciók között ~ 90 percig inkubáltuk a kis vénákat. Az inkubációs periódus alatt mellőztük bármilyen vasoaktív ágens alkalmazását. Kizárólag a Krebs oldat áramlását biztosítottuk és vizsgáltuk a spontán kialakuló vazomotoros válaszokat 10 Hgmm-es intraluminális nyomás mellett.

5.3.2. Az intraluminális nyomás emelésére adott vazomotor válaszok vizsgálata

Az izolált erek vizsgálatára alkalmazható érkamra-rendszer jellegzetessége, hogy az intraluminális nyomás tetszőleges szabályozására ad lehetőséget. Korábbi vizsgálatok [64, 65] és saját tapasztalatok alapján következtettünk arra, hogy Wistar patkányok általunk vizsgált kis vénáiban fiziológiásan 6-10 Hgmm intraluminális nyomás van jelen, ezért az inkubációs periódusban, illetve később a gátlószerekkel történő inkubációs idő alatt is 10 Hgmm-en tartottuk az intraluminális nyomást.

A kísérletek első fázisában történt inkubációt követően vizsgáltuk az intraluminális nyomás 1-12 Hgmm közötti lépcsőzetes emelésére bekövetkező vazomotor válaszok jellegét. Az intraluminális nyomásértéket 1 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 12 Hgmm-re állítottuk be, 3 perces időközönként emelve a nyomást. A kísérletek további szakaszaiban a vasoaktív válaszokat megvizsgáltuk kontroll körülmények között és gátlószerek jelenlétében is. A különböző vasoaktív anyagok hatására bekövetkező érátmérő változásokat a lépcsőzetesen emelt intraluminális nyomás hatására kialakult miogén tónushoz viszonyítottuk.

Kísérleteinkben kontroll állapotnak a kezdeti inkubációt követően, az intraluminális nyomás emelésére kapott vazomotor válasszal beállt értónust tekintettük, ez mindennemű vazóaktív ágens vagy gátlószer alkalmazása nélkül alakult ki.

5.3.3. A vazomotor válaszok jelátviteli mechanizmusainak vizsgálata

Az intraluminális nyomás emelésére kapott vazomotor válaszokat különböző gátlószer jelenlétében is megvizsgáltuk: indometacint, SQ 29,548-at és katalázt alkalmaztunk. A kontroll miogén tónus felvétele után, a gátlószerekkel a korábban ismertett dózisokban és időtartalomban inkubáltuk a kis vénákat. Ezt követően ismételt megvizsgáltuk az intraluminális nyomás 1-12 Hgmm közötti lépcsőzetes emelésére bekövetkezett vazomotoros válaszokat. Regisztráltuk a gátlószer hatására megváltozott miogén-tónust.

5.3.4. Arachidonsav és H₂O₂ direkt vazóaktív hatásának vizsgálata

Különböző kísérletsorozatokban megvizsgáltuk az arachidonsav és a H₂O₂ direkt vazóaktív hatását. Az extraluminálisan alkalmazott arachidonsav és H₂O₂ emelkedő dózisainak koncentráció-dependens hatását vizsgáltuk gátlószer alkalmazása nélkül és gátlószer (INDO, SQ) jelenlétében a kis vénák miogén tónusának szabályozásában.

5.4. Statisztikai módszerek

A kapott vazóaktív válaszok értékelése során a maximális átmérőbeli változást vettük figyelembe. A dolgozatban ismertett eredményeket a valós μ m-ben mért érátmérő értékében, illetve a maximális passzív érátmérőhöz viszonyított %-ban kifejezve adtuk meg. Statisztikai vizsgálatainkat kétváltozós variancia-analízissel (ANOVA) végeztük, Bonferroni post-hoc tesztet alkalmaztunk, szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Miogén tónus kialakulása a kis vénákon

Kísérleteinket az izolált, kanülált vázizom venulákon a korábban ismertetett nyugalmi körülmények között történő inkubációjával kezdtük. Ez alatt az idő alatt mellőztük bármely vasoaktív ágens alkalmazását. A ~90 perces inkubáció alatt vizsgáltuk a spontán kialakuló érátmérő változásokat.

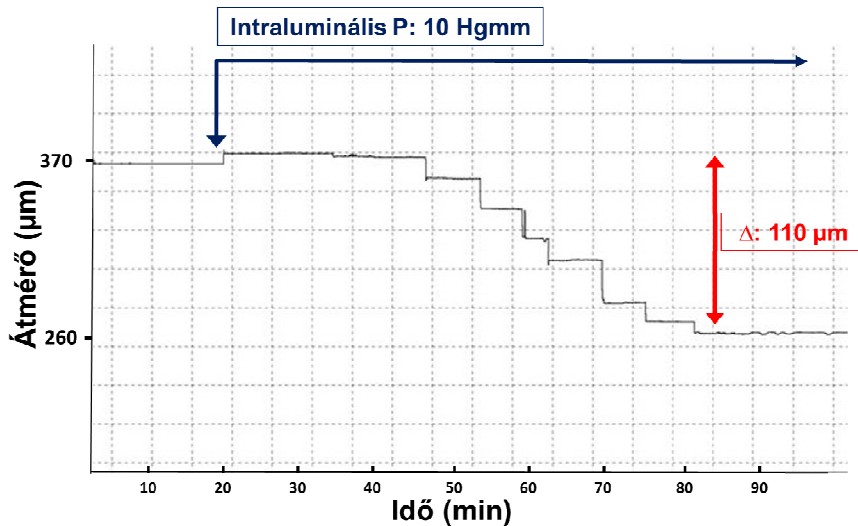
A 6. ábrán egy eredeti regisztrátum látható, amely megmutatja az inkubációs idő alatt kapott vazomotoros válaszok jellegét.

A nyugalmi kondíciók elérése után az intraluminális nyomást 10 Hgmm-re állítottuk be, és az inkubáció alatt ezen az értéken tartottuk. Számos kísérletünkben az inkubációs periódus kezdetén az intraluminális nyomás 20 Hgmm-re emeltük. Vizsgáltuk, hogy az intraluminális nyomás emelése okoz-e további vazokonstriktív választ.

A 7. ábrán látható, hogy az inkubáció ideje alatt, állandó intraluminális nyomás mellett jelentős spontán konstrikciós válasz jött létre, mindkét nyomásérték mellett.

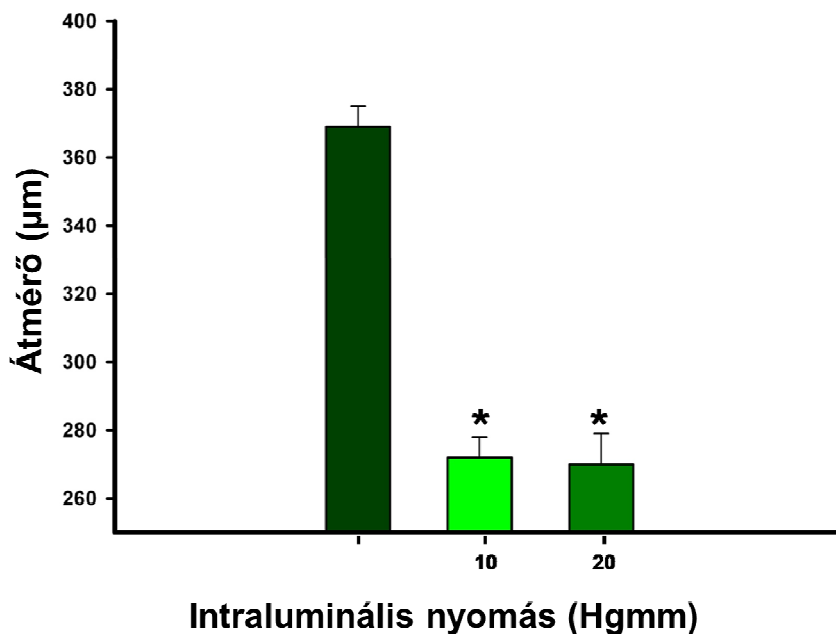
A 20 Hgmm-es intraluminális nyomás nem fokozta a venula konstrikcióját, ezért további kísérleteinkben 10 Hgmm-es nyomáson inkubáltunk, mely megfelel a kísérleti állatokban *in vivo* jelen lévő nyomásnak. Az érátmérő folyamatosan szűkült, melyet a mikroangiométeren követve jellegzetes konstrikciós görbét kaptunk minden inkubáció során (6. ábra).

A konstrikciós görbe lépcsőzetes jellegének mérés technikai oka van: a mikroangiométer nem automatizált műszer, az érátmérőváltozások regisztrálása során a mikroangiométer csavart manuálisan állítottuk be az átmérő változásának megfelelően.



6. ábra: *Izolált venula miogén tónusának kialakulása 10 Hgmm-es intraluminális nyomás hatására*

Eredeti regisztrátum. Minden kísérlet első szakaszában nyugalmi körülmények között 90 percig inkubáltuk az ereket. Ez alatt az idő alatt spontán miogén tónus alakult ki. Az x tengely az időt, az y tengely az érátmérőt mutatja, μm-ben.

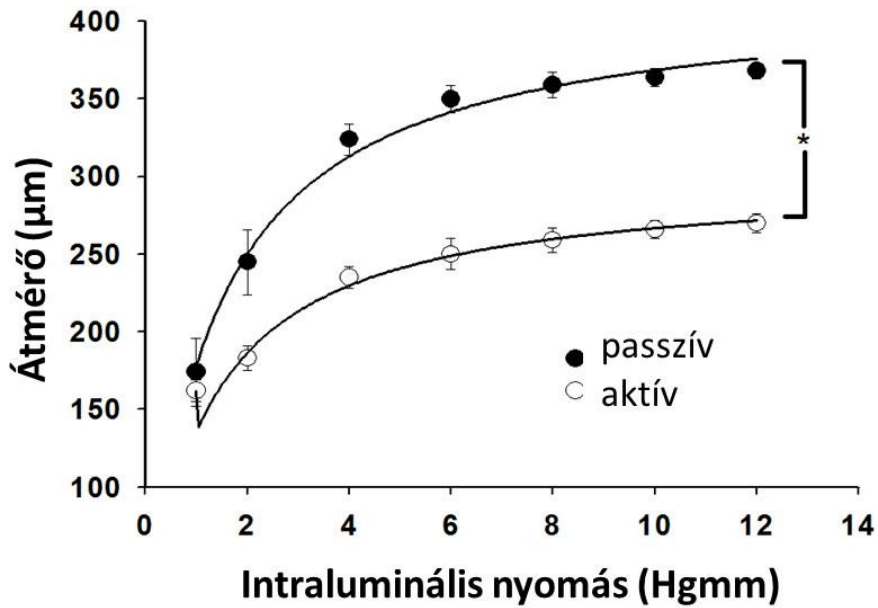


7. ábra: *Az intraluminális nyomás hatása a kis vénák átmérőjére*

Az oszlopdiagram a spontán miogén tónus során kialakult érátmérő értékeket szemlélteti, μm-ben. A passzív érátmérőhöz képest szignifikáns különbséget észleltünk az értónusban 10 Hgmm-es intraluminális nyomás mellett. A miogén tónus megtartott maradt, de nem fokozódott tovább, ha az intraluminális nyomást 20 Hgmm-re emeltük (n=12, * p < 0.05).

Kísérleteinkben azonos méretű venulákat használtunk, a kezdeti $370 \pm 12\mu\text{m}$ -es passzív átmérőről az inkubáció ideje alatt $260 \pm 19\mu\text{m}$ -es aktív (nyugalmi) átmérőre szűkültek be a kis vénák. Az így elért érátmérő, mely megfelel a vizsgált ér spontán miogén tónusának, a kísérletek során folyamatosan megtartott maradt. Az így kialakult értónust aktív érátmérőnek, ún. bazális értónusnak nevezzük. A jelenség pedig, hogy az intraluminális nyomás jelenlétére vazokonstrikciónal válaszol az ér, az az aktív nyomás-indukálta miogén válasz.

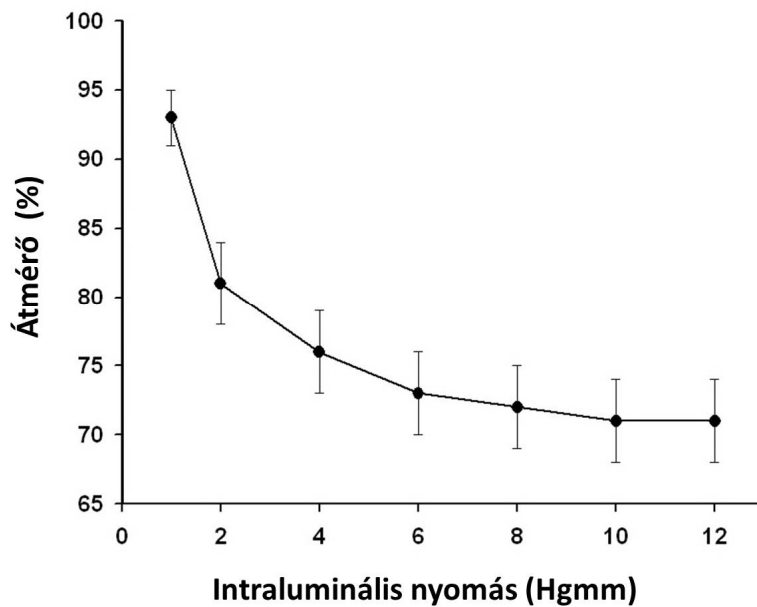
Megvizsgáltuk, hogy a kapott miogén tónust, hogyan befolyásolja az intraluminális nyomás magasabb értékre emelése, azaz milyen magas nyomásérték mellett marad intakt a miogén válasz. A 7. ábrán bemutatott 20 Hgmm-es nyomásérték fiziológiásan ezekben az erekben vélhetően csak ritkán fordul elő. Ebből az eredményből arra következtettünk, hogy a 10 Hgmm mellett fennálló miogén tónus egy stabil, jelentős miogén válasz. A 8/a. és 8/b. ábra mutatja az intraluminális nyomás emelésének hatását a miogén válaszra. Az intraluminális nyomás emelésére aktív miogén választ kaptunk. A 6-10 Hgmm-es nyomástartományban volt legerősebb a miogén válasz jellege. Ezen a nyomástartományon az ér nem tágult passzív csökként. A vénafal szerkezeti gyengesége miatt a compliance-t kihasználva spontán miogén tónus hiányában passzív kitágulást észleltünk volna. Ezt láthatjuk a 8/a. és 8/b. ábrákon a görbék alacsony nyomástartományú szakaszain. A 8/a. ábrán összehasonlítottuk a kísérlet végén Ca^{2+} mentes Krebs oldatban és papaverin hatásában felvett érátmérő-változásokat a kontroll-erekéhez képest. A 8/b. ábrán látható az érátmérő százalékos változása a passzív érátmérőhöz képest. A spontán miogén tónus kialakulása megközelítőleg 30%-kal csökkenti az érátmérőt.



8. ábra: Az intraluminális nyomás hatása a kis vénák átmérőjére

a. Az intraluminális nyomás lépcsőzetes emelésének hatására spontán miogén tónus alakul ki. Az érátmérő változásokat kontroll és passzív körülmények között vizsgáltuk.

($n=12$, $*p < 0.05$)

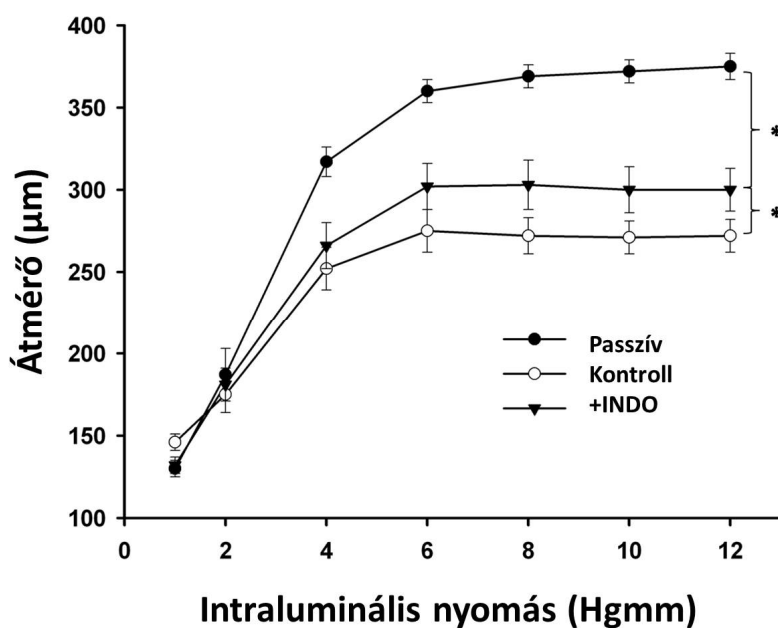


b. Az intraluminális nyomás emelésének hatására létrejövő spontán miogén tónust a passzív érátmérőhöz viszonyítva %-os változásokban adtuk meg. 100%-nak a maximális passzív érátmérőt tekintettük. ($n=12$, $*p < 0.05$).

6.2. Indometacin hatása a kis vénák miogén tónusára

A miogén tónus felvétele után vizsgáltuk az intraluminális nyomás 1-12 Hgmm-es lépcsőzetes emelésére kapott vazomotor válaszokat és vizsgáltuk a hatásmechanizmust. Az eredményeket a 9-10-11. ábrák szemléltetik. Kontroll körülmények között az intraluminális nyomás emelésére jelentős spontán miogén tónus alakult ki a kis vénákban. Megvizsgáltuk, hogy INDO jelenléte hogyan befolyásolja a miogén választ. A 9. ábrán látható, hogy INDO szignifikáns mértékben csökkentette az intraluminális nyomás hatására kialakuló miogén értónust. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a miogén válasz kialakulásában COX-enzim származású konstriktor faktorok játszanak szerepet.

Az ábrán látható még a passzív nyomásgörbe is, melyet minden kísérlet végén Ca^{2+} mentes sóoldatban és Ca^{2+} csatornablokkoló jelenlétében vettünk fel.

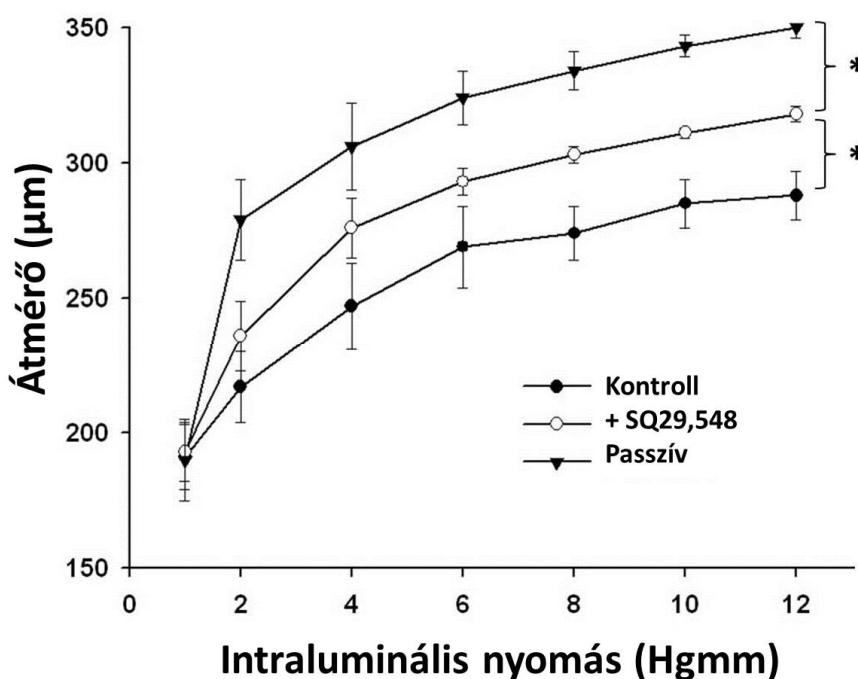


9. ábra: Indometacin hatása a kis vénák miogén tónusára

A lépcsőzetesen növekvő intraluminális nyomás hatására spontán miogén tónus alakult ki (kontroll). Indometacin jelenlétében szignifikánsan csökkent az intraluminális nyomás emelésére adott miogén válasz. A passzív átmérőt Ca^{2+} -mentes oldatban, Ca^{2+} csatornablokkoló jelenlétében regisztráltuk. Az érátmérőket μm -ben mérve adtuk meg. ($n=4$, $* p < 0.05$)

6.3. SQ 29,548 hatása a kis vénák miogén tónusára

Az INDO-val végzett kísérleteink alapján feltételeztük, hogy a COX származású konstriktorok, a TXA₂/PGH₂ szerepet játszanak a miogén válasz mediálásában. Ezért megvizsgáltuk az SQ 29,548 hatását a vazomotor válaszra. Az SQ 29,548 a TXA₂/PGH₂ receptorának, a TP receptornak a specifikus blokkolója. A 10. ábrán láthatóak az eredmények. Kontroll körülmények között az intraluminális nyomás hatására kialakult a miogén tónus, melyet SQ előkezelés és jelenlét szignifikáns mértékben csökkentett. Ez az ábra is szemlélteti a kísérletek végén felvett passzív nyomás görbét.

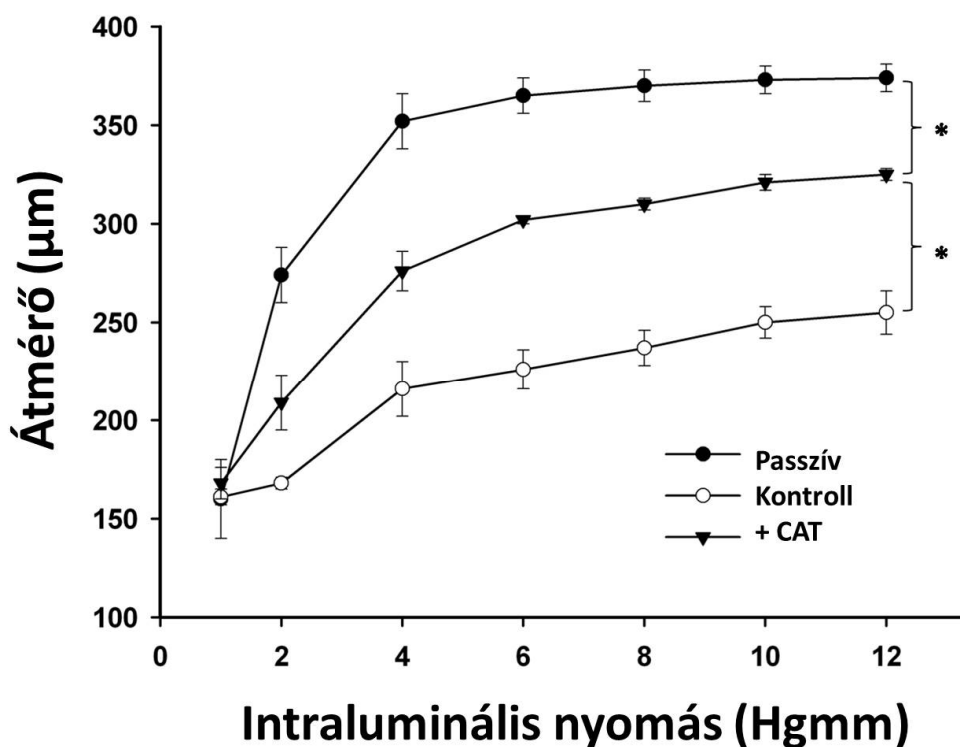


10. ábra: SQ 29,548 hatása a kis vénák miogén tónusára

A lépcsőzetesen növekvő intraluminális nyomás hatására spontán miogén tónus alakult ki (kontroll). SQ 29,548 jelenlétében szignifikánsan csökkent az intraluminális nyomás emelésére adott miogén válasz. A passzív átmérőt Ca²⁺-mentes oldatban, Ca²⁺ csatornablokkoló jelenlétében regisztráltuk. Az ér átmérőket µm-ben mérve adtuk meg. (n=5, * p < 0.05)

6.4. Kataláz hatása a kis vénák miogén tónusára

Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy H_2O_2 -nak szerepe lehet a vazomotoros válaszok szabályozásában mikroerekben. Ezért megvizsgáltuk, hogy a kataláznak (CAT), mely a H_2O_2 -t metabolizáló enzim, milyen hatása van a kis vénák miogén tónusára. Az eredmények a 11. ábrán láthatók. A kontroll körülmények között kialakult miogén tónust a kataláz enzimmel történő előkezelés szignifikáns mértékben és jelentősebben csökkentette, mint az INDO, vagy az SQ 29,548. Látható az ábrán a passzív nyomás-görbe is.



11. ábra: Kataláz hatása a kis vénák miogén tónusára

A lépcsőzetesen növekvő intraluminális nyomás hatására spontán miogén tónus alakult ki (kontroll). Kataláz jelenlétében szignifikánsan csökkent az intraluminális nyomás emelésére adott miogén válasz. A passzív átmérőt Ca^{2+} -mentes oldatban, Ca^{2+} csatornablokkoló jelenlétében regisztráltuk. Az ér átmérőket μm -ben mérve adtuk meg.

($n=4$, * $p < 0.05$).

6.5. Arachidonsav direkt vasoaktív hatása a kis vénákon

Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy az arachidonsav milyen vasoaktív válaszokat vált ki venulákon.

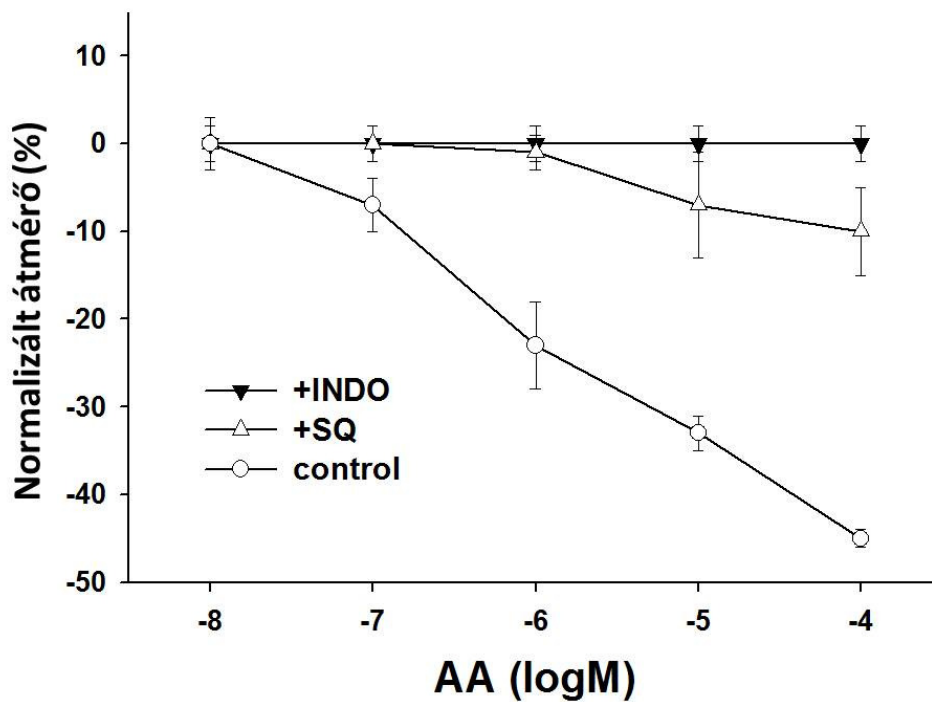
Az arachidonsav emelkedő koncentrációit extraluminálisan jutattuk az érkamrába. Az emelkedő dózisok hozzáadása között az érkamrát Krebs oldattal átmostuk. A 12. ábra szemlélteti az eredményeket.

Az arachidonsav emelkedő dózisa igen jelentős konstriktív választ váltottak ki a kis vénákon. A konstriktív válasz mértéke a hozzáadott arachidonsav koncentrációjának emelésével fokozódott.

Vizsgáltuk az arachidonsav okozta válaszokat INDO és SQ 29,548 előkezelés után is, külön-külön kísérletsorozatokban. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az INDO, mind az SQ 29,548 csökkentette, illetve az INDO teljesen megszüntette az arachidonsav okozta konstriktívot.

Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy arachidonsavból az érfali enzimátikus folyamatok *in vitro* nagyobb mennyiségben termelnek konstriktor- ($\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$), mint dilatátor faktorokat.

A 12. ábrán látható az is, hogy a bazális értónushoz képest mindkét gátlószer jelenlétében jelentős vazodilatáció is kialakult, ami a konstriktor faktorok gátlása után a dilatátor faktorok fokozott termelésére és túlsúlyára utal.



12. ábra: Arachidonsav hatása a kis vénák miogén tónusára, indometacin és SQ 29,548 hatása az arachidonsav okozta vazomotor válaszra

Arachidonsav adása (10^{-4} - 10^{-7} M) dózis-dependens konstriktiót okozott kis vénákban, ez a vazoaktív válasz a TP receptor gátlásakor (SQ 29,548) szignifikáns mértékben csökkent. Indometacin adása megszüntette az arachidonsav okozta vazokonstriktiót.

Az érátmérő változásokat a nyugalmi értónushoz viszonyított százalékos eltérésben ábrázoltuk. A nyugalmi értónust a szaggatott vonal jelöli. (n=4/csoport, *p < 0.05)

6.6. H₂O₂ direkt vazoaktív hatása a kis vénákon

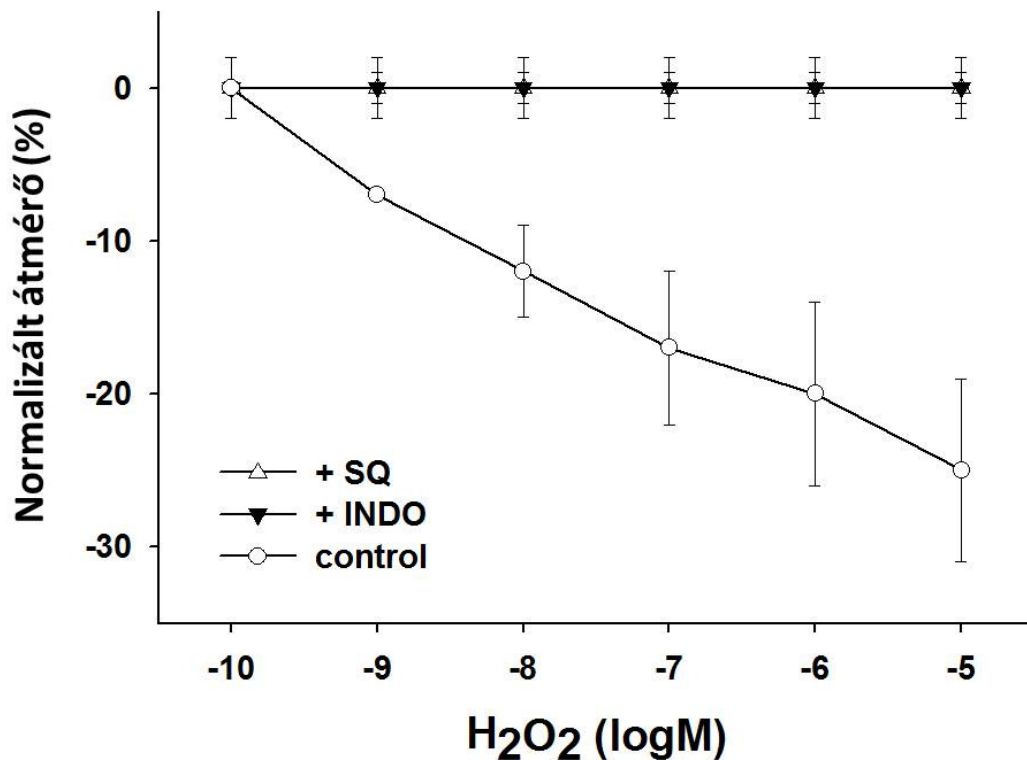
H₂O₂ közvetlen vazoaktív hatását a kis vénák tónusára a H₂O₂ extraluminálisan hozzáadott emelkedő koncentrációival vizsgáltuk.

Az eredményeket a 13. ábra szemlélteti.

Az alkalmazott koncentrációk megfelelnek a mikroerek környezetében fiziológiásan is jelen levő H₂O₂ koncentrációknak [46]. A H₂O₂ emelkedő dózisa jelentős koncentráció-dependens konstriktiót hoztak létre.

Feltételeztük, hogy a H₂O₂ okozta konstriktióban a konstriktor prosztaglandinok szerepet játszanak, ezért vizsgáltuk a H₂O₂ okozta válaszokat INDO és SQ jelenlétében is külön kísérletsorozatban.

A 13. ábrán szintén látható, hogy a H₂O₂ okozta konstriktív válasz mind INDO, mind SQ előkezelés után elmaradt. A bazális értónushoz képest az SQ alkalmazását követően jelentős vazodilatációt is kaptunk, mely az erőteljes konstriktor TXA₂/PGH₂ gátlását követően a túlsúlyba kerülő dilatátor faktorok szintjének emelkedésére utal.



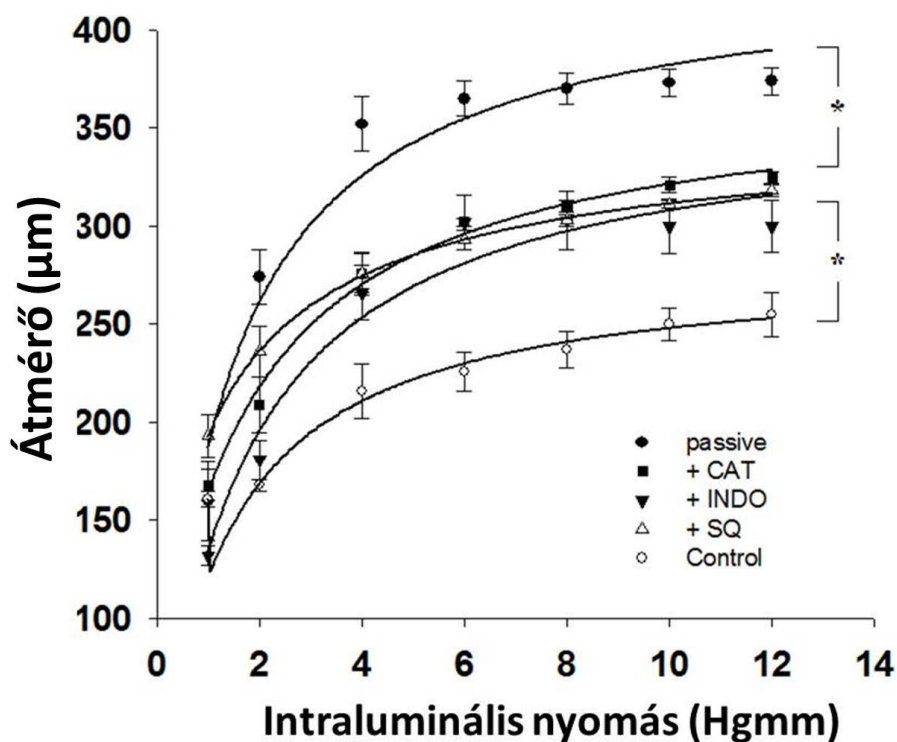
13. ábra: H₂O₂ hatása a kis vénák miogén tónusára, indometacin és SQ 29,548 hatása a H₂O₂ okozta vazomotor válaszra

H₂O₂ adása dózis dependens (10⁻⁹-10⁻⁵M) konstriktiót okozott kis vénákban, ez a vazoaktív válasz a TP receptor gátlásakor (SQ 29,548) megszűnt. Indometacin adása gátolta a H₂O₂ okozta vazokonstriktiót. Az érátmérő változásokat a nyugalmi értónushoz viszonyított százalékos eltérésben ábrázoltuk. A nyugalmi értónust a szaggatott vonal jelöli. (n=6/csoport, * p < 0.05).

6.7. Összefoglaló eredmények

A miogén tónus kialakulását, és a tónus, különböző vazoaktív ágensek hatására bekövetkező változásait, a 14. ábra szemlélteti. Az ábra bemutatja az arachidonsavval és H_2O_2 -al végzett kísérletek eredményeit is.

A nyugalmi értónushoz viszonyított elmozdulást μm -ben kifejezve számszerűen foglaltam össze az eredményeket, szemléltetve az érátmérő változások mértékét.



14. ábra: Összefoglaló eredmények a miogén tónus változásairól

Összefoglaló ábra a miogén-tónus modulálásáról gátlószerekkel, valamint H_2O_2 és arachidonsav hatása az értónusra kontroll körülmények között és gátlószerek jelenlétében. Az érátmérő változások μm -ben ábrázolva.

7. MEGBESZÉLÉS

Saját új megfigyeléseink:

- A lépcsőzetesen emelt intraluminális nyomás (1-12 Hgmm) miogén választ hozott létre izolált vázizom venulákban [10]. Új eredményeink szerint a miogén válasz részben a konstriktor prosztaglandinok által mediált, mivel COX gátlás (indometacin) szignifikánsan csökkentette a miogén tónust. A TP receptor gátlása a spontán miogén tónus kialakulását szignifikáns mértékben csökkentette, ezért arra következtetünk, hogy a miogén választ a TXA₂/PGH₂ közvetíti. Kataláz hozzáadása szignifikánsan csökkentette a nyomás indukálta miogén tónust, ezért a mediátorok között a H₂O₂ is kiemelt jelentőségű. Összefoglalva: a vázizom venulákban az intraluminális nyomás-indukálta fali feszülés, H₂O₂ felszabadulását okozza, ami beindítja az arachidonsav metabolizmusát, ez pedig konstriktor prosztaglandinok (TXA₂/PGH₂) termelődéséhez és így konstrikciónhoz vezet.
- A H₂O₂ önmagában is hat az izolált vázizom venulák átmérőjére. A kis vénák átmérője koncentrációfüggően csökken a H₂O₂ (10⁻⁹ - 10⁻⁵ M) emelkedő dózisainak hatására. A mechanizmust az endotheliális és simaizom-függő TXA₂/PGH₂ elválasztás közvetíti, mivel a COX gátlás (indometacin) és a TP receptor blokkolása (SQ 29,548) szignifikáns mértékben csökkentette a H₂O₂ okozta miogén választ.
- Arachidonsav adása (10⁻⁷ – 10⁻⁴M) szintén koncentrációfüggő átmérő csökkenést hozott létre, melyet a COX gátló indometacin és a TXA₂ receptor gátló SQ 29,548 szignifikáns mértékben gátolt. Tehát eredményeink alapján arra következtetünk, hogy az arachidonsav vazokonstriktív hatását a konstriktor prosztaglandinok, a TXA₂/PGH₂ közvetíti.

Korábbi közleményekben feltételezték, hogy az egyéb sejtek (pl. fehérvérsejtek) által termelt H₂O₂ hatással van az értónusra. Eddig azonban nem közöltek eredményeket a H₂O₂-nak a vázizom venulákra gyakorolt direkt hatásáról. Eredményeink az elsők az irodalomban, melyek részletesen feltárták a kis vénák spontán miogén működéséért felelős sejtszintű hatásmechanizmusokat.

7.1. Miogén válasz a kis vénákban

Az inkubációs periódusban nyugalmi körülmények között, vazóaktív ágens alkalmazása nélkül jelentős spontán miogén válasz alakult ki a venulákban. Korábban az irodalmi adatok nem írták le egyértelműen, hogy arteriolákhoz hasonlóan kis vénákban is működik a nyomás indukálta miogén autoreguláció jelensége.

Kísérleteink alapján egyértelműen állítható, hogy kis vénákban jelentős nyomás érzékeny miogén válasz alakul ki. A miogén válasz jelenléte vénákban a keringési rendszer működése szempontjából meghatározó lehet. A posztkapilláris ellenállás szabályozásával a venulák tónusa nagymértékben befolyásolja a mikrocirkulációban uralkodó nyomásviszonyokat és a mikrocirkuláció működését. Emellett a miogén válasz meghatározza a lokális vénás keringést is.

A miogénválasz-indukálta véráramlási viszonyok megváltozása számos reológiai, hemodinamikai és egyéb speciális funkciókat, pl. a fvs-ek extravazatióját befolyásolhatja a kis vénákban. Továbbá a vázizom venulák tónusa befolyásolja a vénás kapacitancia funkció működését is, mely a preload szabályozásán keresztül hat a szív bal kamra funkciójára is. Ez a funkció krónikus betegekben kiemelt jelentőségű lehet. Diabetes mellitusban szenvedő, hipertóniás krónikus szívelégtelen betegekben a ROS-ok (így a H_2O_2) szerepe is fontos a betegség progressiójában.

Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy mely faktorok felelősek a kis vénákban létrejövő miogén válasz kialakulásáért. Korábbi vizsgálatok alapján feltételeztük, hogy mind a H_2O_2 -nak és a konstriktor prosztaglandinoknak is szerepe lehet a nyomás-indukálta miogén tónus kialakulásában [63, 64]. Kísérleteink során feltevéseink igaznak bizonyultak. A COX enzim származású konstriktor faktorok gátlása, illetve a TP receptor gátlása csökkentette a nyomás indukálta miogén válasz mértékét. A COX származású konstriktor faktorok forrása a mikroerekben egyaránt lehet az endothelium és az érfali simaizom is. Kataláz enzim szintén csökkentette a miogén tónus mértékét, ami a H_2O_2 szerepére utal a vénák miogén tónusának kialakulásában. Saját eredményeink rámutatnak a korábban nem jellemzett miogén autoreguláció mechanizmusára vénákban, melynek fő mediátorai a COX származású konstriktor prosztaglandinok és a H_2O_2 .

A konstriktor prosztaglandinok miogén válaszban betöltött szerepét bizonyítja az is, hogy az arachidonsav jelentős konstriktiót okozott kis vénákon. Az extraluminálisan hozzáadott arachidonsav okozta konstriktióért az arachidonsavból rapidan termelődő

konstriktor faktorok felelősek, hiszen a konstriktív választ COX gátló és TP receptor blokkoló megszüntette. Természetesen a szervezetben fiziológiai körülmények között ezek a reakciók számos egyéb szabályozó mechanizmustól függenek. Kísérleteink során az ereket megfosztjuk a szervezetben jelen levő neurális, metabolikus és humorális szabályozó mechanizmusok hatásától. Emellett az erekben a vér viszkozitásától jelentősen különböző viszkozitású folyadékot áramoltatunk. Ezért kísérleteinkben kizárólag az endothelium és vaszkuláris simaizom közvetlen választ, vazóaktív faktorok azonnali termelését, azok hatását tudtuk vizsgálni az általunk alkalmazott vazóaktív ágensekre. Az arachidonsav metabolizmusát és a különböző enzimek működését is a szervezetben számos metabolikus, neurális, humorális, hormonális hatás befolyásolja. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az izolált kis vénákban kialakuló nyomás érzékeny válaszáért az érfalban termelődő konstriktor prosztaglandinok és a H_2O_2 felelősek.

7.2. H_2O_2 vazomotor hatása kis vénákban

Eltérő irodalmi adatok vannak a H_2O_2 hatásáról a mikroerek vazomotoros működésével kapcsolatban. Kísérleteink során patkány gracilis izomból izolált kis vénákon vizsgáltuk az extraluminálisan hozzáadott H_2O_2 hatását a miogén tónusra. Eredményeink alapján a H_2O_2 jelentős vazokonstriktor hatással rendelkezik a kis vénákon.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban az arteriolákon H_2O_2 hatására bifázisos válasz jött létre, ezt a koncentrációtól függő bifázisos választ kis vénákon nem tapasztaltuk. A H_2O_2 okozta konstriktív választ a COX gátló indometacin és a TP receptor blokkoló SQ is megszüntette. Kísérleteinkben az endothelium és az ér simaizom épségét minden esetben ellenőriztük. A H_2O_2 okozta konstriktor válaszok feltehetően az endotheliumból és simaizomból is származó konstriktor faktoroknak tulajdoníthatóak. Érdekes, hogy korábbi tanulmányok az izolált vázizom arteriolákban a H_2O_2 bifázisos hatását írták le az érátmérőre [47].

Az alacsonyabb H_2O_2 koncentrációk konstriktív választ okoztak arteriolákban, míg a magasabbak dilatációt okoztak. Ezzel szemben, a vénulákon a H_2O_2 magasabb és alacsonyabb koncentrációi is konstriktív választ okoztak. Ennek oka feltehetően az, hogy a H_2O_2 más jelátviteli utakat aktivál a vénulák és arteriolák intracelluláris enzim-rendszerében.

A vénulákban létrejövő konstriktív válasz, előrefelé (anterograd) segítheti a vénás visszaáramlást, míg visszafelé (retrograd) emelheti a kapilláris hidrosztatikai nyomást, ami

kedvez a folyadék-kiáramlásnak az érpályából. Lokális gyulladáshoz vezető reakció során a gyulladáshoz vezető szövetből és az aktivált leukocitákból felszabaduló H_2O_2 jelentős konstriktív hatást hozhat létre kis vénákban, ami az áramlás csökkentésével kedvez a további leukociták diapedézisének, valamint az ödéma képződésnek a mikrocirkulációban.

A magasabb koncentrációjú H_2O_2 (10^{-6} - 3×10^{-5} M) által okozott fokozott konstriktív mechanizmus patológiás reakcióként írható le. Ezen szintű H_2O_2 koncentrációk jelen lehetnek a vaszkuláris rendszert érintő kórállapotokban, atherosclerosisban, diabetes mellitusban, hipertóniában, hiperhomociszteinemiában, mind az artériás mind a vénásoldalon [156]. A H_2O_2 emelkedett szintje a keringésben a mikroerek vazokonstriktív hatását és a mikrocirkuláció diszfunkcióját váltja ki. Mint említettük, a H_2O_2 magasabb koncentrációi (6×10^{-5} - 3×10^{-4} M) arteriolákban vazodilatációt hoztak létre. Ezek a magasabb koncentrációk lokális fokozott oxidatív mechanizmusok során képződhetnek és a vazodilatáció célja a fokozott vérellátási igény biztosítása lehet.

További vizsgálatok tárgyát képezheti az aktivált leukociták intraluminális beadását követő vazóaktív válaszok vizsgálata izolált kis vénákban, mivel tudott, hogy a leukociták aktiválásuk során nagy mennyiségű reaktív oxigén tartalmú molekulát termelnek, így többek között H_2O_2 -t is [157].

7.3. A H_2O_2 által indukált intracelluláris vazomotor jelutak

A H_2O_2 által beindított intracelluláris jelutak egy részét a saját és mások vizsgálatai már kiderítették, de számos lépés még feltáratlan. Az egyik legfontosabb annak a pontos tisztázása mellyel a H_2O_2 fokozza az érfalban a konstriktor prosztaglandinok termelődését.

Korábbi adatok utalnak rá, hogy H_2O_2 rapidan aktiválja a COX enzimet, ami H_2O_2 hatására főként PGG_2 -t, PGH_2 -t és peroxidokat termel. A peroxidok elősegítik az hatásos vazokonstriktor TXA_2 termelődését. Nem ismertek viszont azok a jelátviteli útvonalak, melyeken keresztül a H_2O_2 a COX enzim aktiválását és az erős vazokonstriktor hatását kiváltja. Feltehetően több, szubcelluláris jelátviteli útvonal érzékeny H_2O_2 -ra, illetve a H_2O_2 számos jelátviteli útvonalat aktiválhat, melyek eredményeként a kis vénákban vazokonstriktív hatások jönnek létre.

A kísérleteinkben alkalmazott H_2O_2 koncentrációk megegyeznek a fiziológián is jelen levő koncentrációkkal, azonban a pontos koncentráció, mellyel konstriktor hatását a

H₂O₂ kifejti, nem adható meg. Az érfalban jelen levő és funkcionáló kataláz enzim *in vitro* is gyorsan elbonthatja a H₂O₂-t; továbbá az endothel sejtek is folyamatosan termelnek H₂O₂-t.

Legújabb kísérletek tovább tisztázták az arterioláris endotheliumban lejátszódó folyamatokat, melyek konstriktor prosztaglandinok termelődéséhez vezetnek [158]. Úgy tűnik, hogy a H₂O₂ aktiválja a Src kinázt, amely tovább aktiválja a phospholipáz C-t (PLC), protein kinázt (PKC), mely aztán aktiválja a phospholipáz A-t (PLA) a diacilglicerol jelúton keresztül. Végül ez az arachidonsav felszabadulásához és a COX aktiválásán keresztül a TXA₂ termelődéséhez vezet. A TXA₂ az endotheliumból felszabadulva a simaizom TP receptorokon keresztül beindítja a simaizomban azokat a folyamatokat, amelyek az intracelluláris Ca²⁺ szenzitivitás növekedéséhez majd a következményes konstriktióhoz vezetnek [159; 160]. Feltehetően hasonló folyamatok játszódnak le a kis vénák falában is.

7.4. A vénás erekben kialakuló oxidatív stressz ér- és a plasztikai sebészeti aspektusai

7.4.1. A H₂O₂ akut hatásai

Mint azt a bevezetőben említettük, az I/R erősen befolyásolja az izomlebenyek túlélését a rekonstrukciós sebészetben, mégis limitált ismeretekkel rendelkezünk a lebenyek haemorrheológiai paramétereivel és az oxidatív stressz markerekkel kapcsolatban. Gyulladásos szövetekben, szöveti- és érsérülés során megemelkedik a lokális ROS és H₂O₂ szint. H₂O₂-t rutinszerűen alkalmazunk plasztikai sebészetben az antiszeptikus tulajdonságai miatt.

Korábbi kísérletes-sebészeti [2] tanulmány során vizsgáltuk az I/R változásokat beagle kutyák latissimus dorsi (LDM) izomlebenyén. Ezekben a vizsgálatokban négy kutya kétoldali LDM lebenyének kipreparálását követően az egyik oldali lebenyen 60 percig iszkémiát alkalmaztunk az érnél leztorításával. A leztorítást követően 60 perc reperfüzió követett. Kontrollként az ellenoldali kipreparált izomlebenyt használtuk. Szövettani vizsgálatok céljából izombiopszia történt az I/R előtt és után.

A biopsziás mintákból vizsgáltuk az oxidatív stressz mértékét. Glutation peroxidáz aktivitást mértünk, továbbá vizsgáltuk a glutation, karbonil és tiobarbiturát sav reaktív szubsztrátok koncentrációját. A felsorolt vizsgálatok a szöveti oxidatív stressz markerei.

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy reperfúzió során emelkedik a szöveti oxidatív stressz mértéke. Egyórás iszkémia és reperfúziót követően a LDM lebe nyen a leukocita eloszlás és az eritrocita aggregáció lokális változásai jelentkeztek, metabolikus és inflammatorikus reakciókat feltételezve. Oxidatív károsodás a reperfúzió alatt szintén kimutatható volt.

Ezek a röviden bemutatott korábbi eredményeink modellezik egy plasztikai műtét során létrejövő változásokat a ROS-ok szempontjából. Eddig az irodalomban nem volt adat arra, hogy ezek az oxidatív mechanizmusok, hogyan hatnak a kis vénák miogén működésére.

További kérdéseket vet fel a H₂O₂ rutinszerű használata. Új eredményeink szerint az H₂O₂ szignifikáns mértékben emeli a vázizom kis vénák miogén tónusát, ezáltal fontos szerepe van a mikrocirkuláció működésében és a sebgyógyulásban.

További preklinikai/klinikai vizsgálatok szükségesek, melyek eldöntik, hogy a H₂O₂ antiszeptikus hatásai több előnyt jelentenek-e, mint az esetleges kedvezőtlen hatások a mikroerek működésében. A hatásos és biztonságos dóziszról sincsenek egyértelmű ajánlások.

7.4.2. A H₂O₂ krónikus hatásai

Jelen kutatásainkban kimutattuk, hogy a magasabb intraluminális nyomás a vénás kiserekben H₂O₂ felszabaduláshoz vezet. Ez krónikus esetekben inflammatorikus faktorok termelődését indíthatja be gén-indukción keresztül [161].

Pfisterer és munkatársai összefoglalták az irodalmi adatokat és rámutattak arra, hogy a magas falfeszülés a vénás erekben csak úgy, mint az artériás erekben [162] oxidatív stresszt okoz a NADP(H) enzim aktiválása révén.

A reaktív oxigén molekulák közül elsősorban a H₂O₂ aktiválja a transzkripció faktorát aktiváló fehérjét [transcription factor activator protein-t (AP-1)], ami a matrix metalloproteinek (MMP-2 MMP-9) aktiválásán keresztül az érfal átépüléséhez, remodellinghez és a nagyobb vénás erekben varicositás kialakulásához is vezethetnek. Ennek a koncepciónak az igazolására, egy individuális vénát elzártak, hogy emeljék a hidrosztatikus nyomást a lekötéshez proximálisan elhelyezkedő vénás hálózatban

A Laplace törvénnyel egyetértésben, a megnövekedett WSS és transmuralis nyomás az érintett vénás szakaszok kitágulásához, varicosus szakaszok megjelenéséhez vezetett.

Szövetteni vizsgálat igazolta, hogy az endothel sejtekben és a környező simaizomsejtekben fokozódó MMP2 expresszió alakul ki az érintett érszakaszon. Ezt humán varicosus véna mintákban is megfigyelték.

További vizsgálatok bizonyították, hogy az AP-1 aktiválása feltétele a vénás remodelling kialakulásának. AP-1 gátlása esetén csökkent MMP2 expresszió volt megfigyelhető. A fal stressz fontosságát a vénás remodellinghez még jobban hangsúlyozza az a tény, hogy AP-1-t ROS aktiválja, (pl. H_2O_2), melynek az intracelluláris koncentrációját biomechanikai feszülés befolyásolja. WSS hatására az endothel és simaizom sejtekben megnő egyes NADPH oxidázok expressziója és aktivitása, ezáltal a ROS termelődését.

A folyamat aktivál olyan jelátviteli utakat, amik érzékenyek proteinek oxidatív változásaira.

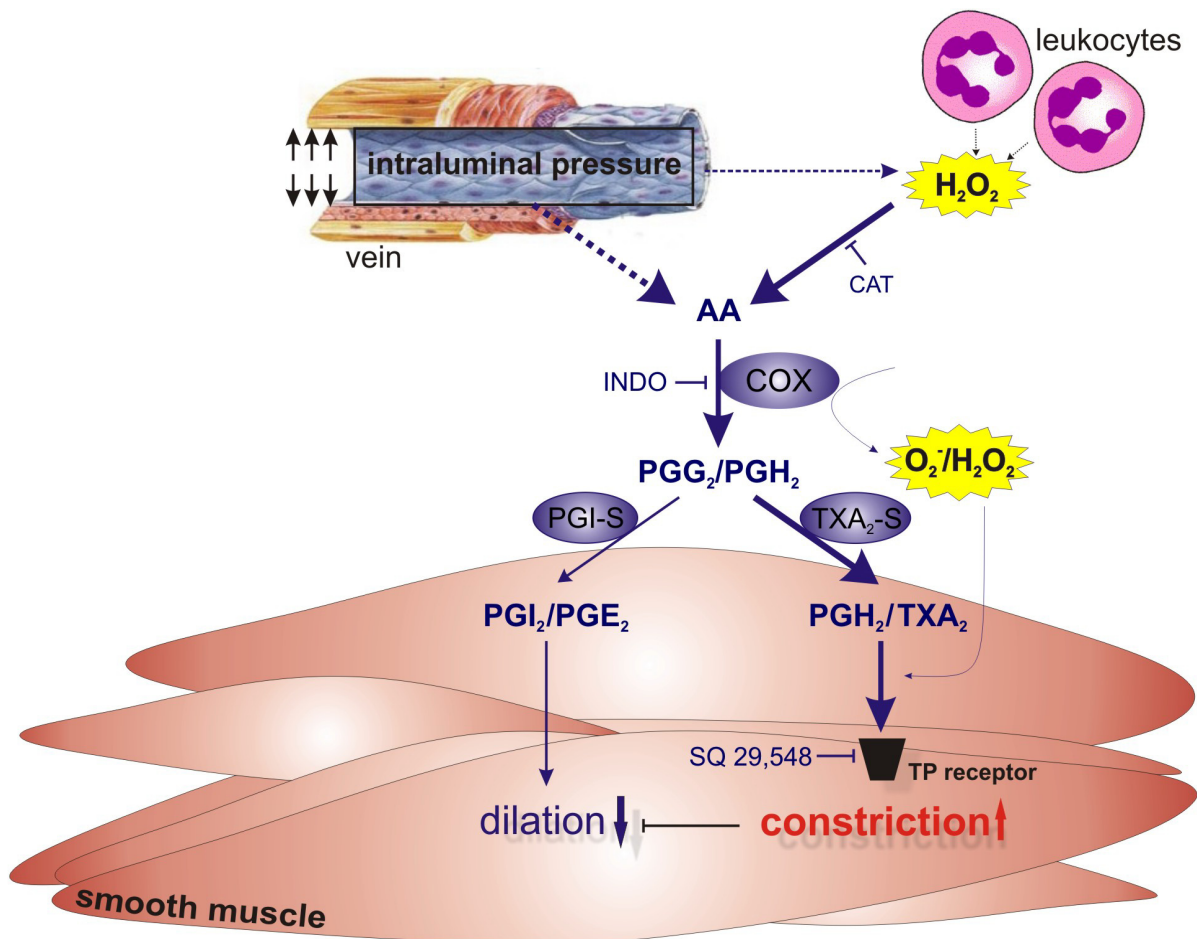
8. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink alapján, izolált patkányvázizom kis vénákban jelentős nyomás érzékeny miogén válasz mutatható ki. A miogén válasz nagyrészt konstriktor prosztaglandinok, továbbá H_2O_2 által közvetített. A H_2O_2 és az arachidonsav önmagában is befolyásolja a kis vénák átmérőjét. Tehát eredményeink alapján az oxidatív stressz mediátorai és a ROS-ok képesek megváltoztatni a kis vénák átmérőjét, ezáltal a mikrocirkuláció működését jelentősen befolyásolják.

A kis vénákban jelentős nyomás érzékeny miogén válasz alakult ki, ennek mechanizmusát eddig csak kevésbé vizsgálták. A miogén reguláció jelensége arteriolákhoz hasonlóan kis vénákban is nagyon fontos lokális áramlási viszonyokat szabályozó mechanizmus. Kis vénák miogén vazomotor működése reológiai funkciókat, a mikrocirkuláció működését és általában is a vénás keringést szabályozza. Eredményeink alapján a miogén válasz létrejöttéért a COX enzim által termelt konstriktor prosztaglandinok, a TXA_2 és PGH_2 felelősek (15. ábra) Jelen kísérleteinkben izolált vázizomvénákban is igazoltuk az oxidatív stressz és a ROS-ok hatását a miogén tónus szabályozásában.

Állatkísérletes modellben igazolódott, hogy I/R kapcsán a leukociták szintje a vénás vérben megemelkedik. Ismert továbbá, hogy az aktivált leukociták H_2O_2 -ot termelnek, melynek szöveti szintje akár mikromoláris nagyságrendet is elérhet. A H_2O_2 jelentős vasoaktív szereppel bír kis vénákon, konstriktiót hoz létre. A H_2O_2 -mediálta konstriktív válaszokat szintén a konstriktor prosztaglandinok közvetítik.

A H_2O_2 -nak szerepe van a miogén tónus kialakításában is, a konstriktor prosztaglandinok termelődésének fokozása révén. A keringési rendszert érintő különböző megbetegedésekben, valamint lokális oxidatív mechanizmusok során megemelkedő H_2O_2 termelődés az egész keringési rendszer működése szempontjából fontos vasoaktív hatásokat mediálhat.



15. ábra: Az intraluminális nyomás és a H₂O₂ okozta vazoaktív válaszok feltételezett hatásmechanizmusai

Az ábra az intraluminális nyomás indukálta miogén válaszokat és a H₂O₂ vazoaktív hatásainak feltételezett intracelluláris mechanizmusait mutatja be. Az intraluminális nyomás emelkedésének, vagy a H₂O₂-nak a hatására fokozódik az érfali konstriktor prosztaglandinok (PGH₂/TXA₂) szintézise. Arachidonsav adása szintén vazokonstriktiót okoz a PGH₂/TXA₂ útvonalon. In vivo a H₂O₂ forrásai az aktivált leukociták és makrofágok lehetnek. A H₂O₂ és a konstriktor prosztaglandinok befolyásolhatják a véráramlás reológiai paramétereit, a thrombocytá funkciókat ez által a vénás működést és a mikrocirkulációt.

(vein: véna, intraluminal pressure: intraluminális nyomás, leukocita: fehérvérsejt, smooth muscle: simaizom, dilatation: vazodilatáció, constriction: vazokonstriktció, COX: ciklooxygenáz enzim, CAT: kataláz, AA: arachidonsav, INDO: indometacin, PHG₂: prosztaglandin H₂, PGG₂: prosztaglandin G₂, PGE₂: prosztaciklin, TXA₂: tromboxán A₂, PGI-S: prosztaciklin-szintáz, TXA₂-S: tromboxán A₂-szintáz)

9. TOVÁBBI TERVEK

A jövőbeli terveink között szerepel a kis vénák spontán miogén működésével kapcsolatos ismereteink bővítése, különös tekintettel a H₂O₂ okozta hatások vizsgálatára. A H₂O₂ tekintetében preklinikai vizsgálatokat tervezünk, plasztikai sebészeti állatmodellekben. Célunk vizsgálni a H₂O₂ mikrocirkulációra és a sebgyógyulásra kifejtett hatását dózistól függően.

Részletes jövőbeni terveink:

- A dolgozatban ismertetett kísérleti protokoll elvégzése endothelium denudált ereken. Ezáltal pontos eredményeket kapnánk arról, hogy mely mechanizmusok működnek kizárólag intakt endothelium jelenlétében.
- H₂O₂ hatásának vizsgálata izolált kis vénákon hyperhomociszteinaemia *in vitro* modellezése során.
- ADMA hatásának vizsgálata kis vénák miogén tónusára (összevetve kutatócsoportunk korábbi hasonló kísérleteivel arteriolákon) [163].
- Aktivált leukociták hatásának vizsgálata kis vénák miogén tónusára: a sejtek intraluminális beadását követően vizsgálnánk a vazoaktív válaszokat.

10. ÖSSZEFOGLALÁS

A nyomás indukálta miogén válasz jól jellemzett jelenség kisartériákban és arteriolákban. Altatott állatokban végzett *in vivo* kísérletek alapján úgy feltételezték, hogy a kis vénákban és venulákban nem fejlődik ki jelentős miogén tónus. Azonban mi feltételeztük, hogy izolált kis vénákban - bár kisebb mértékben, mint az arteriolákban - miogén tónus fejlődik ki az intraluminális nyomás emelésére adott válaszként.

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a H_2O_2 bifázisos átmérőváltozásokat okoz az arteriolákon. A H_2O_2 alacsonyabb koncentrációi konstriktiót okoztak, míg a magasabb koncentrációi kezdeti konstriktiót követően dilatációt eredményeztek. A H_2O_2 hatását és szerepét a venulák vazomotor válaszainak közvetítésében mostanig nem jellemezték. Feltételeztük, hogy a H_2O_2 szerepet játszik a vázizom venulák vazomotor válaszainak szabályozásában.

Módszerek: Gracilis izom venulát hím Wistar patkányból izoláltunk, majd kanüláltuk és inkubáltuk 10 mmHg intraluminális nyomáson, $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, egy speciális szervkamrában. Az intraluminális nyomás és vazóaktív szerek hatására létrejött átmérőváltozásokat videomikroszkóp és mikroangiometer segítségével mértük.

Eredmények: Izolált patkány gracilis izom venulában az intraluminális nyomás növelésének hatására spontán miogén tónus fejlődött ki. (1-12 Hgmm). A kalkulált maximum miogén tónus $70 \pm 5\%$ volt 10 Hgmm-en. Indometacin, vagy SQ 29,548, vagy kataláz adása szignifikánsan csökkentette a nyomás-indukálta miogén tónust. Szintén észleltük, hogy a H_2O_2 (10^{-9} - 10^{-5} M) koncentrációfüggő konstriktiót eredményezett, mely indometacin, vagy SQ 29,548 adásával gátolható volt. Úgyszintén arachidonsav adása (10^{-7} - 10^{-4} M) koncentrációfüggő konstriktiót okozott, melyet indometacin, vagy SQ 29,548 adása csökkentett.

Következtetés: Megállapítjuk, hogy izolált vázizomvenulákon 1) az intraluminális nyomás emelkedése aktív miogén tónust eredményez, és 2) arachidonsav TXA_2/PGH_2 mediálta koncentrációfüggő konstriktiót okoz; 3) H_2O_2 növeli a konstriktor prosztaglandinok szintézisét, ezúton a TXA_2/PGH_2 konstriktiót eredményez, 4) valamint a H_2O_2 szerepet játszik a nyomás-indukálta miogén válasz kifejlődésében. Következtetéseink alapján a H_2O_2 fontos szerepet játszik a venulák vazomotor funkciójának szabályozásában fiziológiás és patológias körülmények között is.

10. SUMMARY

We aimed to test two hypotheses: 1) isolated small veins develop substantial myogenic tone in response to the elevation of intraluminal pressure, 2) H₂O₂ contributes to the mediation of myogenic response via activation of arachidonic acid (AA) cascade and release constrictor prostaglandins.

Methods: Small veins were isolated from gracilis muscle of male rats, then cannulated. Changes in diameter to increases in intraluminal pressure, H₂O₂, arachidonic acid in the presence and absence of various inhibitors were measured by videomicroscope and microangiometer. At the end of the experiments the passive diameter were obtained in Ca²⁺-free PSS solution.

Results: Isolated rat gracilis muscle small veins developed a substantial myogenic tone in response to increases in intraluminal pressure (1 - 12 mmHg). Calculated maximum myogenic tone was $70 \pm 5\%$ at 10 mmHg. Presence of catalase or indometacin or SQ 29,548 reduced significantly the pressure-induced myogenic response. Also, H₂O₂ (10^{-9} - 10^{-5} M) and arachidonic acid (10^{-7} - 10^{-4} M) elicited concentration dependent constrictions, which were inhibited by the presence of indometacin or SQ 29,548.

Conclusion: We propose that both myogenic response and pressure-induced release of H₂O₂ play important roles in regulating the vasomotor function of venules both in physiological and pathological conditions.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Chang EI, Mehrara BJ, Festekjian JH, Da Lio AL, Crisera CA. (2011) Vascular complications and microvascular free flap salvage: The role of thrombolytic agents. *Microsurgery*. 31(7): 505-9.
2. Tamas R, Nemeth N, Brath E, Sasvari M, Nyakas C, Debreczeni B, Miko I, Furka I. (2011) Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model *Microsurgery*. 2011. 2011 May 31. doi: 10.1002/micr.20905.
3. Rothe CF. (1983) The venous system. The physiology of the capacitance vessels. . Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1983, sect. 2, vol. 3, chapt. 13 ed. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Peripheral Circulation and Organ Blood Flow*. Vol. 3. 397-452.
4. Monos E, Contney SJ, Dornyei G, Cowley AWJr, Stekiel WJ. (1993) Hyperpolarization of in situ rat saphenous vein in response to axial stretch. *Am J Physiol*, 1993. 265(3 Pt 2): H857-61.
5. Monos E, Berczi V, Nadasy G. (1995) Local control of veins: biomechanical, metabolic, and humoral aspects. *Physiol Rev*, 75(3): 611-66.
6. Monos E. (1991) Biomechanical aspects of cardiovascular control. *Acta Biomed Ateneo Parmense*, 62(3-4): 67-78.
7. Dornyei G, Zaidi S, Kaley G, Koller A. (1995) In vitro responses of first order venules of rat gracilis muscle to perfusion pressure, flow and vasoactive agents. *Microcirculation*, Vol. 2. Number 1: 65.
8. Dornyei G, Kaley G., Koller A. (1996) Role of endothelial mediators in the regulation of venular tone of rat skeletal muscle. *Microcirculation* Vol. 3. Number 1.: 84 (M36).
9. Dörnyei G, Monos E, Kaley G, Koller A. (1996) Myogenic responses of isolated rat skeletal muscle venules: modulation by norepinephrine and endothelium. *Am J Physiol*, 271(1 Pt 2): H267-72.
10. Debreczeni B, Veresh Z, Gara E, Marki A, Racz A, Matics R, Hamar J, Koller A. (2013) Hydrogen peroxide via thromboxane A2 receptors mediates myogenic response of small skeletal muscle veins in rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. [Epub ahead of print].
11. Gross ER, LaDisa JF, Weihrauch D, Olson LE, Kress TT, Hettrick DA, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. (2003) Reactive oxygen species modulate coronary wall shear stress and endothelial function during hyperglycemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(5): H1552-9.

12. Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, Pugazhenth S, Reusch J, Kench J. (2003) Oxidative stress in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 1005: 43-54.
13. Hodgkinson AD, Bartlett T, Oates PJ, Millward BA, Demaine AG. (2003) The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*, 52(3): 846-51.
14. King GL, Loeken MR. (2004) Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol*, 122(4): 333-8.
15. Kobayashi T, Kamata K. (2002) Modulation by hydrogen peroxide of noradrenaline-induced contraction in aorta from streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur J Pharmacol*, 441(1-2): 83-9.
16. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, Utsumi H, Nawata H. (2004) Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med*, 37(1): 115-23.
17. Tsukahara H, Sekine K, Uchiyama M, Kawakami H, Hata I, Todoroki Y, Hiraoka M, Kaji M, Yorifuji T, Momoi T, Yoshihara K, Beppu M, Mayumi M. (2003) Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Res*, 54(3): 419-24.
18. West IC, (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*, 17(3): 171-80.
19. Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW, Parmer RJ. (2000) Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension*, 36(5): 878-84.
20. Rodriguez-Martinez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaíces M, Marín J. (1998) Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol*, 125(6): 1329-35.
21. Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. (1997) Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension*, 30(6): 1628-33.
22. Austin RC, Sood SK, Dorward AM, Singh G, Shaughnessy SG, Pamidi S, Outinen PA, Weitz JI. (1998) Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H₂O₂ act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J Biol Chem*, 273(46): 30808-17.
23. Blundell G, Jones BG, Rose FA, Tudball N. (1996) Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis*, 122(2): 163-72.

24. deGroot H, Littauer A. (1989) Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 6: 541-551.
25. Starkebaum G, Harlan JM. (1986) Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*, 77(4): 1370-6.
26. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. (1980) Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res*, 18(1-2): 113-21.
27. Liu X, Zweier JL. (2001) A real-time electrochemical technique for measurement of cellular hydrogen peroxide generation and consumption: evaluation in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Biol Med*, 31(7): 894-901.
28. Pizzinat N, Copin N, Vindis C, Parini A, Cambon C. (1999) Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359(5): 428-31.
29. Root RK, Metcalf JA. (1977) H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂: studies with normal and cytochalasin B-treated cells. *J Clin Invest*, 60(6): 1266-79.
30. Zweier JL, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D, Luty GA. (1994) Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. *Am J Physiol*, 266(3 Pt 1): C700-8.
31. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. (2002) Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 105(2): p. 248-58.
32. Racz IB, Illyés G, Sarkadi L, Hamar J. (1997) The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res*, 29(4): 254-63.
33. Gori T, Lisi M, Forconi S. (2006) Ischemia and reperfusion: the endothelial perspective. A radical view. *Clin Hemorheol Microcirc*, 35(1-2): 31-4.
34. Peto K, Nemeth N, Brath E, Takacs IE, Baskurt OK, Meiselman HJ, Furka I, Miko I. (2007) The effects of renal ischemia-reperfusion on hemorheological factors: preventive role of allopurinol. *Clin Hemorheol Microcirc*, 37(4): 347-58.
35. Defraigne JO, Pincemail J. (1998) Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. *Physiopathology and prevention. Acta Chir Belg*, 98(4): 176-86.
36. Kayar E, Mat F, Meiselman HJ, Baskurt OK. (2001) Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Biorheology*, 38(5-6): 405-14.

37. Nemeth N, Lesznyak T, Szokoly M, Furka I, Miko I. (2006) Allopurinol prevents erythrocyte deformability impairing but not the hematological alterations after limb ischemia-reperfusion in rats. *J Invest Surg*, 19(1): 47-56.
38. Nemeth N, Szokoly M, Acs G, Brath E, Lesznyak T, Furka I, Miko I. (2004) Systemic and regional hemorheological consequences of warm and cold hind limb ischemia-reperfusion in a canine model. *Clin Hemorheol Microcirc*, 30(2): 133-45.
39. Szokoly M, Nemeth N, Hamar J, Furka I, Miko I. (2006) Early systemic effects of hind limb ischemia-reperfusion on hemodynamics and acid-base balance in the rat. *Microsurgery*, 26(8): 585-9.
40. Monos E, Kovách AGB. (1982) Biomechanics of isolated splenic artery. In: *Cardiovascular System Dynamics. Models and Measurements.*, ed. T. Kenner, R. Busse, H. Hinghofer-Szalkay eds., Plenum Press. New York and London.
41. Monos E, Csengody J. (1980) Does hemodynamic adaptation take place in the vein grafted into an artery? *Pflugers Arch*, 384(2): 177-82.
42. Bayliss WM. (1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol*, 28(3): 220-31.
43. Molnár A, Apor AKR, Préda I, Momos E, Bérczi V, Nádasy Gy. (2008) Újabb eredmények a vénás rendszer biomechanikájának kutatásában. *Orvosi Hetilap*. 38: 1801-1809.
44. Hudetz AG, Márk G, Kovách AG, Monos E. (1980) The effect of smooth muscle activation on the mechanical properties of pig carotid arteries. *Acta Physiol Acad Sci Hung*, 56(3): 263-73.
45. Murphy RA. (1980) Mechanics of vascular smooth muscle. in *Handbook of physiology*, section 2. The cardiovascular system, A.P.S. In: D. F. Bohr, Jr. H. V. Spark Editor, Am. Physiol. Soc., Bethesda, 325-351.
46. Cseko C, Z Bagi, Koller A. (2004) Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. *J Appl Physiol*, 97(3): 1130-7.
47. Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. (1990) Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ Res.*, 66(3): 860-6.
48. Lash JM, Shoukas AA. (1991) Pressure dependence of baroreceptor-mediated vasoconstriction in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 70(6): 2551-8.
49. Ursino M, Fabbri G, Belardinelli E. (1992) A mathematical analysis of vasomotion in the peripheral vascular bed. *Cardioscience*, 3(1): 13-25.

50. Davis MJ. (1993) Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*, 264(6 Pt 2): H2168-79.
51. Daut J, Klieber HG, Cyrus S, Noack T. (1994) KATP channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovasc Res*, 28(6): 811-7.
52. Zou H, Ratz PH, Hill MA. (1995) Role of myosin phosphorylation and $[Ca^{2+}]_i$ in myogenic reactivity and arteriolar tone. *Am J Physiol*, 269(5 Pt 2): H1590-6.
53. Jones TW. Discovery that the veins of the bat's wing (which are furnished with valves) are endowed with rhythmical contractility and the onward flow of blood is accelerated by each contraction. *Phil. Trans.*, 1852.
54. Torres Filho IP. (1990) Venular vasomotion in the bat wing. *Microvasc Res*, 39(2): 246-9.
55. Van Helden DF. (1991) Spontaneous and noradrenaline-induced transient depolarizations in the smooth muscle of guinea-pig mesenteric vein. *J Physiol*, 437: 511-41.
56. Davis MJ, Shi X, Sikes PJ. (1992) Modulation of bat wing venule contraction by transmural pressure changes. *Am J Physiol*, 262(3 Pt 2): H625-34.
57. Monos E, Contney SJ, Cowley AW Jr, Stekiel WJ. (1989) Electrical and mechanical responses of rat saphenous vein to short-term pressure load. *Am J Physiol*, 256(1 Pt 2): H47-55.
58. Heyman F., Strid KG (1994) Pressure-induced local venous constrictor responses in human fingers. *Acta Physiol Scand*, 151(3): 301-8.
59. Monos E, Contney SJ, Cowley AW Jr, Stekiel WJ. (1989) Effect of long-term tilt on mechanical and electrical properties of rat saphenous vein. *Am J Physiol*, 256(4 Pt 2): H1185-91.
60. Kuo L, Arko F, Chilian WM, Davis MJ. (1993) Coronary venular responses to flow and pressure. *Circ Res*, 72(3): 607-15.
61. Koller A, Bagi Z. (2004) Nitric oxide and H_2O_2 contribute to reactive dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(6): H2461-7.
62. Koller A, Huang A. (1994) Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 74(3): 416-21.
63. Racz A, Veresh Z, Erdei N, Bagi Z, Koller A. (2009) Thromboxane A(2) contributes to the mediation of flow-induced responses of skeletal muscle venules: role of cyclooxygenases 1 and 2. *J Vasc Res*, 46(5): 397-405.

64. Racz A, Veresh Z, Lotz G, Bagi Z, Koller A. (2010) Cyclooxygenase-2 derived thromboxane A(2) and reactive oxygen species mediate flow-induced constrictions of venules in hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis*. 208(1): 43-9.
65. Furchgott RF. (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*, 53(5): 557-73.
66. Kaley G, Koller A, Rodenburg JM, Messina EJ, Wolin MS. (1992) Regulation of arteriolar tone and responses via L-arginine pathway in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 2): H987-92.
67. Koller A, Messina EJ, Wolin MS, Kaley G. (1989) Endothelial impairment inhibits prostaglandin and EDRF-mediated arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol*, 257(6 Pt 2): H1966-70.
68. Eskinder H, Harder DR, Lombard JH. (1990) Role of the vascular endothelium in regulating the response of small arteries of the dog kidney to transmural pressure elevation and reduced PO₂. *Circ Res*, 66(5): 1427-35.
69. Harder DR. (1987) Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium. *Circ Res*, 60(1): 102-7.
70. Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. (1987) Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries. *Am J Physiol*, 252(3 Pt 2): H671-3.
71. Rubanyi GM, (1988) Endothelium-dependent pressure-induced contraction of isolated canine carotid arteries. *Am J Physiol*, 255(4 Pt 2): H783-8.
72. Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Johns A, Harder DR. (1990) Mechanoreception by the endothelium: mediators and mechanisms of pressure- and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels*, 27(2-5): 246-57.
73. Harder DR, Sanchez-Ferrer C, Kauser K, Stekiel WJ, Rubanyi GM. (1989) Pressure releases a transferable endothelial contractile factor in cat cerebral arteries. *Circ Res*, 65(1): 193-8.
74. Chilian WM, Kuo L, DeFily DV, Jones CJ, Davis MJ. (1993) Endothelial regulation of coronary microvascular tone under physiological and pathophysiological conditions. *Eur Heart J*, 14 Suppl I: 55-9.
75. Hill MA, Davis MJ, Meininger GA. (1990) Cyclooxygenase inhibition potentiates myogenic activity in skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol*, 258(1 Pt 2): H127-33.
76. Nyborg NC, Nielsen PJ. (1990) The level of spontaneous myogenic tone in isolated human posterior ciliary arteries decreases with age. *Exp Eye Res*, 51(6): 711-5.
77. Sun D, Kaley G, Koller A. (1994) Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol*, 266(3 Pt 2): H1177-83.

78. McCarron JG, Osol G, Halpern W. (1989) Myogenic responses are independent of the endothelium in rat pressurized posterior cerebral arteries. *Blood Vessels*, 26(5): 315-9.
79. Hwa JJ, Bevan JA. (1986) A nimodipine-resistant Ca^{2+} pathway is involved in myogenic tone in a resistance artery. *Am J Physiol*, 251(1 Pt 2): H182-9.
80. Hwa JJ, Bevan JA. (1986) Stretch-dependent (myogenic) tone in rabbit ear resistance arteries. *Am J Physiol*, 250(1 Pt 2): H87-95.
81. Falcone JC, Davis MJ, Meininger GA. (1991) Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol*, 260(1 Pt 2): H130-5.
82. Sun D, Messina EJ, Kaley G, Koller A. (1992) Characteristics and origin of myogenic response in isolated mesenteric arterioles. *Am J Physiol*, 263(5 Pt 2): H1486-91.
83. Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K. (1991) Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation*, 84(4): 1457-68.
84. Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. (1996) Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Circ Res*, 79(5): 1024-30.
85. Huang A, Sun D, Koller A, Kaley G. (1997) Gender difference in myogenic tone of rat arterioles is due to estrogen-induced, enhanced release of NO. *Am J Physiol*, 272(4 Pt 2): H1804-9.
86. DeForrest JM, Hollis TM. (1978) Shear stress and aortic histamine synthesis. *Am J Physiol*, 234(6): H701-5.
87. Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. (1988) Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*, 12(6): 530-48.
88. Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K. (1991) Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation*, 84(4): 1457-68.
89. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43(2): 109-42.
90. Moncada S, Vane JR. (1980) Prostacyclin in the cardiovascular system. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, 6: 43-60.
91. Rubanyi GM. (1988) Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med*, 4(2): 107-20.
92. Taylor SG, Weston AH. (1988) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci*, 9(8): 272-4.

93. Chaikhouni A, Crawford FA, Kochel PJ, Olanoff LS, Halushka PV. (1986) Human internal mammary artery produces more prostacyclin than saphenous vein. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 92(1): 88-91.
94. Skidgel RA, Printz MP. (1978) PGI₂ production by rat blood vessels: diminished prostacyclin formation in veins compared to arteries. *Prostaglandins*, 16(1): 1-16.
95. Carter AJ, Bevan JA, Hanley SP, Morgan WE, Turner DR. (1984) A comparison of human pulmonary arterial and venous prostacyclin and thromboxane synthesis--effect of a thromboxane synthase inhibitor. *Thromb Haemost*, 51(2): 257-60.
96. Upchurch GR, Banes AJ, Wagner WH, Ramadan F, Link GW, Henderson RH, Johnson G Jr. (1989) Differences in secretion of prostacyclin by venous and arterial endothelial cells grown in vitro in a static versus a mechanically active environment. *J Vasc Surg*, 10(3): 292-8.
97. Hadhazy PB, Malomvölgyi B, Magyar K. (1988) Endogenous prostanoids and arterial contractility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 32(3): 175-85.
98. Nadasy GL, Szekacs B, Juhasz I, Monos E. (1992) Pharmacological modulation of prostacyclin and thromboxane production of rat and cat venous tissue slices. *Prostaglandins*, 44(4): 339-55.
99. Sinzinger H, Fitscha P. (1984) Prostacyclin (PGI₂) contracts normal and varicose human saphenous veins. *Vasa*, 13(3): 228-30.
100. Munzel T, Stewart DJ, Holtz J, Bassenge E. (1988) Preferential venoconstriction by cyclooxygenase inhibition in vivo without attenuation of nitroglycerin venodilation. *Circulation*, 78(2): 407-15.
101. Vanhoutte PM, Luscher TF, Graser T. (1991) Endothelium-dependent contractions. *Blood Vessels*, 28(1-3): 74-83.
102. De Mey JG, Vanhoutte PM. (1982) Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res*, 51(4): 439-47.
103. Aksoy MO, Harakal C, Smith JB, Stewart GJ, Zerweck CR. (1990) Mediation of bradykinin-induced contraction in canine veins via thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor activation. *Br J Pharmacol*, 99(3): 461-6.
104. Kresowik TF, Vincent CK, Brunkwall JS, Stanley JC. (1989) Effect of preexcisional heparin anticoagulation on excised canine vein and artery prostanoid production. *J Surg Res*, 46(6): 605-10.
105. Brunkwall JS, Stanley JC, Graham LM, Burkell WE. (1988) Influence of pressure, flow rate, and pulsatility on release of 6-keto-PGF₁ alpha and thromboxane B₂ in ex vivo-perfused canine veins. *J Vasc Surg*, 7(1): 99-107.

106. Weller R, Schrems O. (1993) H₂O₂ in the marine troposphere and seawater of the Atlantic Ocean (48°N-63°S). *Geophysical Research Letters*, 20: 125-128.
107. Price D, Worfold PJ, Mantoura RFC, (1992) Hydrogen peroxide in the marine environment: cycling and methods of analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11: 379-384.
108. Wiley J, Paerl H, Hans W, Malia G. (1999) Impact of rainwater hydrogen peroxide on chlorophyll a content of surface Gulf Stream seawater off North. *Marine Ecology Progress Series*, 178: 145-150.
109. Halliwell B, Clement MV, Long LH. (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 486(1): 10-3.
110. Wolin MS. (1991) Activated oxygen metabolites as regulators of vascular tone. *Klin Wochenschr*, 69(21-23): 1046-9.
111. Downey JM. (1990) Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu Rev Physiol*, 52: 487-504.
112. Ueda N, Shah SV. (1992) Role of intracellular calcium in hydrogen peroxide-induced renal tubular cell injury. *Am J Physiol*, 263(2 Pt 2): F214-21.
113. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press., *Free Radicals and Toxicology*, 1–27.,
114. González-Flecha B. (1997) Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 179: 382-388.
115. Clement MV, Ponton A, Pervaiz S. (1998) Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett*, 440(1-2): 13-8.
116. Hampton MB, Orrenius S. (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*, 414(3): 552-6.
117. Imlay JA, Linn S. (1987) Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 169(7): 2967-76.
118. Bai J, Rodriguez AM, Melendez JA, Cederbaum AI. (1999) Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J Biol Chem*, 274(37): 26217-24.
119. Chance B., Sies H, . Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59(3): 527-605.
120. Matsumoto A, Okado A, Fujii T, Fujii J, Egashira M, Niikawa N, Taniguchi N. (1999) Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member. *FEBS Lett*, 443(3): 246-50.

121. Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J. (1999) Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7): 4131-6.
122. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*, 107(3): 323-32.
123. Ueda J, Saito N, Shimazu Y, Ozawa T. (1996) A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys*, 333(2): 377-84.
124. Halliwell B, Gutteridge JM. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85.
125. de Groot H, Littauer A. (1989) Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 6(5): 541-51.
126. Katusic ZS, Schugel J, Cosentino F, Vanhoutte PM. (1993) Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am J Physiol*, 264(3 Pt 2): H859-64.
127. Pelaez NJ, Braun TR, Paul RJ, Meiss RA, Packer CS. (2000) H₂O₂ mediates Ca²⁺- and MLC(20) phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(3): H1185-93.
128. Yang ST, Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD. (1991) Mechanisms of impaired endothelium-dependent cerebral vasodilatation in response to bradykinin in hypertensive rats. *Stroke*, 22(9): 1177-82.
129. Barlow RS, El-Mowafy AM, White RE. (2000) H₂O₂ opens BK(Ca) channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(2): H475-83.
130. Barlow RS, White RE. (1998) Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2): H1283-9.
131. Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. (1998) Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels*, 13(1): 9-17.
132. Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. (1999) Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 2): H978-85.
133. Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H, Mitra S, Holland S, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. (2001) Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res*, 89(2): 114-6.

134. Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW, Busija DW. (2002) Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(1): H406-11.
135. Wei EP and Kontos HA. (1990) H₂O₂ and endothelium-dependent cerebral arteriolar dilation. Implications for the identity of endothelium-derived relaxing factor generated by acetylcholine. *Hypertension*, 16(2): 162-9.
136. Wolin MS, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G. (1990) Similarities in the pharmacological modulation of reactive hyperemia and vasodilation to hydrogen peroxide in rat skeletal muscle arterioles: effects of probes for endothelium-derived mediators. *J Pharmacol Exp Ther*, 253(2): 508-12.
137. Yang ZW, Zhang A, Altura BT, Altura BM. (1998) Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism. *Brain Res Bull*, 47(3): 257-63.
138. Meininger GA, Davis MJ. (1992) Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response. *Am J Physiol*, 263(3 Pt 2): H647-59.
139. Gao YJ, Lee RM. (2001) Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A₂ production. *Br J Pharmacol*, 134(8): 1639-46.
140. Gao YJ, Zhang Y, Hirota S, Janssen LJ, Lee RM. (2004) Vascular relaxation response to hydrogen peroxide is impaired in hypertension. *Br J Pharmacol*, 142(1): 143-9.
141. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. (2005) Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation*, 111(18): 2364-72.
142. Hochauf S, Sternitzky R, Schellong SM. (2007) Structure and function of the peripheral venous system. *Herz*, 32(1): 3-9.
143. Mattioli LF, Holloway NB, Thomas JH, Wood JG. (2010) Fructose, but not dextrose, induces leukocyte adherence to the mesenteric venule of the rat by oxidative stress. *Pediatr Res*, 67(4): 352-6.
144. Racz A, Veresh Z, Lotz G, Bagi Z, Koller A. (2010) Cyclooxygenase-2 derived thromboxane A₂ and reactive oxygen species mediate flow-induced constrictions of venules in hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis*, 208(1): 43-9.
145. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(1): 272-7.

146. Bunting S, Moncada S, Vane JR. (1983) The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull*, 39(3): 271-6.
147. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*, 46(2): 205-29.
148. Nicosia S, Oliva D, Noè MA, Corsini A, Folco GC, Fumagalli R. (1987) PGI₂ receptors in vasculature and platelets: 5Z-carbacyclin discriminates between them. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 17A: 474-8.
149. Chow KB, Jones RL, Jones RL, Wise H. (2003) Protein kinase A-dependent coupling of mouse prostacyclin receptors to Gi is cell-type dependent. *Eur J Pharmacol*, 474(1): 7-13.
150. Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. (2007) Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 82(1-4): 109-18.
151. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 459(7249): 996-9.
152. Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y. (1991) Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. *Br J Plast Surg*, 44(2): 130-4.
153. Gruber RP, Vistnes L, Pardoe R. (1975) The effect of commonly used antiseptics on wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 55(4): 472-6.
154. Wasserbauer S, Perez-Meza D, Chao R. (2008) Hydrogen peroxide and wound healing: a theoretical and practical review for hair transplant surgeons. *Dermatol Surg*, 34(6): 745-50.
155. Brown CD, Zitelli JA. (1993) A review of topical agents for wounds and methods of wounding. Guidelines for wound management. *J Dermatol Surg Oncol*, 19(8): 732-7.
156. Racz A, Veresh Z, Lotz G, Bagi Z, Koller A. (2010) Cyclooxygenase-2 derived thromboxane A(2) and reactive oxygen species mediate flow-induced constrictions of venules in hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis*, 208(1):43-9.
157. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. (1991) Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res.*, 42(2):125-38.

158. Csató V, Pető A, Koller A, Edes I, Tóth A, Papp Z. (2014) Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic Acid pathway. *PLoS One.*, 9(8):e103858.
159. Sheehan DW, Giese EC, Gugino SF, Russell JA. (1993) Characterization and mechanisms of H₂O₂-induced contractions of pulmonary arteries. *Am J Physiol.*, 264(5 Pt 2):H1542-7.
160. Pelaez NJ, Braun TR, Paul RJ, Meiss RA, Packer CS. (2000) H₂O₂ mediates Ca²⁺- and MLC(20) phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 279(3):H1185-93.
161. Pfisterer L, König G, Hecker M, Korff T. (2014) Pathogenesis of varicose veins - lessons from biomechanics. *Vasa*, 43(2):88-99.
162. Ungvari Z, Csiszar A, Huang A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. (2003) High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. *Circulation*, 108(10): 1253-8.
163. Veresh Z, Debreczeni B, Hamar J, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. (2012) Asymmetric dimethylarginine reduces nitric oxide donor-mediated dilation of arterioles by activating the vascular renin-angiotensin system and reactive oxygen species. *J Vasc Res.*, 49(4):363-72.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

B. Debreczeni, Z. Veresh, E. Gara, A. Marki, A. Racz, R. Matics, J. Hamar and A. Koller
Hydrogen peroxide via thromboxane A₂ receptors mediates myogenic response of small skeletal muscle veins in rats.

Clinical Hemorheology and Microcirculation. 54 (2013) 393–407 DOI 10.3233/CH-131709

Impact Factor: 3.398

Veresh Z, **Debreczeni B**, Hamar J, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A.

Asymmetric dimethylarginine reduces nitric oxide donor-mediated dilation of arterioles by activating the vascular renin-angiotensin system and reactive oxygen species.

Journal of Vascular Research. 2012;49(4):363-72. doi: 10.1159/000337485. Epub 2012 May 30.

Impact Factor: 2.651

Tamas R, Nemeth N, Brath E, Sasvari M, Nyakas C, **Debreczeni B**, Miko I, Furka I.

Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model.

Microsurgery. 2010 May;30(4):282-8. doi: 10.1002/micr.20699

Impact factor: 1.555

Hamar J, Solymár M, Tanai E, Cseplo P, Springo Z, Berta G, **Debreceni B**, Koller A

Bioassay-comparison of the antioxidant efficacy of hydrogen sulfide and superoxide dismutase in isolated arteries and veins.

Acta Physiologica Hungarica Dec 1, 2012

Impact Factor: 0.821

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Tamás Róbertnek, a Magyar Honvédség Egészségügyi Központ, Plasztikai Sebészeti Osztály osztályvezető főorvosának - értékes szakmai tanácsai és támogatása nélkül e tudományos munka nem valósulhatott volna meg.

Külön köszönöm Dr. Koller Ákos professzor úrnak, témavezetőmnek, hogy az általa irányított közös munkánk során mindvégig élvezhettem bizalmát, türelmét, és legfőképpen segítségét, tanácsait a kutatás során adódó problémákkal kapcsolatban. Köszönöm, hogy megtanított tudományosan gondolkodni és a lényeges összefüggéseket meglátni. Professzor úrnak köszönhetem, hogy klinikai munkám közelebb került az alap kutatásokhoz.

Munkám során értékes elméleti és gyakorlati segítségemre volt a közlemények megírása kapcsán Dr. Dörnyei Gabriella, Dr. Csekő Csongor, Dr. Rácz Anita, Dr. Veresh Zoltán, Dr. Matics Róbert és Dr. Hamar János. Az experimentális mérések során Dr. Márki Alex és Dr. Gara Edit precizitása és pontossága garantálta az eredményességet, melyet ezúton köszönök meg. Hálával tartozom Cser Ágnesnek, hogy a labor mérések és a disszertáció elkészítése során tanácsokkal látott el, ügyeim intézésében segítséget nyújtott. Nélküle nem készülhetett volna el a dolgozat végleges formája.

Köszönöm az intézeti vita opponensemnek, Dr. Molnár Miklósnak, hogy értékes tanácsaival, megjegyzéseivel segítette a dolgozat végleges változatának elkészítését. Köszönöm valamennyi klinikai és tudományos munkatársamnak, családomnak a támogató hozzáállását, munkáját és biztatását.

14. TÁMOGATÁS

A kutatásokat támogatta: AHA Founders Aff. 0855910D, Hungarian Sci. Res. Funds/OTKA-K-71591 és K67984, TAMOP-4.2.1/B-10/2/KONV-2010-0002, SROP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0024 és 0017.