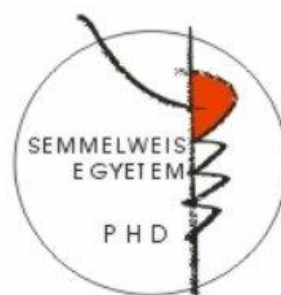


A vénák fiziológiás és kóros adaptációja hemodinamikai stresszhez

Doktori tézisek

Dr. Gósi Gergely

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Acsády György, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Sándor Tamás, Ph.D.

Dr. Szabó Attila, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Perner Ferenc, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Járai Zoltán, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Sugár István, Ph.D.

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Célkitűzések	4
3. Módszerek	5
4. Eredmények	7
5. Következtetések	12
Saját publikációk jegyzéke	14

1. Bevezetés

Az antigravitációs védekező reakciók a szárazföldi állatvilág valószínűleg legősibb adaptációs mechanizmusai közé tartoznak. A gravitációs terhelés emberen különösen nagy, álló testhelyzetben a lábszári vénákra tízszeres nyomásterhelés nehezdedhet. A rövidtávú terheléssel szembeni védekező mechanizmusokról szélesebb ismeret halmozódott fel. A vénák elsődleges szerepe a kapacitás akut szabályozása, amelyet az intraluminális nyomás kísérletes körülmények között való emelése ellenére változatlan érátmérő is igazol. A tartós ortosztatikus terhelés humán vénákban jelentkező hosszú távú következményeiről átfogó vizsgálati eredmény kevésbé áll rendelkezésre.

A gravitációs terheléshez való alkalmazkodás mechanizmusaival kapcsolatban munkacsoportunk korábbi vizsgálatai során jelentős megállapításokat tett. Állatkísérletekben tartós ortosztatikus terhelésre a vénák lumen térfogata növekedett falvastagság növekedés nélkül, míg a disztenziilitás csökkent. Humán és állati vénaminták biomechanikai vizsgálatokor kiderült, hogy az emberi vena saphena magna miogén tónusa jelentősen nagyobb, mint a kutya vagy a patkány végtagjaiból származó érszegmenteké. Mindemellett bizonyítást nyert, hogy ortosztatikus terhelésre a nyomás indukálta miogén tónus fokozódik. Kvantitatív elektron-mikroszkópos (EM) és immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatható volt, hogy két hetes kísérletes ortosztatikus terhelés hatására szignifikánsan növekedett az adventiciális szimpatikus innerváció denzitása. Két hetes ortosztatikus terhelés után endoteliális vezikulumok EM vizsgálatára került sor. A képeken sötét színű granulumok, immunhisztokémiai analízis szerint endotelint és trombocita eredetű növekedési faktort (PDGF) tartalmazó szekretoros vezikulumoknak bizonyultak. A vezikulumok és az endotél sejt területének aránya az ortosztatikus terhelés után csökkent. A mikrovaszkuláris hálózatban is átalakulások figyelhetők meg hosszú távú gravitációs terhelés hatására állatkísérletes modellben. A hátsó lábak felületes vénáiban a hálózat számítógépes feldolgozása alapján az oszlási szögek csökkentek, az érátmérők növekedtek.

A vénák hemodinamikai terhelésének klinikai jelentőségét több területen is kiemelkedőnek látjuk. A krónikus vénás elégtelenség (CVI) és felületes formája, a visszseresség népbetegségnek számít. Átlagos populáción végzett vizsgálatok alapján a

CVI mélyvénás formájának előfordulása nőknél 7%, férfiaknál 9%. A visszeresség gyakorisága –az eredményeket átlagolva– nőknél 26-29%, a férfiaknál 13-15%. Magyarországon a visszeresség prevalenciája még ennél is magasabbra tehető. Az előrehaladott CVI nemcsak az életminőségben okoz jelentős rosszabbodást, hanem gazdasági vonatkozása is jelentős. Az Európai Unió több országában végzett felmérés szerint a vénás betegségekre közvetlenül vagy közvetetten fordított összeg az egészségügyi költségvetés 1,5-2%-a.

Az érsebészeti tevékenység során alkalmazott áthidalásokban a vénás graftok jelentős hemodinamikai terhelésnek vannak kitéve. Artériás körülmények között a vénák jelentős átalakuláson mennek keresztül. Ez az átalakulás a vénagraft dinamikus, strukturális és biokémiai adaptációjában és ennek következtében a lumen kaliber, a falvastagság és összetétel hosszú távú átalakulásában határozható meg. A vénás graftot ért hemodinamikai terhelés legfőképp az áramlásból fakadó nyírófeszültségből és az intramurális nyomással összefüggő tangenciális feszültségből áll. A nyírófeszültségnek a lumen szabályozásában van elsődleges szerepe. A vénagraft belső átmérőjének növekedésével a hemodinamika szabályai szerint a nyírófeszültség a normál tartományba tud visszakerülni. A magas intramurális nyomás hatására megfigyelhető falvastagság növekedéssel a tangenciális feszültség normalizálódik a Laplace-Frank egyenletnek megfelelően. Kóros adaptációs mechanizmusok következtében a vénagraft károsodása, szűkülete alakulhat ki, amely végül az áthidalás elzáródásához vezethet.

Vizsgálatainkkal humán vénák krónikus gravitációs terhelésre adott biomechanikai és strukturális válaszait igyekeztünk feltérképezni.

2. Célkitűzések

A különböző krónikus hemodinamikai terhelés alatt álló vénák biomechanikai jellegzetességeivel nagyszámú vizsgálat foglalkozott, de a tulajdonságok összehasonlító elemzését csak részletekben találjuk a szakirodalomban. Kísérletes munkánkban különböző érterületek tulajdonságainak átfogó elemzésével a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan viszonyulnak egymáshoz a hemodinamikai stressznek különbözőképpen kitett humán vénák passzív és aktív biomechanikai tulajdonságai?
2. Az észlelt biomechanikai különbségek értelmezhetőek-e a gravitációs terheléshez való alkalmazkodásként?
3. A szöveti elemek szintjén kimutatható különbségek összhangban vannak-e az észlelt biomechanikai eltérésekkel?

Munkacsoportunk egy korábbi állatkísérletében elektron-mikroszkóppal endoteliális szekretoros vezikulumokat vizsgált. Ezeknek az elektrondenz vezikulumoknak az endotélsejt területéhez viszonyított területe krónikus gravitációs terhelésre csökkent. Emberi vénák endotéljében található hasonló vezikulumok sűrűségéről és geometriájáról a szakirodalomban elenyésző ismeret áll rendelkezésre. Elektron-mikroszkópos vizsgálatainkkal ezen vezikulumok tulajdonságait kutattuk, amely során az alábbi kérdések merültek fel:

4. Az emberi vénákban milyen sűrűségben található az állatkísérletekben látott endoteliális szekretoros vezikulumok?
5. Különböző-e a hemodinamikai stressznek különbözőképpen kitett vénák vezikulumainak sűrűsége?
6. Van-e eltérés a különböző területekről származó vénák vezikulumainak geometriájában?

3. Módszerek

Minden vizsgálatunkhoz érsebészeti műtét során távolítottunk el a műtéti területről egy 8-10 mm hosszú és 1-2 mm átmérőjű felületes vénát.

3.1. *In vitro* biomechanikai vizsgálatok

Az érszakaszok mindkét végét kanuláltuk, majd *in vitro* nyomás-angiométer szervfürdőjébe helyeztük. Inkubáció után nyomás-átmérő jelleggörbéket vettünk fel 2 és 30 Hgmm közötti nyomásokon, agonista hozzáadása nélkül normál Krebs-Ringer (nKR) oldatban. Ezt követően 10 μ M noradrenalin (NE) hozzáadása és 10 perc inkubáció után vizsgáltuk a maximális kontrakciót. A NE mellé 10 μ M acetilkolint (Ach-t) adtunk az endoteliális dilatáció felmérésére. A relaxáció nitrogén-oxidtól (NO-tól) függő komponensének tesztelésére 100 μ M L-nitro-arginin-metilésztert (L-NAME-t) adtunk a szervfürdőbe, majd a jelleggörbéket ismételtelen felvettük. Ezt követően a passzív, simaizom tónustól független biomechanikai méréseket Ca-mentes környezetben végeztük el. Az átmérőket a monitor képének kimerevítése után az érminták falának külső és belső kontúrjainak bejelölésével mértük.

Tizenegy mintát vettünk a nyaki régióból, amelyek carotis műtét során a műtéti területen látható v. jugularis externa ágak voltak. A tizenegy lábszári minta alsó végtagi artériás rekonstrukció vagy koszorúér bypass műtét során látótérbe került v. saphena magna oldalágak voltak.

3.2. *Emberi vénák szövettani elemzése*

Az elasztikus membrán megfestéséhez rezorcin-fukszint alkalmaztunk, a simaizom kimutatásához simaizom aktin (SMA) immun-hisztokémiai festést végeztünk.

Nyolc nyaki és hét lábszári véna szegmeneten történtek a szövettani vizsgálatok.

3.3. Vezikulumok sűrűsége az endotélben

Az endoteliális vezikulumok mennyiségi meghatározásához digitalizált elektron-mikroszkópos képek morfometriás analízisét végeztük el. A mintákból egy és húszt közötti elektron-mikroszkópos kép készült 2500-szoros és 25000-szeres nagyítás tartományban. Az endotél sejt vagy sejtek és az elektrondenz vezikulumok kontúráját körberajzoltuk, amely meghatározta az endotél sejt és a vezikulumok területét. A vezikulumok és az endotél sejtek összterületének hányadosaként számítottuk ki a vezikulumok sűrűségét minden egyes képnél, illetve összesítve minden betegnél. Közel kétszáz elektron-mikroszkópos képet dolgoztunk fel ezzel a módszerrel.

A felső végtagi mintákat az alkarról hemodialízis fisztula készítés közben metszettük ki. Az alsó végtagi szegmentumokat a lágyékból vagy a lábszárról távolítottuk el artériás rekonstrukció során. Összesen 25 érszakaszt metsztünk ki 25 betegből, 10 mintát a felső végtagból és 15-öt az alsó végtagból. Az alsó végtagi mintákat további két alcsoportra osztottuk, 7 vénát távolítottunk el a lágyékból, míg 8-at a lábszárból.

3.4. Vezikulumok geometriája az endotélben

Az érszegmentekről készült digitalizált elektron-mikroszkópos képeken megmértük a vezikulumok metszetének rövid és hosszú átmérőjét. Összesen 2540 vezikulumot vizsgáltunk meg ezzel a módszerrel. Külön meghatároztuk a lábszárból és a felső végtagból származó vezikulumok hosszú és rövid átmérő szerinti megoszlását. A lábszári és felső végtagi vezikulumok hosszú és rövid átmérő szerinti megoszlásainak különbségét szinkódolt diagramban összegeztük.

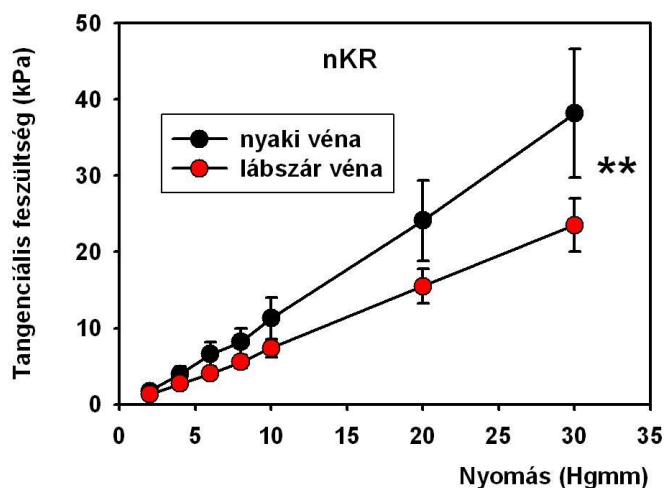
Öt felső végtagi és hét lábszári érmintát vizsgáltunk meg a vezikulumok geometriája szempontjából.

4. Eredmények

4.1. Különbség a nyaki és lábszári vénák biomechanikájában

4.1.1. Geometria

A nyaki és lábszári régióból eltávolított minták relaxált (Ca-mentes KR) állapotban mért külső sugara szinte megegyezett. A lábszári vénák nagyobb spontán tónusa miatt, a nKR oldatban vizsgált külső átmérők szignifikáns különbséget mutattak. A lábszári minták falvastagsága szignifikánsan nagyobbak bizonyult nKR oldatban. A falvastagság értékekben észlelt számottevő különbségek miatt az izobárikus falfeszültségben is jelentős eltérést találtunk, a lábszári mintákban értéke szignifikánsan alacsonyabb volt (1. ábra).

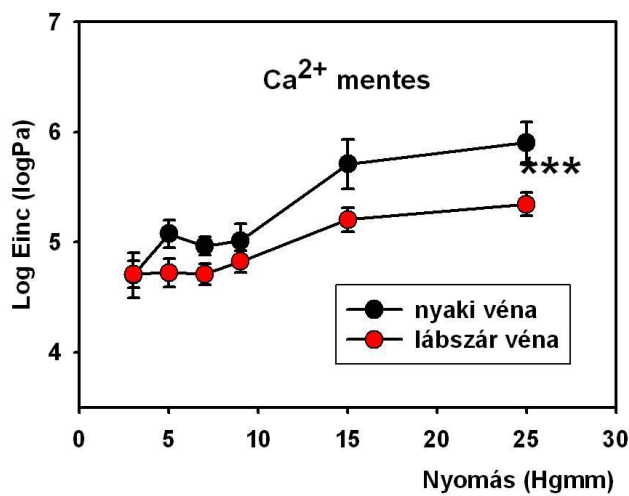


1. ábra: Izobárikus tangenciális falfeszültség intraluminális nyomás összefüggés nKR oldatban vizsgálva. Két szempontos variancia analízis, ** $p < 0,01$.

4.1.2. Elaszticitás

A disztenzibilitást jelentősen különbözőnek találtuk a két csoportban, Ca-mentes oldatban. Közepes és magasabb nyomások mellett a lábszári erek voltak a tágulékonyabbak. Hasonló eltérések mutatkoztak, amikor az elasztikus modulust

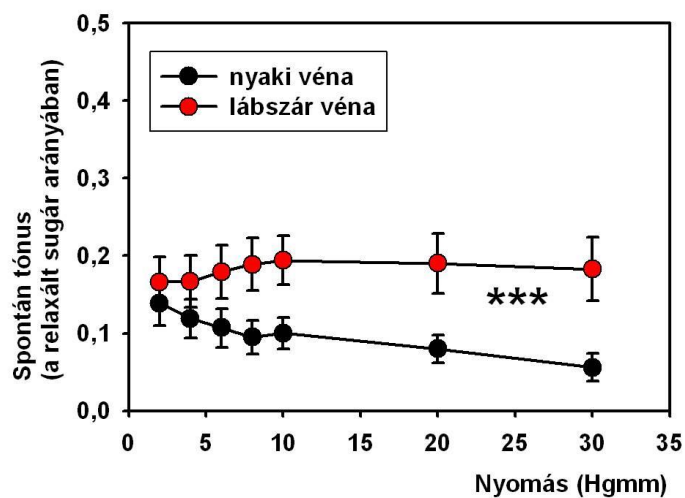
vizsgáltuk relaxált állapotban. Az alacsony nyomás értékektől eltekintve a nyaki vénák jelentősen rigidebbnek bizonyultak (2. ábra).



2. ábra: Elasztikus modulus (log érték) intraluminális nyomás összefüggés Ca-mentes oldatban. Két szempontos variancia analízis, *** $p < 0,001$.

4.1.3. Kontraktilitás

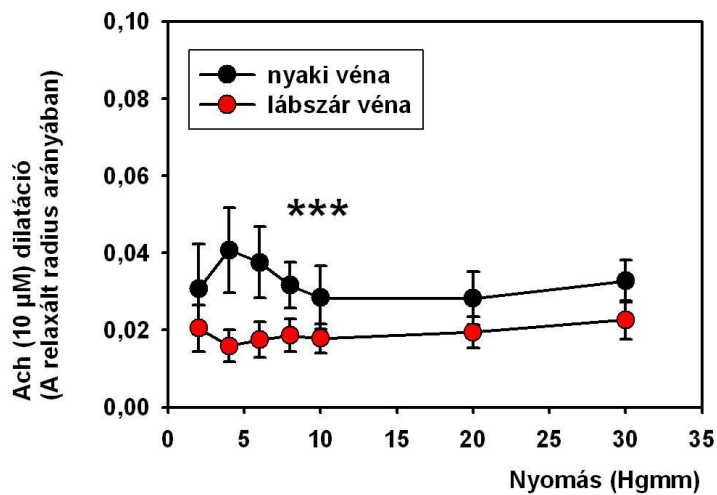
A spontán kontrakció, azaz az átmérő csökkenés nKR oldatban a Ca-mentes állapothoz képest, jelentős különbségeket mutatott a két csoportban. A spontán tónus szignifikánsan magasabb volt a lábszári mintákban (3. ábra). A maximális, noradrenalin indukálta tónus is jelentősen magasabb volt az alsó testféli vénákban.



3. ábra: Spontán tónus intraluminális nyomás összefüggés nKR oldatban. Két szempontos variancia analízis, *** $p < 0,001$.

4.1.4. Endoteliális dilatáció

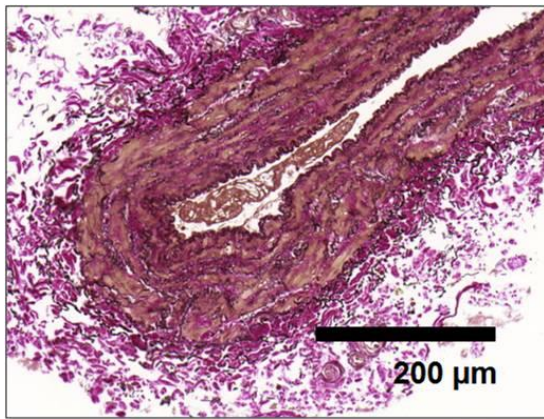
Az acetilkolin hatására létrejött dilatáció, amelyet a relaxált állapothoz viszonyítottunk, jelentősen nagyobb fokú volt a nyaki érmintákban (4. ábra). A mindezek után beadott L-NAME hatására jelentkezett, a relaxált állapothoz viszonyított kontrakcióban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között.



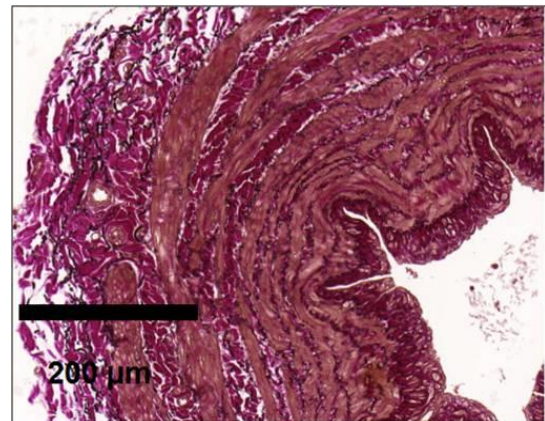
4. ábra: 10 µM Ach adás után mutatkozó dilatáció intraluminális nyomás összefüggés. Két szempontos variancia analízis, *** p<0,001.

4.2. A nyaki és lábszári vénák szövettani eltérései

Az elasztikus elemek mennyisége rezorcín-fukszin festéssel jelentősen nagyobbak bizonyult az alsó testféli vénákban, mint a felső testfélben (5. ábra).



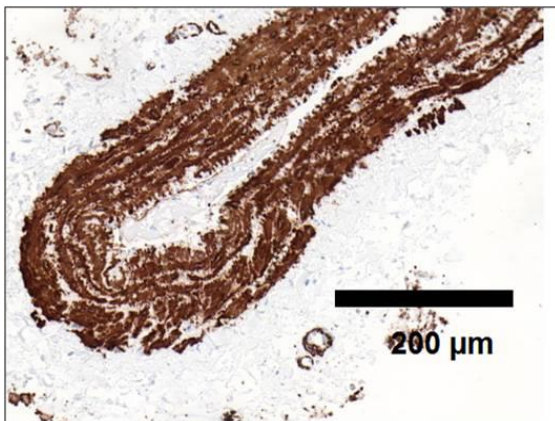
A



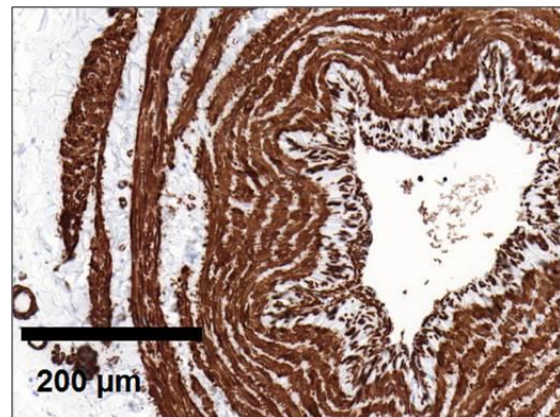
B

5. ábra: Rezorcín-fukszin festés. A: nyaki véna, B: lábszári kis véna.

A simaizom aktin immun-hisztokémiai festésével számottevően több simaizom lemez mutatkozott a lábszári érmintákban (6. ábra).



A



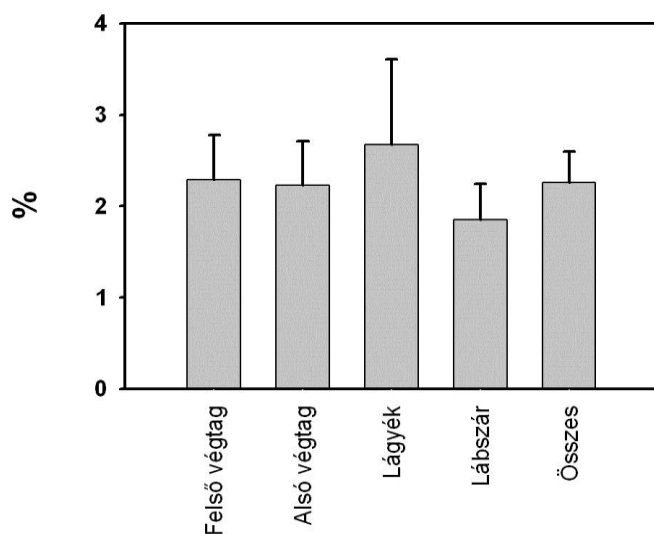
B

6. ábra: SMA immun-hisztokémia. A: nyaki véna, B: lábszári kis véna.

4.3. Elektronenz vezikulumok sűrűsége a felső és alsó végtagi endotélben

Az összes érszegmentumot vizsgálva a sötét vezikulumok metszetének össz felszíne az endotél sejtek metszetéhez képest $2,26 \pm 0,34\%$ volt. A felső és alsó végtagi mintákban mért arány különbsége statisztikailag nem volt szignifikáns. A krónikus gravitációs terhelés szempontjából leginkább különböző két területet (felső végtag vs.

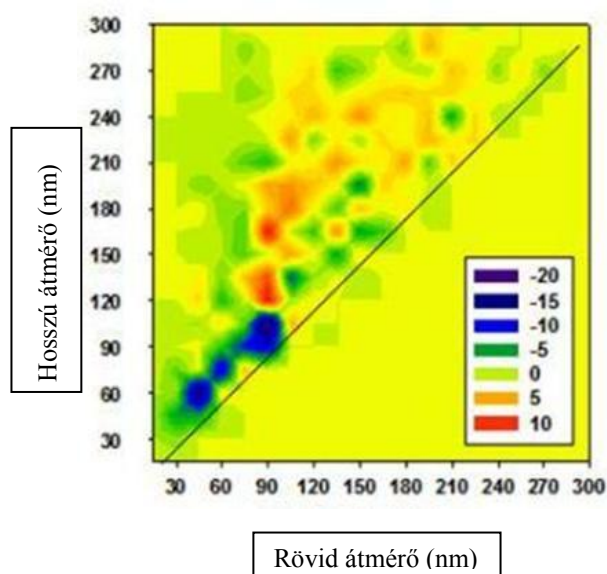
lábszár) összevetve sem mutatkozott a vezikulumok sűrűségében szignifikáns különbség (7. ábra).



7. ábra: A vezikulumok sűrűségének megoszlása a különböző mintavételi területeken.

4.4. Az elektrondenz vezikulumok geometriájának eltérései

A rövid és hosszú tengelyek alapján meghatároztuk a granulumok relatív gyakoriságát. A lábszári minták granulumainak relatív gyakoriságából kivonva a karból származók relatív gyakoriságát világossá vált, hogy a lábszári vezikulumok nagyobbak és oválisabbak (vörös pontok a grafikonon), míg a kar granulumai kisebbek és inkább kerek átmetszetűek (kék területek) (8. ábra).



8. ábra: A lábszárból és karból származó granulumok rövid és hosszú tengely alapján meghatározott relatív gyakoriságának különbsége.

5. Következtetések

Kísérletes kutatómunkánk során emberi vénák strukturális és funkcionális tulajdonságait tanulmányoztuk abból a célból, hogy megismerjük a különböző lokalizációjú, különböző ortosztatikus terhelésű vénák jellegzetességeit. Vizsgálataink eredményeiből az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. A hemodinamikai szempontból jelentősen különböző stressznek kitett vénák biomechanikai tulajdonságaiban számottevő különbségeket találtunk. A lábszári vénákban a fal szignifikánsan vastagabbnak bizonyult, mint a nyaki mintákban, így az azonos átmérőkre tekintettel az izobárikus falfeszültség a lábszári vénákban alacsonyabb. A disztenzibilitást nagyobb nyomásokon a lábszári vénákban találtuk magasabbnak, tehát a nyaki vénák a merevebbek. Az elasztikus modulus is a nyaki érszegmentekben magasabb. A spontán és maximális tónus a lábszári vénákban bizonyult minden vizsgált nyomáson szignifikánsan magasabbnak. Az endoteliális dilatáció jelentősen nagyobb a nyaki vénákban. Az L-NAME hatásra létrejött kontrakcióban nem találtunk különbséget a két csoport között, amelyből arra következtethetünk, hogy az Ach hatása részben NO-tól független, egyéb vazodilatátor ágensek (például prosztanoidok) állhatnak a folyamat hátterében.
2. Biomechanikai méréseink eredményei mind a gravitációs terheléshez való krónikus (evolúciós) alkalmazkodást igazolják. A lábszári vénák vastagabb fala alacsonyabb izobárikus falfeszültséggel jár, amely az érfal nagyobb transzmurális nyomásokkal szembeni fokozott ellenálló képességét mutatja. A lábszári vénákat nagyobb és gyakran változó gravitációs stressz terheli. Nagyobb disztenzibilitásuk és rugalmasságuk, illetve miogén tónusuk és maximális kontraktilitásuk mértéke a sokszor nagy és változó ortosztatikus terheléshez való adaptáció részjelenségei.
3. Szövetteni vizsgálataink igazolták, hogy a lábszári vénák falában az elasztikus elem és a simaizom jelentősen nagyobb mennyiségben van jelen. Mivel az elasztikus rostok az érfal rugalmasságáért, a simaizom a kontrakcióért felelős, egyértelmű összefüggést látunk a nagyobb gravitációs stressznek kitett alsó testféli vénák biomechanikai tulajdonságai és a kimutatott szövetteni jellegzetességek között.

4. Az emberi vénák endotéliájában vizsgált elektronenz szekretoros vezikulumok sűrűségét 2,26%-nak találtuk. Az összes mintát tekintve megfigyelhető egy stabil 1,8-2,7%-os érték, amelynek háttérében egy egyelőre ismeretlen szabályozó mechanizmust feltételezünk.
5. A vezikulumok sűrűségét humán véna mintákban vizsgálva az állatkísérletes modellben tapasztaltaktól eltérő eredményt kaptunk. A felső és az alsó végtagi minták, illetve a krónikus ortosztatikus terhelésnek jelentősen különböző mértékben kitett kar és lábszári vénák eredményeit összehasonlítva nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség. A jelenséget a vizsgált vénák hemodinamikai terheléshez való korábbi (evolúciós) adaptációjával vagy az ember napi tevékenysége során a hidrosztatikai nyomás jelentős ingadozásával magyarázzuk.
6. Számottevő különbséget találtunk a különböző hemodinamikai terhelésnek kitett területről származó vénák vezikulumainak geometriájában. A lábszárból származó érminták granulumai nagyobbak és elongáltabbnak bizonyultak, mint a nyaki vénák vezikulumai. Feltételezzük, hogy ezt a különbséget az egyes régiók között a granulumok érési folyamatának fázisaiban fennálló különbségek vagy a vezikulumok szekretoros tartalmának eltérései okozzák. Mivel ezek a vezikulumok a hemosztázisban jelentős szereppel bíró ágenseket, illetve a biomechanikai szabályozásban fontos mediátorokat tartalmaznak, úgy gondoljuk, hogy az észlelt különbségek hozzájárulnak a felső- és az alsó végtagi vénák trombotikus és hemodinamikai tulajdonságainak eltéréseihez.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Gósi G, Monori-Kiss A, Nádasy Gy, Durkó A, Tőkés A, Monos E, Acsády Gy. (2014) Comparison of passive and active biomechanical properties of human cervical and leg veins. *Int Angiol*, 33: 348-356.

Gósi G, Nádasy Gy, Raffai G, Fehér E, Szeberin Z, Monos E, Acsády Gy. (2014) Regional differences in statistical geometry of endothelial dense granules in human extremity veins. *Plebology*, pii: 0268355514547715.

A disszertációtól független publikációk

Gósi G, Huoránszki F. (2001) Sigmoidoscopically induced pneumatosis cystoides coli in Crohn's disease manifested by collar subcutaneous emphysema. *Endoscopy*, 33: 293.

Gósi G, Münch Z. (2002) A Fournier-gangrénáról; a korai diagnózis a legjobb ellenszer. *Magy Seb*, 55: 27-30.

Gósi G, Pencz Z, Laczkó Á, Acsády Gy. (2005) Takayasu arteritis; ritka kórkép, különleges megfontolások. *Magy Seb*, 58: 9-15.

Gósi G, Járányi Zs, Entz L, Acsády Gy. (2005) Congenitalis arterio-venosus fistula talaján kialakult artéria brachialis álaneurysma esete. *Magy Seb*, 58: 328-330.

Gósi G, Járányi Zs, Gálffy I, Bérczi V, Entz L. (2007) Alsó végtagi obliteratív elváltozások egyidejű, katéteres és sebészeti megoldása. *Érbetegségek*, 14: 17-20.

Gósi G. (2010) Kommentár: Risk of deep vein thrombosis following a single negative whole-leg compression ultrasound. *JAMA*, 2010, 303(5): 438-445. *Motesz*, XVIII: 52-54.

Gósi G. (2014) A diabétesz és a perifériás érbetegség-az alapellátás jelentősége. *Magyar Családorvosok Lapja*, 3: 3-4.

Mihók A, Imreh D, Gósi G, Benyó I. (1999) Iatrogen colorectalis perforációk – az elmúlt 20 év eseteinek áttekintése. *Magy Seb*, 52: 75-79.

Imreh D, Mihók A, Gósi G, Benyó I. (1999) A gastrointestinalis carcinoid tumorokról. *Magy Seb*, 52: 39-45.

Polner K, Gósi G, Vas SI, Kalina I, Acsády Gy. (2009) Management of abdominal and iliac artery aneurysms by stent-graft implantation in a patient on CAPD. *Clin Nephrol*, 71: 359-362.

Kovács H, Fehérvári M, Forgó B, Gósi G, Oláh Z, Csobay-Novák Cs, Entz L, Szeberin Z. (2014) Elektív infrarenalis aortaaneurysma sebészi kezelésének korai és késői mortalitása és morbiditása. *Magy Seb*, 67: 297-303.