

A kutatás fő célja: a krónikus orthosztatikus és inverz-orthosztatikus terheléshez történő végtagi vaszkuláris, valamint szisztémás kardiovaszkuláris adaptáció sajátosságainak mélyebb kísérletes elemzése (pl. reverzibilitás, vestibuláris függőség, endotheliális vesiculáris transzport, gravitációs hipertenzió), valamint még nem ismert mechanizmusainak feltárása volt.

A legfőbb tudományos eredmények összefoglalása:

Kísérletes bizonyítékok sorát tártuk fel annak igazolására ill. megerősítésére, hogy orthosztatikus jellegű - esetenként inverz-orthosztatikus (mikrogravitációs model!) is - krónikus gravitációs terhelésre az alsó végtagi vénák falának mindhárom rétege - intima, media, adventitia - adaptációs jellegű, specifikus microvesiculáris, myogen, ill. innervációs változásokkal válaszol. E kísérletes eredmények egy részét, pl. a vénás endothelium microvesiculáris - és korábban a media myogen - válaszai vonatkozásában, már humán érvizsgálattal is sikerült megerősíteni. Emberi in vivo kutatásokra fejlesztett új, non-invazív módszerünkkel alapvető információkat szolgáltatunk számos nagyvéna disztenziabilitásának testhelyzet-, nyomás-, régió- és korfüggő sajátosságairól egészséges és beteg - pl. postthrombotikus - egyének vonatkozásában. Mivel az egész vérkeringési rendszer gravitációs alkalmazkodó-képességének megítélésében meghatározóan fontos az artériás vérnyomás viselkedése, kombinált tilt-telemetriás módszereket és protokollokat fejlesztettünk ki rövid- és hosszú-távú orthosztatikus, valamint inverz-orthosztatikus kardiovaszkuláris hatások jellemzőinek ill. mechanizmusainak tanulmányozására éber patkányokban. Meglepetésre, mindkét testhelyzetben artériás hipertenzió a válasz, amely sympathicus efferens függő és a specifikus gravitációs hatásokhoz kötött (nem-specifikus stressz effektusokat kizártunk). Bizonyítékot nyertünk, hogy e válasz vestibulo-sympathicus reflex, amely néhány nap alatt adaptálódik.

A projekt időszakában publikált, egészében vagy részben OTKA támogatott munkák száma összesen: 83, ebből 10 teljes közlemény magyarul és 23 angolul (IF: 23.531) ill. 1 finnül nemzetközi lapban, 9+2 könyv-könyvfejezet ill. PhD disszertáció, 28 angol és 10 magyar nyelvű absztrakt. E beszámolóban csak válogatott publikációk 56 tételes listája szerepel (5 teljes közlemény magyarul, 21+1 angolul ill finnül, 8+2 könyv-könyvfejezet ill. PhD disszertáció, 16 angol és 3 magyar nyelvű absztrakt). Néhány olyan – pl. szakmatörténeti, képzésfejlesztési - publikáció is található azonban e listában, amelyek nem pontosan felelnek meg a zárójelentés merev szabályainak, megítélésem szerint azonban ezek tartalma is, bár közvetetten, meggyőzően tükrözi az OTKA-támogatás nagy szellemi és anyagi értékét ill. hasznosulását.

Részletes beszámoló

A következőkben eredményeinket az eredeti pályázat specifikus kérdéseinek sorrendjét követve foglaljuk össze, jelezve azonban, hogy a projekt megvalósítása során egyes témákból – a logika és a lehetőségek mentén - új, ill. kissé módosult kérdések, következőképpen nem várt értékes eredmények is születtek.

1-2.) Befolyásolja-e a patkány végtagi vénák endotheliumának intracelluláris világos pinocitotikus microvesicula rendszerét kísérletes orthosztatikus és inverz-orthosztatikus testhelyzet? Reagálnak-e gravitációs jellegű hatásokra a patkány vena saphena endothelium sejtjeiben található elektrodenz microvesiculák? Milyen anyagot tartalmaznak ezek? Előfordulnak-e más régióban is? Megtalálhatók-e a vesiculák emberi vénákban?

***Bővült:* Megváltozik-e a tartós orthosztatikus testhelyzetben tartott állatok vérplazmájában az endothelin koncentráció?**

- Az általunk vénás endotheliumban talált világos pinocitotikus vesiculákat gravitációs hatások nem befolyásolták, hisztotechnika-függő (artériákban nem jelentkező) műtermékek bizonyultak.

- Megállapítottuk viszont, hogy a végtagi erek endotheliumában az általunk felismert szekretoros típusú elektron-denz microvesiculák többszöröse található a kísérleti állatok vena saphena endothelium sejtjeiben (a keresztmetszeti felület $4,92 \pm 0,25\%$ -a), mint amennyi a véna mellett futó artériáéban ($1,09 \pm 0,47\%$). Kéthetes kísérletes orthosztázis (saját fejlesztésű eredeti módszer) után a véna endotheliumban a vesiculák mennyisége a kontroll felére csökken ($2,26 \pm 0,39\%$), míg az artériában nem változik. - Immunhisztokémiai és immuncitokémiai elektronmikroszkópos módszerek alkalmazásával kimutattuk, hogy a vesiculák tartalmaznak endothelint és PDGF α -t. Feltételezzük, hogy tartós orthosztatikusan terhelés esetén fokozott mértékben termeli a végtagi véna endotheliuma a két endogén parakrin modulátort, s ezek nagyobb „turnover” eredményezheti a vesiculák mennyiségének jelentős csökkenését. Az endothelin rendkívül hatékony vazokonstriktor, diffúzióval eljuthat a media simaizomsejtjeihez, ezért fontos szerepet játszhat a véna simaizomzat tónusának általunk felismert fokozásában ill. fenntartásában, s így a gravitációs terhelés káros vénás kapacitást növelő hatásának kivédésében, azaz az orthosztatikusan tolerancia biztosításában. A PDGF α növekedési faktor viszont szerepet játszhat az alsó végtagi vénákban tartós orthosztázis után ugyancsak általunk megfigyelt fokozott myogén reaktivitás s még a megnövekedett innerváció denzitás kialakulásában és fenntartásában is.

- Tanulmányoztuk a vena és arteria brachialis endotheliumának szekretoros vesicula készletét is és megállapítottuk, hogy mennyisége itt sokkal kisebb, mint a v. saphena endotheliumában, s nem reagál tartós orthosztázisra.

- Kiegészítő vizsgálatsorozat révén, ELISA kit alkalmazásával meghatároztuk az endothelin-1 koncentrációt kontroll és 2-hétig fej-fel tilt helyzetben tartott patkányok perifériás vérplazmájában is, különbséget nem találtunk. Ez az eredmény szintén arra utal, hogy a v. saphena endotheliumában megfigyelt változások az éradaptáció lokális mechanizmusainak részét képezik.

- A fenti, vesiculáris struktúrához köthető jelenség humán vonatkozásait különböző „orthosztatikusan életmódot” folytató beteganyag érmintáin is tanulmányoztuk. Tizenkét, érsebészeti műtetre kerülő beteg alsó és felső végtagi műtési területéről érintetlen vénaszakaszok kerültek eltávolításra. Az orthosztatikusan életmód szempontjából a betegeket három csoportba soroltuk (álló, fekvő, valamint vegyes). A digitalizált elektronmikroszkópos képeken a vesiculák sűrűségét számítógépes morfometria módszerrel határoztuk meg. A felső végtagból származó minták elektron-denz vesiculái az endothelium keresztmetszetének $2,30\% \pm 0,88\%$ -t foglalták el, míg az alsó végtag esetében ez az érték $6,07\% \pm 2,11\%$ volt! Az orthosztatikusan életmód szerint: a vezikulumok területaránya $3,39\% \pm 0,87\%$ volt az álló, $7,15\% \pm 3,66\%$ volt a vegyes és $2,88\% \pm 2,07\%$ volt a fekvő csoportokban (n.s.). A téma kutatását, rendkívüli érdekessége miatt, folytatni kívánjuk, s eredményeinket a vizsgált régiók és az esteszám növelésével kiegészítjük, ill. pontosítjuk.

(Pathol Res Pract, J Vasc Res, Acta Astronautica, Acta Physiol Hung, PhD Thesis, stb.)

3.) Hogyan befolyásolja az akut nyomásnövekedés és a krónikus gravitációs terhelés a humán végtagi vénák disztenzibilitását in situ?

Általunk fejlesztett, ultrasonográfiára alapozott módszerrel meghatároztuk a vv. femoralis, axillaris, és jugularis interna mediolaterális és anteroposterior átmérőit álló, valamint fekvő testhelyzetben, kontrollált Valsalva-próba alkalmazása mellett. Fialatok ($24,0 \pm 0,4$ év, $n=10$) és idősebbek ($72,6 \pm 1,5$ év, $n=11$) csoportjait tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a v. femoralis kapacitása fekvő pácienseknél fokozatosan emelkedett, ha a Valsalva-próbát lépcsőszerűen növelt nyomás szerint alkalmaztuk. E véna in vivo disztenzibilitása

0,048±0,011 Hgmm⁻¹-nek adódott 0-15 Hgmm nyomás terhelés intervallumban, fekvő fiatalok esetében ez az érték 0,009±0,005 Hgmm⁻¹ a 45-60 Hgmm intervallumban. A v. femoralist álló testhelyzetben merevebbnek találtuk, mint fekvőben, a v. jugularis esetében a reláció fordított volt. A v. axillaris disztenzibilitása viszonylag alacsony volt és független a testhelyzettől. A vv. femoralis és axillaris ellipticitása minimális volt (a két átmérő aránya <1,25). A v. jugularis interna keresztmetszetét elliptikusnak találtuk álló testhelyzetben Valsalva-terhelés nélkül (2,94±0,99 mm fiatal egyénekben). Az idős femoralis vénáinak kapacitása sokkal nagyobb volt fekvő testhelyzetben Valsalva nélkül, míg fiataloknál alacsony nyomásszinten e véna disztenzibilitása jóval nagyobb volt. Feltételezzük, hogy a mély vénák passzív és aktív elasztikus tulajdonságai a hosszú távú gravitációs hatásokhoz történő adaptáció révén alakulnak ki. A kapacitás tartalék jelentős része felhasználandó az álló testhelyzet felvétele során a v. femoralis esetében, ill a fekvő testhelyzet felvételével a v. jugularis esetében.

E módszer alkalmazásával egy újabb vizsgálatsorozatban azt is megállapítottuk, hogy generalizált vénás disztenzibilitás eltérések vannak postthrombotikus betegekben a kontrollokhoz képest.

(Eur J Appl Physiol, Thrombosis Res, stb.).

4.) Reverzibilis-e a kéthetes fej-fel tilt testhelyzet hatására kialakuló innerváció-denzitás növekedés kísérleti patkány hátsó végtagi vénáinak adventíciájában?

Módosult, ill. bővült: Reverzibilis-e a krónikus kísérletes orthosztázissal indukált biomechanikai válasz a v. saphenában? Krónikus inverz-orthosztázis befolyásolja-e a végtagi vénák innerváció denzitását patkányban?

- Megállapítottuk, hogy a 2-hetes kísérletes orthosztázis hatására bekövetkező szignifikáns passzív átmérő növekedés a v. saphenában reverzibilis, viszont 4-hetes tilt után is még fennáll. A fokozott myogén válasz szintén reverzibilis, azonban 2 hétnél hosszabb orthosztázis alatt augmentáltsági szintjét fokozatosan veszíti, csupán tendenciájában marad a kontroll szintje fölött. Tehát a 2-hetes tilt után korábban talált szignifikáns myogén reaktivitás fokozódás fenntartását biztosító mechanizmusok feltehetőleg kimerülnek, vagy károsodnak.

- Szemben a kéthetes fej-fel testhelyzet után korábban talált nagymértékű végtag- ill. ér-specifikus adventicialis innerváció-denzitás növekedéssel, az ugyanolyan időtartamú fej-le testhelyzet (a microgravitas ground-base modellje) nem eredményez innerváció-denzitás változást. Meglepetésre, még a négyhetes fej-le tilt testhelyzet sem okozott szignifikáns innerváció denzitás redistribúciót a végtagerek adventíciájában. A kísérleti állatok a speciális tilt-ketrecekben mind a két, mind a négy héten át megőrizték normális táplálkozási aktivitásukat, testsúlyuk gyarapodott, kóros tüneteket nem mutattak, hasonlóan a korábbi vizsgálatainkhoz.

(Jpn J Physiol, News Physiol Sci, Acta Astronautica, MÉT.2003, Physiol Res, stb.).

5-6.) A vestibuláris receptorok kiiktatása révén megelőzhető-e a krónikus kísérletes orthosztatikus testhelyzettel kiváltott innerváció denzitás növekedés patkány vena saphena adventíciájában? Bekövetkezik-e a kéthetes kísérletes orthosztatikus testhelyzet után tapasztalt myogén reaktivitás fokozódás a vena saphenában vestibuláris receptor irtott állatokban?

Részben folyamatban, módosult ill. bővült: Fokozódik-e a vena saphena myogen tónusa 1-hetes kísérletes orthosztatikus terhelés után?

- Mikrosebészeti és kémiai technikák kombinálásával, funkcionális és szövettani kontrollal, kidolgoztuk a vestibularis receptor rendszer kiiktatásának új módszerét patkányban.

- Vestibularis receptor írtott és kontroll állatok végtagi vénáit és artériáit előkészítettük elektronmikroszkópos feldolgozásra az innerváció denzitás gravitációs válaszainak tanulmányozása céljából (feldolgozása folyamatban).

- Előző vizsgálataink, melyek szerint 2-hetes orthosztázis szignifikánsan augmentálja a v. saphena nyomás indukálta myogen tónusát, 4-hetes orthosztázis után viszont csupán tendencia figyelhető meg, fokozottan hívták fel figyelmünket az időtényező jelentőségére e krónikus éradaptációs mechanizmus működésében. Tanulmányoztuk ezért az 1-hetes fej-fel tilt hatását is, s megállapítottuk, hogy már ez az időtartam is elegendő a myogen válasz szignifikáns növekedéséhez.

(Acta Physiol Hung)

7.) Az emberben megfigyelt orthosztatikus hipertenzióval analóg vérkeringési reakció kialakul-e hipertóniás patkányokban?

Nagy mértékben bővült: Befolyásolja-e tartós inverz-orthosztatikus testhelyzet (a mikrogravitációs modellje) az artériás vérnyomást éber patkányban? A megfigyelt fenntartott orthosztatikus és inverz-orthosztatikus hipertenzió gátolható-e sympathicus blokkolással? Tekinthető-e nem-specifikus stressz reakciónak e hipertenzió? A vestibularis receptorok kiiktatásával megelőzhető-e a krónikus kísérletes orthosztatikus és inverz-orthosztatikus testhelyzettel kiváltott artériás vérnyomás emelkedés? Milyen hosszán marad fenn a gravitációs hatások alatt létrejövő artériás vérnyomás válasz? Kialakul-e dekondicionálódás a vérkeringési rendszer szabályozásában több napos tilt-testhelyzetben?

- Az orthosztatikus hipertenzió (OHT) előfordulási gyakorisága elérheti az 5%-ot átlagos populációban, bizonyos tünetegyüttesekben ennek többszörösére becsülik. Az OHT a magasvérnyomás betegség eddig nem tisztázott kockázati tényezője is lehet. Nem ismert azonban olyan kísérletes modell, amely az OHT mechanizmusának alaposabb felderítését segíthetné elő. Ilyen modell kidolgozását tűztük ki célul, felhasználva a telemetriás és az általunk kifejlesztett tilt-ketrec technika lehetőségeit. A vizsgálatokat jelátalakítókkal ill. telemetriás adóval krónikusan instrumentált felnőtt Wistar patkányokon végeztük. A telemetriás antennával vett vérnyomás-, EKG-, testhőmérséklet- és szomatomotoros jeleket számítógéppel regisztráltuk 12 órás mesterséges nappali/éjszakai fényviszonyok mellett. Az állatokat 7-10 nap lábadozás után cső alakú, dönthető tilt-ketrecbe helyeztük és meghatározott protokoll szerint különböző időtartamú (először 3x5 min és 120 min) 45°-os fej-fel tilt-helyzetbe hoztuk (kísérletes orthosztázis teszt). E teszteket az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) enzim blokkálásával (ivóvízben adagolt 1mg/ml L-NAME) előidézett magas vérnyomásos állapotban is megismételtük. A mért élettani jellemzők normál kontroll körülmények között szabályos diurnális ingadozásokat mutattak. Mind a 3x5 perces ciklusokban ismételt, mind pedig a 120 perces tartós tilt helyzet fenntartott és reverzibilis vérnyomás növekedést (4,5 ill. 8,4 Hgmm) okozott. NOS gátlás 24 órán belül szignifikánsan megemelkedett artériás vérnyomást eredményezett. Az állatok a kísérletes orthosztázis tesztre ebben az állapotban is szignifikáns, fenntartott hipertenziós választ adtak (+4,2 ill. +9,0 Hgmm). A pulzusszám- és a mozgás-változásokat is dokumentáltuk. Az általunk kidolgozott technika és protokoll alkalmas modellnek bizonyult az orthosztatikus hipertenzió jellegzetességeinek és mechanizmusának kutatására is. Mivel az OHT kísérletes hipertenziós állapotban szintén indukálható, megerősítve látjuk azt a hipotézist, hogy az OHT válasz kockázati tényező lehet magasvérnyomásos állapotokban, ezért a jelenség egzakt tanulmányozása emberben is indokolt.

- Az előbb ismertetett éber patkány modellen (telemetria alkalmazása speciális tilt-ketrecben), hasonlóan az orthosztázis hatásához, krónikus inverz-orthosztázissal is kiváltható fenntartott artériás hipertenzió.

- Különböző idegrendszeri blokkolók alkalmazása útján tisztáztuk, hogy mindkét előbbi esetben sympathicus efferens hatás fokozódása felelős a gravitációs vérnyomás válaszáért, amely azonban nem aspecifikus stressz következménye.
- A vestibularis receptorok sebészi kikapcsolásával mind az orthosztatikus, mind az inverz-orthosztatikus artériás vérnyomás emelkedés meggátolható.
- Több napos inverz-orthosztatikus teszt során az artériás vérnyomás emelkedés 3 napon belül megszűnik, azonban egy hét után sem mutatható ki súlyos dekondicionálódás a vérkeringési rendszer szabályozásában, habár a baroreflex szenzitivitás szignifikánsan kisebbnek bizonyult orthosztatikus testhelyzetben. Véleményünk szerint a kísérletes orthosztatikus hipertenzió gravitációs hatáshoz kötött specifikus válasz, vestibulo-sympathicus reflex, amely néhány nap alatt adaptálódik.

(J Cardiovasc Pharmacol, Acta Astronautica, Acta Physiol Hung, Chinese J Pathophysiol, PhD Thesis, stb.)

8.) Miként alakul hipertóniás patkányokban az alsó végtagi vénák myogén és adrenerg reaktivitása, valamint passzív biomechanikája krónikus fej-fel tilt-helyzet hatására?

***Részben módosult:* Miként alakul patkányban a hátsó végtagi vénák myogén és adrenerg reaktivitása, valamint passzív biomechanikája krónikus fej-le tilt-helyzet hatására?**

- Kimutattuk, hogy tartós orthosztatikus gravitációs terhelésnek kitett patkányokban a v. saphena nyomás-indukált myogén tónusa fokozódott, krónikus inverz-orthosztázis viszont ellenkező irányú változást okozott, míg a simaizom tónus nélküli (passzív) biomechanikai tulajdonságok változatlanok maradtak. Újabb vizsgálataink szerint, tartós inverz-orthosztázisban a patkány hátsó végtagi vénáinak adrenerg konstriktor érzékenysége fokozódik a fiziológiás nyomástartományban. A jelenség feltehetőleg egyike a számos adaptív jellegű változásnak, melyeket a gravitációs terhelés krónikus változása idéz elő.

(MÉT, Acta Astronautica, stb.)

Egyéb

Az érfal kóros adaptációs mechanizmusainak kutatásában célszerű, főleg gyakorlati alkalmazásra irányuló, értékes együttműködést alakítottunk ki más projektekkal. Jelentős új eredményeket hoztak azok a kooperációs vizsgálataink, amelyekben a.) a hormonális milió valamint b.) az artériás vérnyomás krónikus változásainak a coronaria rezisztencia artériák, továbbá c.) amelyekben tartós lokális pangásnak a végtagi vénák biomechanikai ill. hálózati adaptációjára gyakorolt hatásait tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a.) ovariectomizált patkányok esetében ösztadiol pótlás jótékony hatású a myogén tónus és a disztenzibilitás vonatkozásában tapasztalt változásokra nézve; b.) a hipertóniás elváltozások reverzibilisek lehetnek; c.) négy hét véráramlás-csökkenés és nyomásnövekedés a vena saphenában eutróf morfológiai átépüléséhez vezet, a kialakult lumen szűkület áramláscsökkenéssel magyarázható. Egyéb együttműködés keretében új biaxiális biomechanikai mérőberendezést fejlesztettünk ki egészséges és kórosan tágult (aneurizmás) humán agyi erek vizsgálatára.

(Cardiovasc Res, Acta Physiol Hung).