

Helena Lenasi<sup>1</sup>

# Endotelijski hiperpolarizirajoči dejavnik in mikrocirkulacija kože

## *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Skin Microcirculation*

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** koža – prekrvavitve, mikrocirkulacija, laser – doplersko merjenje pretoka, endotelij žilni, vazodilatacija

Tonus žil v mikrocirkulaciji kože poleg sistemskih uravnavajo tudi lokalni dejavniki, od katerih so zelo pomembni vazodilatatorji, ki se sproščajo iz endotelija. Razen dušikovemu oksidu (NO) in prostaciklinu (PGL<sub>2</sub>) v zadnjem času pripisujejo vse večji pomen endotelijskemu hiperpolarizirajočemu dejavniku (EDHF), katerega kemijska zgradba in vloga pri človeku še nista pojasnjeni. V raziskavi smo želeli preučiti vlogo EDHF pri uravnavanju pretokov v mikrocirkulaciji kože. Zanimalo nas je tudi, če je, tako kot v nekaterih drugih žilah, v mehanizmu njegovega nastanka vpleten citokrom P450 (CYP) 2C9. V raziskavi je sodelovalo 14 zdravih preiskovancev moškega spola, starih od 20 do 37 let (povprečna starost 25,9 ± 1,7). Pretoke v mikrocirkulaciji kože smo merili z laser Dopplerjevo (LD) metodo na volarni strani podlakti. Delovanje ostalih vazodilatatorjev smo zavrli tako, da smo v kožo z metodo mikroinjekcije istočasno vnesli N<sup>ω</sup>-monometil L-arginin (L-NMMA), ki je zaviralec endotelijske sintaze dušikovega oksida (eNOS), ter diklofenak, zaviralec ciklooksigenaze (COX). Delovanje CYP pa smo zavrli s selektivnim zaviralcem CYP 2C9, sulfafenazolom. Ocenjevali smo pretoke v mirovanju ter odzivnost žil po uporabi acetilholina (ACh, od endotelija odvisni vazodilatator) in natrijevega nitroprusida (NaNP, od endotelija neodvisni vazodilatator), ki smo ju v kožo vnesli z iontoforezo, ter hiperemijo po popustitvi arterijskega zažema (pookluzijska reaktivna hiperemija, PRH). Zaviranje eNOS in COX ni vplivalo na bazalne LD pretoke (12,5 ± 2,3 PE (perfuzijske enote) na obravnavanem in 10,9 ± 1,8 PE na kontrolnem mestu, t-test), povzročilo pa je statistično značilno zmanjšanje z ACh izzvane vazodilatacije (35,6 ± 5,7 PE na kontrolnem in 66,6 ± 8,3 PE na obravnavanem mestu, t-test, p < 0,05); še vedno je bilo ohranjene 70% vazodilatacije. Zaviranje eNOS in COX ni imelo vpliva na z NaNP izzvano vazodilatacijo. Po zaviranju eNOS in COX se je značilno zmanjšala površina pod krivuljo PRH (985,4 ± 202 PE × sek na obravnavanem in 1252 ± 186 PE × sek na kontrolnem mestu, t-test, p < 0,05). Sulfafenazol ni vplival na bazalne LD pretoke niti na odzivnost mikrocirkulacije po iontoforezi ACh in popustitvi zažema arterije. Zaključimo lahko, da pri uravnavanju pretokov v mikrocirkulaciji kože igra pomembno vlogo od endotelija odvisni mehanizem, ki ni odvisen od NO in PGL<sub>2</sub> in ga lahko potencialno pripišemo delovanju EDHF. Morebitni EDHF najverjetneje ni derivat CYP 2C9.

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** skin – blood supply, microcirculation, laser – Doppler flowmetry, endothelium vascular, vasodilatation

The skin microcirculation is controlled by systemic and local factors; the latter are mainly released from the endothelium. One of important endothelial vasodilators is endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) whose function can be assessed by blocking other

<sup>1</sup> Asist. dr. Helena Lenasi, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

vasodilators, such as nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). The role and nature of EDHF in humans remains to be elucidated. The aim of our study was therefore to investigate and characterize the NO- and PGI<sub>2</sub>-independent mechanism, potentially attributable to EDHF, in human skin microcirculation. 14 healthy male volunteers (aged 20 to 37 years, mean age 25.9 ± 1.7) were included in the study. Cutaneous blood flow was measured using the laser Doppler (LD) method on the volar aspect of the forearm and expressed in perfusion units (PU). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and cyclooxygenase (COX) were inhibited by subcutaneously injecting N<sup>ω</sup>-monomethyl L-arginine (L-NMMA) and diclofenac, respectively. The potential involvement of cytochrome P450 (CYP) in the generation of EDHF was evaluated by injecting the selective CYP 2C9 inhibitor sulfaphenazole. The baseline LD flow and microvascular reactivity were assessed by performing iontophoresis of acetylcholine (ACh, endothelium-dependent vasodilator) and by measuring postocclusive reactive hyperemia (PRH). eNOS and COX inhibition did not affect the baseline LDF (12.5 ± 2.3 PU in the treated site and 10.9 ± 1.8 PU in the control site, t-test), but it significantly attenuated ACh-induced vasodilatation in the eNOS and COX-treated site (35.6 ± 5.7 PU in the treated site vs. 66.6 ± 8.3 PU in the control site, t-test, p < 0.05). Nevertheless, about 70% of ACh-induced vasodilatation persisted. In addition, L-NMMA and diclofenac significantly attenuated the area under the PRH curve, but LDF increase after removal of occlusion was preserved. Sulfaphenazole had no impact either on the baseline LDF or on ACh-induced vasodilatation or PRH parameters. It was concluded that the NO- and PGI<sub>2</sub>-independent mechanism, potentially attributable to EDHF, plays an important role in the regulation of vascular tone in the human cutaneous microcirculation and that it is probably not a CYP-derived metabolite.

## UVOD

Koža je eden največjih organov v telesu: tehta 5 % telesne teže in s svojo površino 1,8 m<sup>2</sup> prekriva telo in ga varuje pred zunanjimi vplivi (1, 2). Ena njenih najpomembnejših funkcij je izmenjava toplote med telesom in okolico, kar omogoča uravnavanje telesne temperature; glede na temperaturo okolja in temperaturo jedra telesa, ki je med drugim pogojena s telesno aktivnostjo, so pretoki krvi skozi kožo podvrženi zelo velikim nihanjem. Ocenjujejo, da je v mirovanju v termonevtralnih razmerah pretok skozi kožo od 200 do 500 ml/min, ob hudih telesnih obremenitvah pa lahko naraste do 8 l/min in pri tem predstavlja kar 60 % minutnega volumna srca (2). Prav zaradi velikih nihanj pretoka sta zelo pomembna nadzor in uravnavanje mikrocirkulacije v koži, ki ima svoje anatomske in funkcionalne posebnosti. Ena od anatomskih posebnosti so arteriovenske anastomoze (2, 3), ki jih najdemo predvsem na akralnih delih telesa in omogočajo zelo učinkovito izmenjavo toplote. Uravnavanje upornosti žil, ki poteka prek vpliva na žilni tonus, v mikrocirkulaciji kože še ni docela pojasnjeno. Žil-

no upornost uravnavajo tako centralni kot tudi lokalni mehanizmi, ki jim v zadnjem času pripisujejo vse večji pomen (3–6). Omenimo, da so uporovne žile pod toničnim vplivom vazokonstriktornega adrenergičnega nitja simpatičnega živčevja in da se njihova aktivnost z naraščanjem temperature jedra zmanjšuje, kar povzroči vazodilatacijo (2, 4, 5). Znanstveniki so si edini, da obstaja še aktivni vazodilatatorni nevrottransmitter (4, 5), vendar njegova vloga in narava še nista povsem pojasnjeni.

Pomembno vlogo pri lokalnem uravnavanju pretoka ima endotelij; iz njega se sproščajo vazokonstriktorji in vazodilatatorji in uravnoteženo razmerje med njimi je ključnega pomena za normalno uravnavanje žilnega tonusa in s tem pretoka (3–7). Najpomembnejša vazodilatatorja, ki se sproščata iz endotelija pod vplivom mehanskih in kemičnih dražljajev, sta dušikov oksid (NO) in prostaciklin (PGI<sub>2</sub>), pred nedavnim pa so odkrili še tretji zelo pomemben vazodilatator in ga, zaradi mehanizma njegovega delovanja, poimenovali 'endotelijski hiperpolarizirajoči dejavnik' (EDHF, iz angleščine 'endothelium-derived hyperpolarizing factor').

## Endotelijski hiperpolarizirajoči dejavnik

V zadnjem desetletju so s številnimi raziskavami predvsem na živalskih žilah, v manjši meri pa tudi pri ljudeh, potrdili od endotelija odvisno vazodilatacijo, do katere pride tudi po zaviranju dveh najbolj raziskanih endotelijskih vazodilatatorjev, NO in PGL<sub>2</sub>. Pokazali so tudi, da pride do vazodilatacije zaradi hiperpolarizacije v celicah gladkih mišic (GMC) žil, ki je najverjetneje posledica aktivacije od kalcija odvisnih kalijevih kanalov (K<sub>Ca</sub>). Zaradi omenjenega so neznani vazodilatator poimenovali EDHF (8-11). Kasneje se je izkazalo, da najverjetneje ne gre za en sam mehanizem, kajti odgovori so bili močno odvisni tako od živalske vrste kot tudi od preiskovanega organa. Tako danes prevladuje mnenje, da obstaja več mehanizmov, ki se razlikujejo med žilami in so odvisni od velikosti in funkcije žil, prvotno poimenovanje EDHF pa je ostalo. Znanstveniki so si bolj ali manj enotni tudi v ugotovitvi, da je vloga EDHF najverjetneje bolj kot v prevodnih pomembna v uporovnih žilah in da je z manjšanjem premera žile njegov prispevek k od endotelija odvisni vazodilataciji vedno večji (9, 12, 13). Še vedno pa so si nasprotujoča mnenja o pomenu EDHF pri bolezenskih procesih. Nekatere raziskave so namreč potrdile, da naj bi EDHF prevzel glavno vlogo endotelijskega vazodilatatorja v stanjih, kjer je funkcija endotelija okrnjena zaradi zmanjšane izločanja NO, kot so hipertenzija (14, 15), hiperholesterolemija (16), sladkorna bolezen (17) ali popuščanje srca (18). Zanimivo pa je, da obstajajo tudi prav nasprotni dokazi, ki trdijo, da je endotelijska vazodilatacija, ki je posledica delovanja EDHF, pri nekaterih bolezenskih procesih lahko tudi zmanjšana (19). Tudi narava EDHF oziroma njegova kemijska struktura še nista docela pojasnjeni. Zato bomo našli le nekaj najbolj znanih ugotovitev, ki opisujejo EDHF (8-10).

Splošno veljavna načela opredeljujejo EDHF kot vazodilatatorni mehanizem, ki je odvisen od endotelija, ne vključuje NO ali vazodilatatornih prostanoidov (od katerih je najbolj raziskan PGL<sub>2</sub>) ter povzroči hiperpolarizacijo GMC tako, da aktivira kalijeve

kanale, najpogosteje iz podvrste K<sub>Ca</sub>, kar privede do vazodilatacije. EDHF naj bi se sproščal iz endotelijskih celic (EC) pod vplivom delovanja mehanskih dražljajev, kot so pulzirajoč tok krvi, napetost v žilni steni in strižna sila, ki jo tok krvi izvaja na EC, ter kemijskih dražljajev, od katerih so zelo pomembni razni agonisti različnih receptorjev (acetilholin (ACh), bradikinin (BK), snov P, histamin, adenozin difosfat (ADP), endotelin). Vsi omenjeni dražljaji privedejo do zvišanja znotrajcelične koncentracije kalcija ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) v EC, kar aktivira dva tipa K<sub>Ca</sub> kanalov, namreč kanale nizke (SK<sub>Ca</sub>, iz angleščine 'small conductance calcium-activated potassium channel') in srednje prevodnosti (IK<sub>Ca</sub>, iz angleščine 'intermediate conductance calcium-activated potassium channel'). Aktivacija SK<sub>Ca</sub> in IK<sub>Ca</sub> povzroči hiperpolarizacijo EC, kar je prvi korak pri nastanku oziroma sproščanju EDHF. Dvig [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> v EC pa ima za posledico tudi aktivacijo številnih encimov v celici, ki naj bi bili domnevno vpleteni pri nastanku EDHF; najpomembnejši se zdi danes citokrom P450 (CYP). Morebitni EDHF nato difundira iz EC do GMC ali se, po nekaterih predpostavkah (8-10), prevede kot električni dražljaj do GMC preko mioendotelijskih presledkovnih stikov (angleško 'myoendothelial gap junctions'), kjer izzove že prej omenjeno hiperpolarizacijo GMC preko aktivacije K<sub>Ca</sub> kanalov velike prevodnosti (BK<sub>Ca</sub>, iz angleščine 'large conductance calcium-activated potassium channel'). Pri nekaterih žilah pa verjetno pride tudi do aktivacije kalijevih kanalov podvrste K<sub>ir</sub> (iz angleščine 'inward rectifier') oziroma Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaze (8, 9, 20), kar tudi privede do hiperpolarizacije GMC. Posledica slednje je zaprtje napestno odvisnih kalcijevih kanalov, kar zmanjša [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> v GMC in povzroči vazodilatacijo. Ni še znano, ali naj bi imel EDHF tudi vpliv na občutljivost GMC na kalcij; občutljivost kontraktilnega aparata za Ca<sup>2+</sup> je namreč eden od mehanizmov, ki vplivajo na krčljivost GMC in s tem uravnavajo žilni tonus.

### O kemijski naravi EDHF: EDHF in citokrom P450

Kot smo že omenili, se narava EDHF močno razlikuje med živalskimi vrstami in med tkivi. Po nekaterih hipotezah je EDHF lahko: derivat CYP, kalij, električni signal, ki se

preko mioendotelijskih presledkovnih stikov prevede od EC do GMC, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), C-natriuretčni peptid (8–10). Omejili se bomo na predpostavko, da je EDHF morebitni derivat CYP, saj smo omenjeni mehanizem preučevali v naši raziskavi.

Po tej predpostavki pride zaradi zvišanja  $[Ca^{2+}]_i$  v EC kot posledice delovanja mehaniških in kemičnih dražljajev do translokacije fosfolipaze  $A_2$  iz citosola na celične membrane, kar povzroči sproščanje arahidonske kisline iz membranskih fosfolipidov (8–11, 21). Pod vplivom delovanja epoksigenez (encimov, katerih aktivno sestavino predstavlja CYP) se arahidonska kislina razgradi na epoksi-kozatrienoične kisline (EET), ki naj bi bile EDHF. EET naj bi difundirale iz EC do GMC in tam aktivirale že omenjene  $BK_{Ca}$ . Raziskovalci so omenjeni mehanizem razkrili bodisi z uporabo selektivnih zaviralcev CYP-epoksigenez, najpogosteje iz skupine CYP 2C, z analogi EET z antagonističnim delovanjem, s snovmi, ki povečajo ekspresijo CYP-epoksigenez in sicer predvsem na koronarnih in ledvičnih arterijah različnih vrst (10, 11, 21–23), morda je vpleten tudi pri regulaciji tonusa v žilah skeletnih mišic (24).

## EDHF in raziskave na ljudeh

V nasprotju s študijami na živalih je bilo na ljudeh narejenih razmeroma malo raziskav, ki bi skušale opredeliti vlogo in naravo EDHF (23), največ seveda na izoliranih žilah. Večina študij je nedvomno potrdila, da praktično v vseh raziskanih žilah obstaja nek mehanizem, ki privede do od endotelija odvisne vazodilatacije, ki ni odvisna od NO ali prostanooidov, medtem ko si izsledki raziskav možnih mehanizmov delovanja EDHF zelo nasprotujejo. Tako so od NO in  $PGI_2$  neodvisno vazodilatacijo potrdili na izoliranih prevodnih žilah, kot sta a. mammaria int. (14, 25, 26) in a. radialis (26), vendar pa so vpletenost CYP dokazali le v eni študiji (25). V ledvični interlobarni arteriji naj bi bili v mehanizmu od NO in  $PGI_2$  neodvisne vazodilatacije vpleteni kalijevi ioni in aktivacija  $Na^+K^+$ -ATPaze in ne CYP (20). Tudi v malih gastroepiploičnih žilah naj EDHF ne bi bil derivat CYP (13). Nesporni pa so dokazi o vpletenosti CYP pri aktivaciji  $BK_{Ca}$  kanalov na GMC v koronarnih arteriolah (22, 27). Zelo

nasprotujoči so si tudi podatki o vpletenosti CYP v izoliranih podkožnih malih uporovnih žilah (28–32). Medtem ko so Coats in sodelavci dokazali, da je ketokonazol, neselektivni zaviralec CYP, zmanjšal od NO in  $PGI_2$  neodvisno vazodilatacijo, ki jo je izzval ACh v podkožnih uporovnih žilah (29), pa v drugih študijah na podkožnih uporovnih žilah vpletenosti CYP niso dokazali (28, 31). Tudi  $K^+$  ioni naj ne bi bili EDHF v podkožnih uporovnih žilah (32), pri nosečnicah pa so pokazali, da naj bi EDHF v slednjih deloval preko mioendotelijskih presledkovnih stikov (30).

Tudi *in vivo* so pokazali, da od NO in  $PGI_2$  neodvisni mehanizem, ki ga lahko pripisemo delovanju EDHF, pomembno prispeva k endotelijski vazodilataciji, najverjetneje z delovanjem na  $K_{Ca}$  kanale (33–36). Izsledki raziskav, ki so skušale opredeliti kemijsko naravo EDHF, pa si nasprotujejo (18, 24, 36–40). Največkrat so za oceno pretokov skozi uporovne žile uporabljali venško okluzijsko pletizmografijo, ki vrednoti pretoke skozi uporovne žile v več tkivih naenkrat (koži in spodaj ležečih tkivih, skeletnih mišicah in maščevju) (35, 41), zaviralce eNOS in COX in endotelijske agoniste, kot sta ACh in BK, pa so v žile vnesli s perfuzijo brahialne arterije.

Zanimive so raziskave, kjer so poleg funkcije EDHF, ki naj bi bil presnovek CYP, dokazali tudi ekspresijo CYP 2C9 v EC preiskovanih žil (24, 25, 27). Nekatere raziskave so pokazale, da naj bi bila vloga EDHF pomembnejša pri boleznih (14, 15, 18, 37). Ob vseh navedenih podatkih je jasno, da vloga EDHF pri človeku še zdaleč ni znana.

## EDHF in mikrocirkulacija kože

Vloga EDHF v mikrocirkulaciji kože ostaja nepojasnjena. V študijah, kjer so z uporabo laser Dopplerjeve (LD) metode in provokacijskih testov, kot sta uporaba raznih endotelijskih agonistov ali reaktivna hiperemija po popustitvi zažema arterije (PRH) (obe sta podrobneje opisani v metodah) ocenjevali pretoke in odzivnost v mikrocirkulaciji kože, so namreč raziskovali le prispevek bodisi NO bodisi prostaglandinov k od endotelija odvisni vazodilataciji. Rezultati si izrazito nasprotujejo (3, 6, 42–45). V spet drugih so vrednotili mehanizem vazodilatacije, ki jo izzove ACh; vazodilatacijo so delno pripisali od NO

in PGI<sub>2</sub> neodvisnemu mehanizmu (46, 47). Spriči pomembne vloge, ki jo ima koža pri uravnavanju telesne temperature, je nujno potrebno poznati tudi lokalne mehanizme, kot je EDHF, pri uravnavanju pretokov v mikrocirkulaciji. Izsledki pa so pomembni tudi s kliničnega vidika, saj je znano, da je pri številnih boleznih, kot je, denimo, sladkorna bolezen, močno okvarjena mikrocirkulacija kože (23, 48, 49). Razen tega je pretoke skozi kožo razmeroma enostavno meriti, saj metode niso invazivne; res pa je, da dobimo le posredno oceno. Obstajajo tudi domneve, da pretoki in odzivnost žil v koži odražajo funkcijo drugih žil, denimo uporovnih arteriol v srcu, in tako nudijo vpogled v stanje koronarnih žil (6, 41, 48, 50). Znano je, da je prispevek EDHF k uravnavanju žilnega tona večji v manjših uporovnih žilah (9, 12, 13) in prav zato je smotrno raziskati tudi njegov pomen v mikrocirkulaciji kože.

## Namen

V naši raziskavi smo želeli osvetliti vlogo in pomen endotelijskega mehanizma, ki ni odvisen od NO in prostanooidov in ga lahko pripišemo delovanju EDHF, v mikrocirkulaciji kože.

Želeli smo izmeriti pretoke v mikrocirkulaciji kože v mirovanju ter oceniti odzivnost mikrocirkulacije na nekatere znane maneuvre, ki izzovejo od endotelija odvisno vazodilatacijo. Nastanek NO in PGI<sub>2</sub> smo zavrlili s sočasnim dodatkom zaviralca endotelijske sintaze NO (eNOS) ter zaviralca ciklooksigenaze (COX). Od endotelija odvisno vazodilatacijo smo ocenjevali z uporabo endotelijskega agonista ACh ter z oceno reaktivne hiperemije po popustitvi arterijskega zažema (PRH). Istočasno smo ocenjevali še vpliv zaviranja eNOS in COX na od endotelija neodvisno vazodilatacijo, izzvano z natrijevim nitroprusidom (NaNP).

Ker naj bi bil v mehanizem nastanka EDHF v nekaterih odsekih žilja in v nekaterih tkivih vpleten CYP 2C9, nas je zanimalo, ali je temu tako tudi v koži. Zato smo zavrlili delovanje CYP 2C9 in ob tem spremljali odzivnost mikrocirkulacije v koži po predhodnem zaviranju eNOS in COX.

Znano je, da je mikrocirkulacija kože prizadeta pri številnih boleznih in da lahko pogosto že pred pojavom kliničnih znakov zaz-

namo funkcionalne spremembe na nivoju endotelija, kot je porušeno razmerje med vazodilatatorji in vazokonstriktorji (48). Obstajajo domneve, da v takih stanjih EDHF prevzame ključno vlogo pri lokalnem uravnavanju mikrocirkulacije v okvarjenih organih. Prav zato je tudi s kliničnega vidika nujno spoznati vlogo EDHF v koži v fizioloških razmerah.

## METODE

### Preiskovanci

V raziskavi je sodelovalo 14 zdravih preiskovancev, nekadilcev, starih od 20 do 37 let (povprečna starost 25,9 ± 1,7 let), ki niso jemali nobenih zdravil in niso bili podvrženi tveganjem za nastanek srčno-žilnih bolezni. Zaradi možnih vplivov spolnih hormonov na meritve smo vključili le preiskovance moškega spola. Vsem smo izmerili normalen srednji arterijski tlak (89,9 ± 3,2 mmHg) in srčni utrip v mirovanju (68,9 ± 2,9 utripov/minuto). Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije. Preiskovanci so med meritvami ležali v sobi z nadzorovano temperaturo; pred izvajanjem meritev so 30 minut mirovali.

### Laser Dopplerjeva metoda

Pretoke v kožni mikrocirkulaciji smo merili na volarni strani podlakti z laser Dopplerjevo (LD) metodo, katere princip je podrobneje opisan drugje (51, 52). Metoda omogoča semikvantitativno merjenje pretokov v mikrocirkulaciji kože (51, 52). Temelji na odboju laserske svetlobe od premikajočih se eritrocitov v žilah, zaradi česar pride do Dopplerjevega učinka: spremeni se frekvenca upadle svetlobe. Končna vrednost pretoka je premosorazmerna številu in hitrosti eritrocitov in jo izrazimo v arbitrarnih perfuzijskih enotah (PE). Za meritve smo uporabljali LD merilec pretoka (Periflux 4001 Master, Perimed, Švedska) z virom laserske svetlobe valovne dolžine 780 nm. Istočasno smo merili pretoke na dveh naključno izbranih mestih na podlakti. Sondi smo namestili na mesta, kjer ni bilo videti površinskih ven, približno 10 cm razmaknjeni eno od druge. Značilni zapis LD pretoka v mirovanju prikazuje slika 1A. Na obeh merilnih mestih smo istočasno merili

temperaturo kože z digitalnim termometrom (Peritemp PF4005, Perimed, Švedska). Ves čas poskusa smo preiskovancem merili tudi arterijski pritisk na digitalni arteriji sredinca (Finapress, Ohmeda 2300) ter standardni elektrokardiogram. Zajem podatkov je bil 500/sek. Analogne signale smo pretvorili v digitalno obliko s pomočjo analogno-digitalnega pretvornika ter jih shranili na osebni računalnik za kasnejšo obdelavo.

### **Intradermalna mikroinjekcija**

Ker smo v raziskavi želeli ovrednotiti vpliv od NO in PGI<sub>2</sub> neodvisnega mehanizma pri uravnavanju pretoka v kožni mikrocirkulaciji, smo morali zavreti delovanje eNOS in COX. V ta namen smo preiskovancem na merilna mesta, kjer smo bili predhodno izmerili LD pretoke v mirovanju, vbrizgali zaviralca: L-NMMA (Clinalfa, Merck-Biosciences, Darmstadt, Nemčija), ki je močan kompetitivni antagonist vseh izooblik NOS, ter diklofenak (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), ki je eden najmočnejših zaviralcev COX. Vpletenost CYP 2C9 pa smo preiskovali tako, da smo njegovo delovanje zavrlili z injekcijo sulfafenazola (Clinalfa, Merck-Biosciences, Darmstadt, Nemčija), ki je specifični zaviralec CYP 2C9 (53). Raztopino, v kateri sta bila raztopljena oba zaviralca (končna konc. L-NMMA je bila 10 mM ter diklofenaka 10 mM, raztopljena v sterilizirani bidestilirani vodi), kot tudi raztopino sulfafenazola (10 mM), smo v kožo vnesli z metodo mikroinjekcije (45, 54, 55). Uporabili smo igle z volumnom 50 µl (30 G, Hamilton, Bonaduz, Švica), s katerimi smo v kožo vnesli 10 µl raztopine. Za kontrolo smo po enakem protokolu vbrizgali fiziološko raztopino. Na mestu injekcije nastane manjši mehurček. Po injekciji smo na rob mehurčka, to je približno 5 mm od vbodnega mesta, namestili LD merilno sondo in spremljali LD pretok.

### **Iontoforeza**

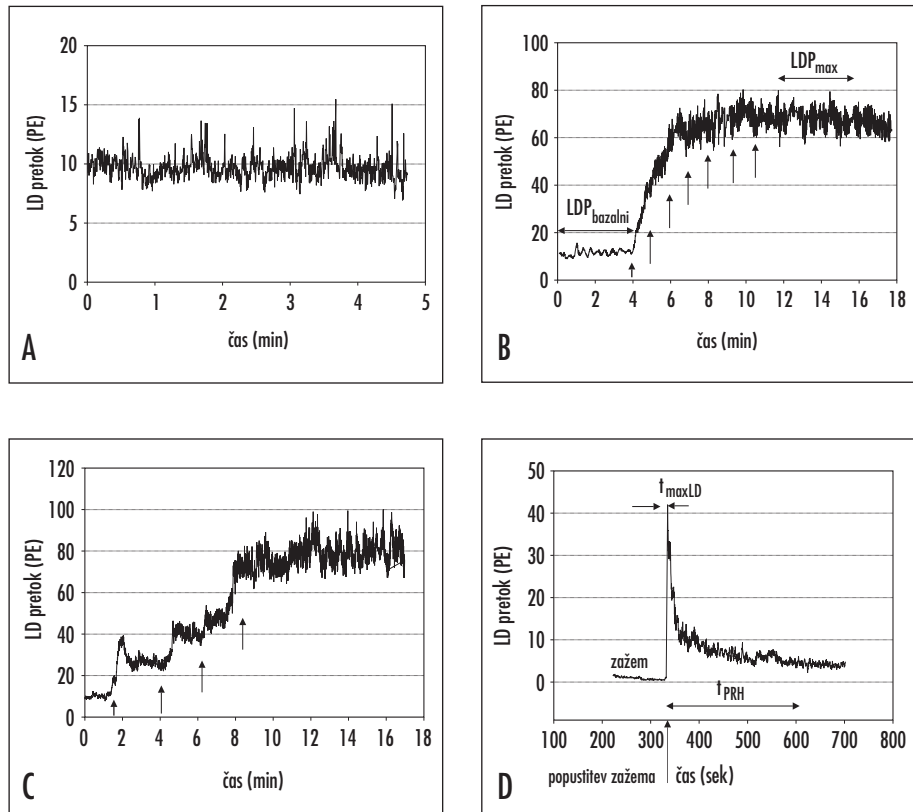
Od endotelija odvisno vazodilatacijo smo ocenjevali z uporabo ACh, od endotelija neodvisno vazodilatacijo pa z uporabo NaNP; obe snovi smo v kožo vnesli z iontoforezo. To je neinvazivna metoda, ki preko napetostnega

polja, ki ga ustvarimo z zunanjim generatorjem toka, omogoča prenos polarnih snovi v kožo (6, 41, 51). Po iontoforezi ACh in NaNP pride do značilne vazodilatacije; učinek omejenih dveh vazodilatatorjev traja več minut, kar lahko spremljamo z merjenjem LD pretokov (41, 51, 54, 56). Značilni zapis odziva LD pretoka na iontoforezo ACh prikazuje slika 1B, odgovor na NaNP pa slika 1C. Uporabljali smo aparat PeriFont (Perimed, Švedska). Blazinico na elektrodi smo prepojili s snovjo, ki smo jo želeli vnesti (ACh oziroma NaNP), ter elektrodo namestili na LD sondo, ki smo jo prilepili na merilno mesto na koži. Referenčno elektrodo smo nalepili 10 cm od LD sonde. Protokol iontoforeze ACh in NaNP smo povzeli po podatkih iz literature (6, 41, 51, 56). Za uporabo pozitivno nabitega ACh (1 % raztopina v sterilni bidestilirani vodi) smo raztopino nanесли na anodo ter vnesli sedem tokovnih sunkov velikosti 0,1 mA; en tokovni sunek je trajal 30 sekund, med posameznimi sunki pa je bilo 30 sekund premora. Raztopino negativno nabitega NaNP (1 % raztopina v sterilni bidestilirani vodi) smo nanесли na katodo in vnesli tri 30 sekund trajajoče tokovne sunke po 0,1 mA, ki jim je sledil 40 sekund trajajoči tokovni sunek velikosti 0,2 mA; med posameznimi sunki je bilo 90 sekund premora.

### **Reaktivna hiperemija po popustitvi zažema**

Za vrednotenje PRH smo preiskovancem z manšeto za merjenje pritiska za tri minute zaželi brahialno arterijo nad sistolični tlak, tako da smo popolnoma prekinili pretok. Po popustitvi zažema pride do prehodnega povečanja pretoka, ki je pretežno lokalni pojav; govorimo lahko o miogeni in metabolični komponenti vazodilatacije. K slednji v veliki meri prispeva tudi endotelij. Metoda nudi zelo posreden vpogled v funkcijo endotelija, saj je znano, da so pri nastanku PRH poleg drugih lokalnih presnovkov udeleženi tudi endoteljski vazodilatatorji (41–43, 56, 57), četudi njihov natančen doprinos in vloga še niso povsem pojasnjeni. LD pretoke smo spremljali na volarni strani podlakti pred, med in po zažemu. Značilni zapis LD odziva na popustitev zažema arterije kaže slika 1D.

Slika 1. Značilni zapis LD signala na volarni strani podlakti pri enem preiskovancu. A. v mirovanju (bazalni pretok), B. odgovor na iontoforezo acetilholina (ACh), C. odgovor na iontoforezo natrijevega nitroprusida (NaNP), D. odgovor na popustitev triminutnega zažema brahialne arterije. Puščice pri A. in B. prikazujejo tokovne sunke. Slika D.:  $t_{\max LD}$  – čas do največjega pretoka po popustitvi zažema,  $t_{PRH}$  – čas trajanja PRH. LD – laser Dopplerjev, PE – perfuzijske enote.



## Potek poskusov

*Protokol 1. Ovrednotiti vpliv zaviranja eNOS in COX na bazalni LD pretok.*

Vsak preiskovanec je na dve ločeni mesti na podlakti prejel injekcijo (10  $\mu$ l), in sicer:

1. raztopino L-NMMA (10 mM končna konc. v raztopini) in diklofenaka (10 mM končna konc. v raztopini) ter
2. fiziološko raztopino kot kontrolno raztopino.

Nato smo nad mesta injekcije namestili merilne LD sonde, kot je opisano zgoraj, in neprekinjeno spremljali LD pretoke še 50 minut.

*Protokol 2. Ovrednotiti vpliv zaviranja eNOS in COX na z ACh izzvano vazodilatacijo.*

Vsakemu preiskovancu smo na dve ločeni mesti na podlakti vbrizgali:

1. 10  $\mu$ l raztopine L-NMMA (10 mM končna konc. v raztopini) in diklofenaka (10 mM končna konc. v raztopini) ter
2. 10  $\mu$ l fiziološke raztopine.

Po 30 minutah smo tri minute merili bazalni LD pretok, to je pretok v mirovanju, nato pa smo izvedli iontoforezo ACh, kot je opisano zgoraj, ter med tem ves čas merili LD pretoke. Po podatkih iz literature in naših

pilotskih poskusih se je namreč izkazalo, da je učinek L-NMMA in diklofenaka največji od 30 do 40 minut po vnosu (45, 55, 58).

*Protokol 3. Ovrednotiti vpliv zaviranja eNOS in COX na z NaNP izzvano vazodilatacijo.* Protokol je bil enak kot protokol 2, le da smo namesto ACh z iontoforezo v kožo vnesli NaNP, kot je opisano v metodah.

*Protokol 4. Ovrednotiti vpliv zaviranja eNOS in COX na PRH.*

30 minut po injekciji 10  $\mu$ l L-NMMA in diklofenaka oziroma fiziološke raztopine (glej zgoraj) smo preiskovancu najprej izmerili bazalni LDF, nato pa smo mu zaželi brahialno arterijo za tri minute. Po popustitvi zažema smo spremljali LD pretok tako dolgo, da se je vrnil na izhodiščno, bazalno vrednost.

*Protokol 5. Ovrednotiti vpliv sulfafenazola na bazalni LD pretok in na z ACh izzvano vazodilatacijo.*

V tem protokolu so preiskovanci na isto merilno mesto dobili dve injekciji. Najprej:

1. 10  $\mu$ l raztopine L-NMMA in diklofenaka ter
2. 10  $\mu$ l fiziološke raztopine.

Po 15 minutah pa smo na isti mesti v kožo injicirali še 10  $\mu$ l raztopine sulfafenazola (10 mM). Po 15 minutah (čas največjega učinka sulfafenazola (37, 39)) smo na vseh treh mestih izmerili bazalni LD pretok, nato pa izvedli iontoforezo ACh, kot je opisano. Enake poskuse smo pri šestih preiskovancih opravili tudi z različnimi koncentracijami sulfafenazola.

*Protokol 6. Ovrednotiti vpliv sulfafenazola na PRH.*

Protokol vbrizgavanja raztopine zaviralcev (L-NMMA in diklofenaka oziroma sulfafenazola) je bil enak kot v protokolu 5. Po enakem času, kot je opisano v protokolu 5, smo preiskovancem zaželi brahialno arterijo za tri minute ter nato popustili zažem in snemali LD pretoke tako dolgo, dokler se niso vrnili na izhodiščno vrednost.

## Zajem in statistična obdelava podatkov

Digitalne signale LD pretokov smo analizirali z računalniškim paketom 'LDDA acquisition system' (Neurocard™ LDDA, Meditronic, Nemčija). Pretok v mirovanju (bazalni pretok) smo

izrazili kot povprečno vrednost meritev v triminutnem posnetku. Odgovor LD pretoka na iontoforezo ACh oziroma NaNP smo določili kot srednjo vrednost meritev triminutnega posnetka po tem, ko je LD pretok dosegel največjo vrednost (plato). Za PRH smo določili največji pretok po popustitvi zažema ( $LD_{max}$ ), čas, ki je potreben, da LDF doseže svojo največjo vrednost ( $t_{maxLD}$ ), čas trajanja PRH ( $t_{PRH}$ ), to je čas, ki je potreben, da LD pretok doseže svojo izhodiščno vrednost, ter površino pod krivuljo PRH (PPK). Največje vrednosti LD pretokov smo izrazili kot odstotek bazalnega LD pretoka za vsakega preiskovanca. Rezultati so podani kot srednje vrednosti in standardne napake srednjih vrednosti. Odzive LD pretoka na opisane provokacijske teste smo vrednotili z analizo variance za ponavljajoče se meritve (ANOVA). Vpliv snovi na odzivnost kožne mikrocirkulacije smo vrednotili z uporabo parnega Studentovega t-testa. Merilo za statistično značilno razliko med obravnavano in kontrolno skupino je bila vrednost p, manjša od 0,05.

Tabela 1. Vrednosti nekaterih hemodinamskih spremenljivk v mirovanju.

Spremenljivka	$X \pm SN$
$LDP_{bazalni}$ (PE)	7,6 $\pm$ 1,8
$T_{kože}$ ( $^{\circ}C$ )	33,2 $\pm$ 0,4
$p_{sist}$ (mm Hg)	133,7 $\pm$ 5,1
$p_{diast}$ (mm Hg)	84,9 $\pm$ 3,5

Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  napake srednjih vrednosti ( $X \pm SN$ ),  $n = 14$ .  $LDP_{bazalni}$  – laser Dopplerjev pretok v mirovanju, PE – perfuzijske enote,  $T_{kože}$  – temperatura kože,  $p_{sist}$  – sistolični arterijski pritisk na digitalni arteriji sredinca,  $p_{diast}$  – diastolični arterijski pritisk na digitalni arteriji sredinca.

## REZULTATI

V tabeli 1 so prikazane vrednosti LD pretokov v mirovanju, temperature kože in arterijskega tlaka v digitalni arteriji sredinca. Po vsakršni mikroinjekciji je prišlo do lokalnega odziva: dviga LD pretoka ter seveda temperature. Znano je, da mikroinjekcija v tkivo povzroči mikrotravmo (54, 55), ki pa je kratkotrajne narave. LD pretok se je do vseh



naslednjih izvajanj (tj. približno 20 minut po injekciji) in meritev že vrnil na izhodiščno vrednost. Mesta, kjer je bil pretok po tem času še bistveno povečan, smo izločili iz nadaljnje obdelave. Nobena od opisanih provokacij ni imela sistemskih učinkov, le pri nekaterih preiskovancih sta se prehodno povečala frekvenca utripa srca in arterijski pritisk, kar je bila najverjetneje posledica aktivacije simpatika zaradi strahu.

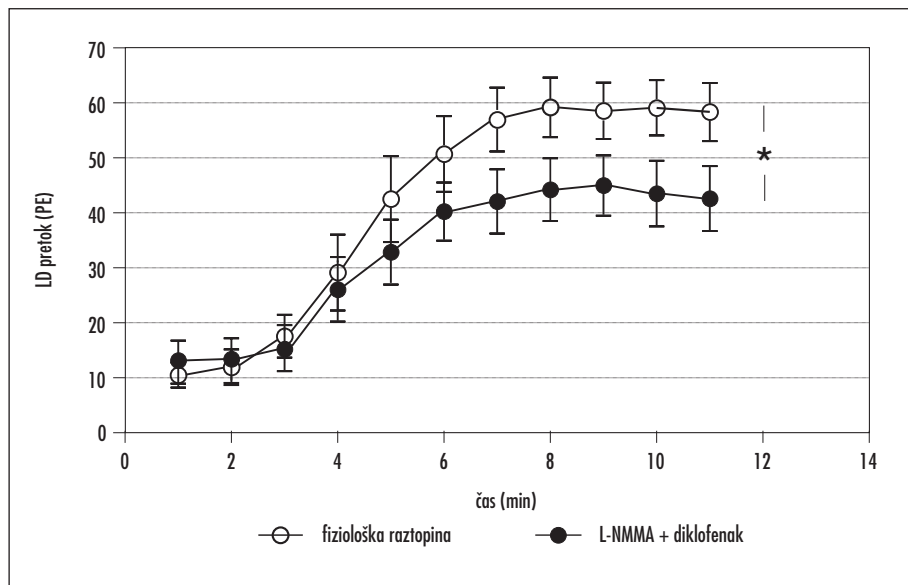
### Vpliv sočasnega zaviranja eNOS in COX na bazalne LD pretoke ter na od endotelija odvisno in od endotelija neodvisno vazodilatacijo

Delovanje eNOS in COX smo sočasno zavirali tako, da smo v kožo vbrizgali raztopino L-NMMA (10 mM) in diklofenaka (10 mM); za kontrolo smo na neodvisno merilno mesto na koži vbrizgali fiziološko raztopino. Po 30 minutah smo izmerili LD pretok v mirovanju ter izvedli iontoforezo ACh za ovrednotenje od endotelija odvisne vazodilatacije ter iontoforezo NaNP za ovrednotenje od endotelija neodvisne vazodilatacije.

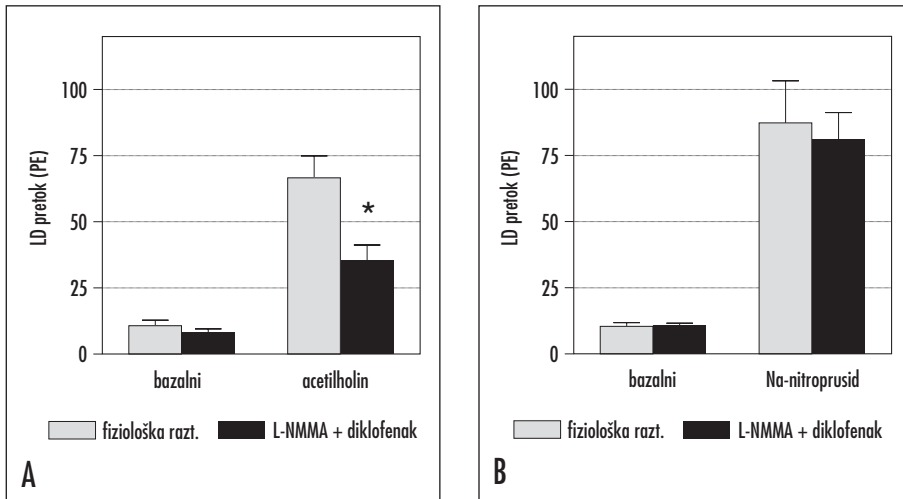
LD pretok v mirovanju se ni značilno razlikoval ( $p = 0,24$ , t-test) med merilnimi mesti, kamor smo bili vbrizgali raztopino L-NMMA in diklofenaka (LD pretok je bil  $12,5 \pm 2,3$  PE na obravnavanem (tretiranem) mestu in  $10,9 \pm 1,8$  PE na kontrolnem mestu), in kontrolnimi mesti (fiziološka raztopina).

ACh je na obeh merilnih mestih, tako obravnavanem (z raztopino L-NMMA in diklofenaka) kot tudi na kontrolnem (fiziološka raztopina), povzročil značilno povečanje pretoka (ANOVA,  $p \leq 0,001$ , sliki 1B in 2). Povečanje pretoka je bilo na mestih, kamor smo bili predhodno injicirali zaviralca eNOS in COX, značilno manjše (t-test,  $p \leq 0,05$ ) kot na kontrolnih mestih (sliki 2 in 3A). Največji pretok po iontoforezi je na kontrolnih mestih narasel na  $643 \pm 86\%$  bazalnega pretoka ter na obravnavanih mestih na  $390 \pm 56\%$  bazalnega pretoka. L-NMMA in diklofenak sta za približno 30% zavrla dvig LD pretoka po uporabi ACh.

Tudi po iontoforezi NaNP je prišlo do značilno povečanega LD pretoka (ANOVA,  $p \leq 0,001$ , sliki 1C in 3B) na obeh merilnih mestih. Pri tem pa nismo zasledili značilnih



Slika 2. Vpliv zaviranja eNOS in COX na bazalni LD pretok in na z ACh izzvano vazodilatacijo. Prikazuje časovni potek pretoka pred in po iontoforezi ACh. LD, laser Dopplerjev, PE perfuzijske enote. Odprti simboli, kontrola (mikroinjekcija fiziološke raztopine), zaprti simboli, mikroinjekcija L-NMMA in diklofenaka. Prikazane so srednje vrednosti  $\pm$  napake srednjih vrednosti.  $n = 12$ , \*,  $p < 0,05$ .



Slika 3. Primerjava odgovora LD pretokov na od endotelija odvisno (iontoforeza ACh) in od endotelija neodvisno (iontoforeza NaNP) vazodilatacijo pod vplivom zaviralcev eNOS in COX. Prikazane so vrednosti bazalnih pretokov in največjih pretokov po iontoforezi: A. ACh in B. NaNP. LD – laser Dopplerjev, PE – perfuzijske enote. Odprti stolpci – kontrola (mikroinjekcija fiziološke raztopine), zaprti stolpci – mikroinjekcija L-NMMA in diklofenaka. Prikazane so srednje vrednosti ± napake srednjih vrednosti.  $n = 12$ , \*,  $p < 0,05$  (kontrola proti L-NMMA + diklofenak).

razlik med merilnima mestoma (obravnavanim in kontrolnim): pretok je na kontrolnih mestih narasel na  $768 \pm 70\%$  bazalnega pretoka ter na obravnavanih mestih na  $733 \pm 54\%$  (slika 3B).

### Vpliv sočasnega zaviranja eNOS in COX na LD pretoke po popustitvi arterijskega zažema

Z zažemom in popustitvijo zažema smo vrednotili vpliv zaviranja eNOS in COX na reaktivno hiperemijo. Po popustitvi zažema je prišlo do prehodno značilnega povečanja LD pretoka (slika 1D) na obravnavanih in kontrolnih mestih. Vrednosti največjega pretoka po popustitvi zažema ( $LD_{max}$ ), časa, ki je potreben, da LD pretok doseže svojo največjo vrednost ( $t_{maxLD}$ ), ter časa trajanja PRH ( $t_{PRH}$ ) se sicer niso statistično razlikovale med obravnavanim (z L-NMMA in diklofenakom) in kontrolnim mestom (fiziološka raztopina), vendar pa so bile p vrednosti zelo blizu statistično značilnim (t-test). Omenjene vrednosti prikazuje tabela 2. Ugotovili pa smo, da je bila površina pod krivuljo PRH (PPK) značilno manjša na mestih, kamor smo bili predhodno vbriz-

gali zaviralca eNOS in COX (slika 4, t-test,  $p < 0,05$ ).

### Vpliv zaviranja CYP 2C9 na bazalne LD pretoke ter na odzivnost mikrocirkulacije kože

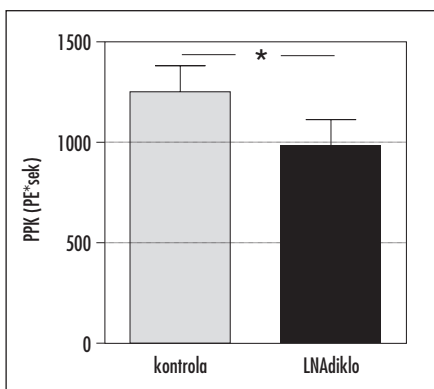
Želeli smo ovrednotiti, ali je v mehanizem, ki uravnava pretok v mikrocirkulaciji kože in ni odvisen od NO in  $PGI_2$ , morda vpleten CYP 2C9. V ta namen smo na obravnavana mesta, kamor smo bili predhodno injicirali L-NMMA in diklofenak, kot tudi na kontrolna mesta (injekcija fiziološke raztopine) v kožo injicirali sulfafenazol različnih koncentracij ter izmerili bazalne LD pretoke. Odzivnost kožne mikrocirkulacije pa smo vrednotili tako, da smo izvedli iontoforezo ACh oziroma zažem brahialne arterije.

Izkazalo se je, da sulfafenazol nima vpliva na bazalne pretoke, saj se vrednosti LD pretokov med vsemi štirimi merilnimi mesti niso razlikovale, kar je razvidno iz tabele 3. Prav tako ni bilo razlik med največjimi LD pretoki po iontoforezi ACh (prikazano na sliki 5), kot tudi med parametri PRH med posameznimi merilnimi mesti. V tabeli 4 so prikazane vrednosti PPK; ostali rezultati niso prikazani.

Tabela 2. Odziv laser Dopplerjevih pretokov na popustitev triminutnega zažema brahialne arterije: vpliv zaviranja eNOS (z L-NMMA) in COX (z diklofenakom).

Spremenljivka	Kontrola	L-NMMA + diklofenak	P
LDP <sub>bazalni</sub> (PE)	11,2 ± 1,5	9,9 ± 0,5	0,42
LDP <sub>max</sub> (PE)	51,9 ± 5,4	42,3 ± 4,9	0,06
t <sub>maxLD</sub> (sek)	7,3 ± 0,9	8,9 ± 1,2	0,09
t <sub>PRH</sub> (sek)	63,9 ± 7,9	51,4 ± 10,5	0,26
PPK (PE × sek)	1252 ± 186	985,4 ± 202	0,02

Prikazane so srednje vrednosti ± napake srednjih vrednosti, n = 10. LDP<sub>bazalni</sub> – laser Dopplerjev pretok v mirovanju, LDP<sub>max</sub> – največji laser Dopplerjev pretok po popustitvi zažema, PE – perfuzijske enote, t<sub>maxLD</sub> – čas po popustitvi zažema, v katerem LD pretok doseže največjo vrednost, t<sub>PRH</sub> – čas trajanja hiperemije po popustitvi zažema, sek – sekunde, PPK – površina pod krivuljo hiperemije. p – verjetnost za napako pri zavrnitvi ničelne hipoteze pri 95 % intervalu zaupanja.

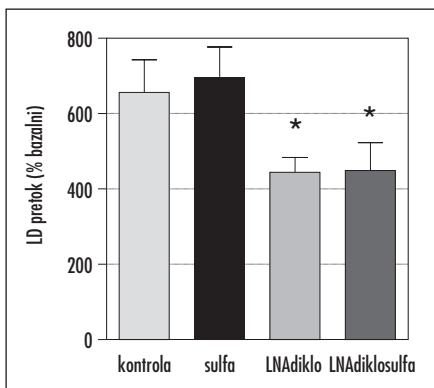


Slika 4. Vpliv zaviranja eNOS in COX na ploščino pod krivuljo (PPK) hiperemije po popustitvi zažema. Odprti stolpci, kontrola (mikroinjekcija fiziološke raztopine), zaprti stolpci, mikroinjekcija L-NMMA in diklofenaka (LNA diklo). Prikazane so srednje vrednosti ± napake srednjih vrednosti. n = 10, \*, p < 0,05.

Tabela 3. Vpliv sulfafenazola, zaviralca CYP 2C9, na laser Dopplerjeve pretoke v mirovanju, brez in v prisotnosti sočasnega zaviranja eNOS in COX.

	Kontrola	L-NMMA + Diklofenak	Sulfafenazol	L-NMMA + diklofenak + sulfafenazol
LDP <sub>bazalni</sub> (PE)	11,6 ± 3,0	8,7 ± 1,5	14,9 ± 3,4	13,2 ± 3,3

Prikazane so srednje vrednosti ± napake srednjih vrednosti. n = 12. LDP<sub>bazalni</sub> – laser Dopplerjev pretok v mirovanju, PE – perfuzijske enote



Slika 5. Vpliv sulfafenazola, selektivnega zaviralca CYP 2C9, na z ACh izzvano vazodilatacijo brez in v prisotnosti zaviralcev eNOS (L-NMMA) in COX (diklofenaka). Največji pretok je prikazan kot % pretoka v mirovanju. Prikazane so srednje vrednosti ± napake srednjih vrednosti. n = 12, \*, p < 0,05 (kontrola proti LNA diklo in sulfa proti LNA diklosulfa). Kontrola, fiziološka raztopina, sulfa, sulfafenazol, LNA diklo, L-NMMA + diklofenak, LNA diklosulfa, L-NMMA + diklofenak + sulfafenazol, LD – laser Dopplerjev.

Tabela 4. Vpliv sulfafenazola na ploščino pod krivuljo (PPK) reaktivne hiperemije po popustitvi zažema, brez in v prisotnosti sočasne zaviranja eNOS (z L-NMMA) in COX (z diklofenakom).

	Kontrola	L-NMMA + Diklofenak	Sulfafenazol	L-NMMA + diklofenak + sulfafenazol
PPK (PE×sek)	1252 ± 186	985 ± 202*	1491 ± 333	1005 ± 196*

Prikazane so srednje vrednosti ± napake srednjih vrednosti. n = 10. PPK, ploščina pod krivuljo hiperemije po popustitvi zažema brahialne arterije, PE×sek, perfuzijske enote krat sekunde. \*, p < 0,05 (kontrola proti L-NMMA + diklofenak in sulfafenazol proti L-NMMA + diklofenak + sulfafenazol).

Tudi višje koncentracije sulfafenazola (do nasičenja raztopine) niso imele vpliva na katerokoli zgoraj omenjeno merjeno spremenljivko (rezultati niso prikazani).

## RAZPRAVLJANJE

V naši raziskavi smo pokazali, da zavrtje delovanja eNOS in COX ne vpliva na bazalne LD pretoke v mikrocirkulaciji kože, povzroči pa značilno zmanjšanje z ACh izzvane vazodilatacije; še vedno pa je ohranjeno 70 % vazodilatacije. Tudi kazalci PRH se po zaviranju eNOS in COX značilno ne spremenijo, razen značilnega zmanjšanja PPK. Rezultati nakazujejo, da ima mehanizem, ki ni odvisen od NO in prostanoidov in ga potencialno pripišemo delovanju EDHF, pomembno vlogo pri uravnavanju mikrocirkulacije v koži. Morebitni EDHF v mikrožilju kože najverjetneje ni derivat CYP 2C9, saj sulfafenazol, ki je selektivni zaviralec CYP 2C9, ni imel vpliva na bazalne LD pretoke ter na odzivnost mikrožilja po dodatku ACh ali zažemu brahialne arterije, tako brez kot tudi v prisotnosti zaviralcev eNOS in COX.

Preden nadaljujemo z razpravo, velja še enkrat poudariti, da rezultati nudijo le posredno oceno o EDHF, saj bi morali za neposredno potrditev obstoja EDHF poleg zaviranja delovanja ostalih znanih endoteljskih vazodilatatorjev dokazati še hiperpolarizacijo GMC ali vsaj zavreti možne tarče delovanja EDHF (K<sub>Ca</sub>-kanale) (8–10). Vse omenjeno pa je v *in vivo* poskusih na ljudeh praktično neizvedljivo, zato se naša tovrstna opažanja lahko opi-  
rajo zgolj na izsledke poskusov, narejenih na živalskih modelih. Vsekakor je to omejitev, zato se zavedamo, da so razglabljanja o možnem EDHF zgolj predpostavke.

## Zaviranje eNOS in COX ne vpliva na bazalne LD pretoke

Pokazali smo, da sočasno zaviranje eNOS in COX ne vpliva na bazalni LD pretok. Omenjeni izsledki so v nasprotju z večino raziskav (omejili se bomo na raziskave na ljudeh), ki so bile opravljene *in vivo* na podlakti in so v veliki večini pokazale zmanjšanje bazalnega pretoka po zavrtju delovanja eNOS in COX (24, 33, 38, 39). Nasprotno pa so v raziskavi, opravljeni na bolnikih s kroničnim popuščanjem srca, ugotovili, da zaviranje eNOS in COX ne vpliva na pretoke v mirovanju (18). Vendar pa je neposredna primerjava naše študije z omenjenimi vprašljiva, saj so pretoke v mikrocirkulaciji merili s pletizmografsko metodo, ki ne omogoča vpogleda zgolj v mikrocirkulacijo kože. Meri namreč pretoke skozi uporovne žile tako v koži kot v globlje ležečih tkivih, najpogosteje maščevju in skeletnih mišicah (35, 41); znano pa je, da se vpliv EDHF zelo razlikuje med različnimi tkivi (9, 34, 35). Primerljivih študij, narejenih na koži, je zelo malo; z uporabo LD metode za oceno pretokov v mikrocirkulaciji kože so preučevali le vpliv bodisi NO bodisi prostanoidov, tudi rezultati si zelo nasprotujejo (3, 6, 42–45). Le v dveh raziskavah so, četudi z drugima zaviralcema kot v naši študiji in z drugačno metodo aplikacije, istočasno zavrla delovanje eNOS in COX in pokazali, da se pri tem bazalni LD pretok ni spremenil (46, 47).

Ob predpostavki, da zavrtje delovanja NO in PGI<sub>2</sub> razkrije delovanje EDHF, lahko sklepamo, da EDHF pomembno prispeva k nadzoru žilnega tonusa v mirovanju. Znano je, da je pomemben dražljaj za sproščanje EDHF iz endotelija strižna sila (7), torej lahko predpo-

stavimo, da je slednja že v mirovanju dovolj velika, da povzroči sproščanje EDHF (zadosten dvig  $[Ca^{2+}]$  v EC). Po drugi strani pa so ugotovili, da je lahko vloga EDHF precenjena, če zavremo delovanje eNOS in COX, kajti pokazali so, da pride hitro do kompenzatornega povečanja ostalih vazodilatatorjev (9, 35). V več raziskavah so pokazali tudi, da endotelijski vazodilatatorji medsebojno vplivajo drug na drugega. NO naj bi zaviral delovanje EDHF (59, 60); šele ko zavremo delovanje NO, naj bi se 'razkrila' od EDHF odvisna vazodilatacija. Zato v mnogih študijah govorijo o EDHF kot o 'nadomestnem' (v angleščini 'back-up') vazodilatatorju, ki pride do izraza ob zmanjšanem delovanju ostalih vazodilatatorjev, denimo NO (9, 10, 18, 59, 60). S tem mehanizmom lahko tudi razložimo pomemben pomen EDHF pri bolezenskih stanjih, kjer je zaradi zmanjšane funkcije endotelija zmanjšano izločanje NO in v tem primeru EDHF omogoča vazodilatatorno odziv. Seveda bi bila ena od možnih razlag, zakaj ni prišlo do zmanjšanja pretoka po zaviranju eNOS in COX, tudi ta, da zaviranje ni bilo popolno. Ta razlaga se zdi manj verjetna, kajti tudi če smo zvišali koncentracijo zaviralcev, nismo opazili učinka na bazalni LD pretok. Še več: zaviranje eNOS in COX je povzročilo zmanjšanje od ACh odvisne vazodilatacije. ACh poveča pretok, kar seveda zaradi hitrejšega izplavljanja povzroči razredčitev snovi na mestu delovanja, torej bi prej pričakovali vpliv zaviralcev eNOS in COX na bazalni LD pretok kot na z ACh izzvano vazodilatacijo.

### **Zaviranje eNOS in COX ne prepreči od endotelija odvisne vazodilatacije**

Od endotelija odvisno vazodilatacijo smo ocenjevali z iontoforezo ACh, od endotelija neodvisno pa z iontoforezo NaNP. Ugotovili smo, da je bila z ACh izzvana vazodilatacija po zaviranju eNOS in COX značilno zmanjšana, ne pa zavrta, saj je še vedno dosegla skoraj 70 % maksimalne vazodilatacije. Nasprotno pa zaviranje eNOS in COX ni vplivalo na od endotelija neodvisno vazodilatacijo, izzvano z NaNP. V večini raziskav so prav tako

pokazali, da je vazodilatacija po zaviranju eNOS in COX ohranjena, četudi zmanjšana (18, 33–35, 37, 39). Kot smo že omenili, pa so za oceno pretokov uporabljali pletizmografsko metodo, zato primerjava ni povsem na mestu. Edini dve raziskavi, ki so ju naredili na koži in s katerima so raziskovali mehanizem delovanja ACh na endotelij, sta prav tako pokazali zmanjšanje od ACh odvisne vazodilatacije ob istočasnem zaviranju eNOS in COX (46, 47). V omenjenih dveh študijah pa niso vrednotili od endotelija neodvisne vazodilatacije, razen tega so za uporabo zaviralcev in ACh uporabljali mikrodiializo, ki je bolj invazivna od mikroinjekcije, kot zaviralec eNOS pa so uporabili L-NAME (metilni ester L-nitroarginina). Četudi je slednji močnejši zaviralec eNOS (58), pa se zdi uporaba L-NMMA bolj utemeljena, saj naj bi imel L-NAME tudi antiholinergični učinek, kar seveda lahko vpliva na delovanje ACh (61). V mnogih študijah so za oceno od NO in  $PGI_2$  neodvisnega mehanizma od endotelija odvisne vazodilatacije raje kot ACh uporabljali BK (15, 33, 39). ACh naj bi, za razliko od BK, namreč v večji meri deloval na eNOS kot na ostale vazodilatatorne sisteme (34, 35). Vendar pa so v drugih raziskavah, opravljenih na ljudeh *in vivo*, dokazali z ACh odvisno vazodilatacijo, ki je bila prisotna tudi po zavrtju delovanja NOS in COX, ter jo pripisali EDHF (18, 35, 37, 40). Poleg tega je ACh za uporabo s pomočjo iontoforeze neprimerno bolj uporaben kot BK (41, 56), saj je po uporabi BK variabilnost zelo velika; Newton (41) je pokazal celo 70 % koeficient variabilnosti po iontoforezi BK. Na izoliranih podkožnih (subkutanih) uporovnih arterijah, ki so jih tretirali z zaviralci eNOS in COX, so celo pokazali, da ACh privede do hiperpolarizacije (28). Zanimiva je tudi raziskava na enakih žilah, ki je pokazala, da kombinacija apamina (zaviralec  $SK_{Ca}$ ) in karibdotoksina (zaviralec  $IK_{Ca}$  in  $BK_{Ca}$ ) popolnoma zavre z ACh izzvano, od NO in  $PGI_2$  neodvisno vazodilatacijo (29, 32), kar kaže na vlogo  $K_{Ca}$  kanalov in morebitni EDHF v podkožnih žilah. Če se opiramo na izsledke omenjenih raziskav, lahko z ACh izzvano vazodilatacijo v naši študiji, do katere pride tudi po zaviranju eNOS in COX, pripišemo delovanju EDHF. Ker pa je znano, da so vplivi endotelijskih vazodilatatorjev (NO,

PGI<sub>2</sub> in EDHF) na mikrocirkulacijo in njihove medsebojne interakcije močno odvisni od uporabljenega agonista (34, 35, 41), rezultatov ne smemo posplošiti. Za osvetlitev prispevka EDHF k aktivni vazodilataciji v koži so vsekakor potrebne dodatne raziskave z uporabo drugih agonistov.

### **Vpliv zaviranja eNOS in COX na PRH**

Kot eno od mer za oceno endotelijske funkcije smo uporabili hiperemijo po popustitvi zažema. Test PRH zelo posredno simulira delovanje strižne sile, saj po popustitvi zažema pretok močno naraste zaradi delovanja metaboličnih mediatorjev, ki so se nakopičili v tkivu zaradi hipoksije (41, 43, 56, 57); prav strižna sila pa je znani dražljaj za izločanje endotelijskih vazodilatatorjev, torej tudi EDHF. Rezultati so pokazali, da zaviranje eNOS in COX ni vplivalo na največji pretok po popustitvi zažema, niti na čas, ki preteče, preden LD pretok doseže svojo največjo vrednost ( $t_{\max,LD}$ ), niti na čas trajanja PRH. V nasprotju z ostalimi kazalci pa je bila značilno manjša površina pod krivuljo PRH. Zmanjšanje PRH kaže, da je dejansko prišlo do zavrtja delovanja COX in eNOS, kar lahko potrdi ustreznost naše metode (intradermalna mikroinjekcija zaviralcev). Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da so pri mehanizmu nastanka hiperemije po popustitvi zažema prispevki drugih vazodilatatorjev pomembnejši kot NO in PGI<sub>2</sub>. To je lahko denimo EDHF, seveda pa gre tu še za množico metaboličnih dejavnikov, ki se iz endotelija sproščajo zaradi hipoksije. V literaturi ne zasledimo podatkov o podobnih raziskavah na koži, saj so ločeno vrednotili le vplive samo NO ali samo prostanooidov na PRH; rezultati so si spet zelo nasprotujoči (41–43, 56, 57). V *in vivo* pogojih v mirovanju je na ljudeh praktično nemogoče uporabiti kakšen drug test, ki bi vrednotil zgolj vplive strižne sile na endotelij; alternativa je seveda telesna aktivnost, med katero pa je težko meriti LD pretoke. Razen tega je znano, da se razmere nadzora žilnega tonusa med telesno aktivnostjo bistveno spremenijo (2, 4).

### **Karakterizacija od NO in PGI<sub>2</sub> neodvisne vazodilatacije: EDHF ni produkt citokroma P450 2C9**

Želeli smo tudi opredeliti naravo EDHF: zanimalo nas je, ali je v 'od NO in prostanooidov neodvisni' mehanizem vpleten CYP 2C9. Izkazalo se je, da sulfafenazol, ki je selektivni zaviralec CYP 2C9, ne vpliva niti na bazalne LD pretoke niti na odzivnost mikrožilja po dodatku ACh ali zažemu brahialne arterije, kar kaže na to, da morebitni EDHF v mikrožilju kože najverjetneje ni derivat CYP 2C9. Za selektivni zaviralec CYP 2C9 (53) smo se odločili zato, ker so na mnogih žilah živali in človeka dokazali prav vpletenost te izooblike CYP pri nastanku odgovora, ki ga posreduje EDHF (9, 11, 23, 37, 39). Razen tega so pokazali, da manj selektivni zaviralci CYP delujejo tudi na K<sub>Ca</sub> kanale na celičnih membranah, ki so domnevno končna tarča delovanja EDHF, ter celo vplivajo na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> v EC, kar je ključen proces pri nastanku EDHF (9, 62). Vse omenjeno seveda močno omaja relevantnost študij, kjer so uporabljali izoformno nespecifične zaviralce CYP (29, 36, 38), in tudi ne dopušča primerjave z našo študijo. Samo v treh *in vivo* raziskavah na uporovnih žilah, kjer so merili pretoke s pletizmografsko metodo, so kot zaviralec CYP uporabljali sulfafenazol (24, 39, 40). Rezultati naše študije so skladni z omenjenimi študijami, kjer pri zdravih preiskovancih prav tako niso dokazali vpletenosti CYP 2C9 pri nastanku EDHF. Nasprotno pa so pri bolnikih z esencialno hipertenzijo Taddei in sodelavci pokazali, da sulfafenazol zmanjša od NO in PGI<sub>2</sub> neodvisno vazodilatacijo (40), kar kaže na vpletenost CYP 2C9 pri bolezenskih procesih in je skladno s predpostavko, da naj bi bil EDHF kompenzatorni vazodilatator v stanjih, ko je vloga NO okrnjena. Zanimiva je tudi študija Hilliga in sodelavcev, ki so pokazali vpletenost CYP 2C9 izooblike pri hiperemiji v mikrocirkulaciji skeletnih mišic med telesno vadbo (24). Prav tako so z uporabo sulfafenazola dokazali pomembno vpletenost CYP 2C9 pri vazodilatatornem odgovoru večjih prevodnih žil (37, 63). Vse omenjeno tako lahko potrjuje predpostavko o različni identiteti EDHF med tkivi in odseki žilja (uporovne in prevodne

žile) kot tudi med fiziološkimi procesi (mirovanje in telesna aktivnost).

Seveda pa ne moremo povsem izključiti možnosti, da sulfafenazol ni docela zavrl delovanja CYP, četudi višje koncentracije sulfafenazola (do nasičene raztopine) prav tako niso vplivale na rezultat. Uporabnost naše študije je tako omejena zaradi metode, s katero smo v kožo vnesli snovi: tako sulfafenazol kot tudi L-NMMA in diklofenak. Mikroinjekcija namreč ne omogoča merjenja koncentracije snovi *in situ*. Tako ne vemo, kakšna je bila koncentracija sulfafenazola v tkivu in kako hitro se je izplavljala. To pa je tudi pomislek pri vseh metodah, ki skušajo *in vivo* oceniti stanje mikrocirkulacije kože, saj ni metode, ki bi omogočala neposredno *in situ* merjenje snovi.

## ZAKLJUČEK

Na podlagi rezultatov naše študije lahko zaključimo, da ima endoteljski vazodilatatorni mehanizem, ki ni odvisen od NO in prostanooidov in ga potencialno lahko pripišemo delovanju EDHF, pomembno vlogo pri nadzoru in uravnavanju mikrocirkulacije v koži, tako v mirovanju kot tudi v stanjih povečanega pretoka. EDHF v koži najverjetneje ni derivat CYP 2C9, kar potrjuje domnevo o več identitetah EDHF v različnih tkivih. Potrebne so temeljite nadaljnje raziskave tako na zdravih kot tudi na bolnih preiskovancih, ki bodo bolje osvetlile pomen EDHF pri človeku, nedvomno pa njegova vloga še zdaleč ni zanemarljiva.

## LITERATURA

- Roddie IC. Circulation to skin and adipose tissue. In: Shepherd JT, Geiger SR, eds. Handbook of Physiology. The Cardiovascular System-Peripheral Circulation and Organ Blood Flow. Bethesda: American physiology society; 1983. p. 285-309.
- Rowell LB. Human Cardiovascular Control. New York, Oxford: Oxford University Press; 1993.
- Coffman JD. Effects of Endothelium-derived Nitric Oxide on Skin and Digital Blood Flow in Humans. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1994; 267 (36): H2087-90.
- Johnson JM. Physical Training and the Control of Skin Blood Flow. Med Sci Sports Exerc 1998; 30 (3): 382-6.
- Kellogg DL Jr. In Vivo Mechanisms of Cutaneous Vasodilation And Vasoconstriction In Humans During Thermoregulatory Challenges. J Appl Physiol 2006; 100 (5): 1709-18. Review.
- Khan F, Davidson NC, Littleford RC, et al. Cutaneous Vascular Responses to Acetylcholine are Mediated by a Prostanoid-dependent Mechanism in Man. Vasc Med 1997; 2: 82-6.
- Busse R, Fleming I. Regulation of Endothelium-derived Vasoactive Autocoid Production by Hemodynamic Forces. Trends Pharmacol Sci 2003; 24 (1): 24-9. Review.
- Busse R, Edwards G, Félétou M, et al. EDHF: Bringing the Concepts Together. Trends Pharmacol Sci 2002; 23 (8): 374-80. Review.
- de Wit C, Wölfle SE. EDHF and Gap Junctions: Important Regulators of Vascular Tone within the Microcirculation. Curr Pharm Biotechnol 2007; 8 (1): 11-25.
- McGuire JJ, Ding H, Triggler CR. Endothelium-derived Relaxing Factors: a Focus on Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor(s). Can J Physiol Pharmacol 2001; 79 (6): 443-70. Review.
- Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF Synthase in Coronary Arteries. Nature 1999; 401 (6752): 493-7.
- Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, et al. The Importance of the Hyperpolarizing Mechanism Increases as the Vessel Size Decreases in Endothelium-dependent Relaxations in Rat Mesenteric Circulation. J Cardiovasc Pharmacol 1996; 28 (5): 703-11.
- Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, et al. Importance Of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor In Human Arteries. J Clin Invest 1997; 100 (11): 2793-9.
- Deja MA, Golba KS, Widenka K, et al. Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors Reveal Non-NO-, Non-prostacycline-mediated Endothelium-dependent Relaxation in Internal Thoracic Artery of Hypertensive Patients. Int J Cardiol 2005; 102 (3): 455-60.
- Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, et al. Vasodilation to Bradykinin is Mediated by an Ouabain-sensitive Pathway as a Compensatory Mechanism for Impaired Nitric Oxide Availability in Essential Hypertensive Patients. Circulation 1999; 100 (13): 1400-5.
- Najibi S, Cohen RA. Enhanced Role of K<sup>+</sup> Channels in Relaxations of Hypercholesterolemic Rabbit Carotid Artery to NO. Am J Physiol 1995; 269 (3 Pt 2): H805-11.
- Minami A, Ishimura N, Harada S, et al. Exercise Training Improves Acetylcholine-induced Endothelium-dependent Hyperpolarization in Type 2 Diabetic Rats, Otsuka Long-evans Tokushima Fatty Rats. Atherosclerosis 2002; 162 (1): 85-92.

18. Katz SD, Krum H. Acetylcholine-mediated Vasodilation in the Forearm Circulation of Patients with Heart Failure: Indirect Evidence for the Role of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor. *Am J Cardiol* 2001; 87 (9): 1089-92
19. Mantelli L, Amerini S, Ledda F. Roles of Nitric Oxide and Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Vaso-relaxant Effect of Acetylcholine as Influenced by Aging and Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25 (4): 595-602.
20. Büssemaker E, Popp R, Binder J, et al. Characterization of the Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) Response in the Human Interlobar Artery. *Kidney Int* 2003; 63 (5): 1749-55.
21. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, et al. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-derived Hyperpolarizing Factors. *Circ Res* 1996; 78 (3): 415-23.
22. Miura H, Gutterman DD. Human Coronary Arteriolar Dilation to Arachidonic Acid Depends on Cytochrome P450 Monooxygenase and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels. *Circ Res* 1998; 83 (5): 501-7.
23. Yanga Q, Yima AP, He GW. The Significance of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in the Human Circulation. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5 (1): 85-92. Review.
24. Hillig T, Krustup P, Fleming I, et al. Cytochrome P450 2C9 Plays an Important Role in the Regulation of Exercise-induced Skeletal Muscle Blood Flow and Oxygen Uptake in Humans. *J Physiol* 2003; 546 (Pt 1): 307-14.
25. Archer SL, Gragasin FS, Wu X, et al. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal Mammary Artery is 11, 12-epoxyeicosatrienoic Acid and Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BK(Ca) Channels. *Circulation* 2003; 107 (5): 769-76.
26. Hamilton CA, Williams R, Pathi V, et al. Pharmacological Characterisation of Endothelium-dependent Relaxation in Human Radial Artery: Comparison with Internal Thoracic Artery. *Cardiovasc Res* 1999; 42 (1): 214-23.
27. Larsen BT, Miura H, Hatoum OA, et al. Epoxyeicosatrienoic and Dihydroxyeicosatrienoic Acids Dilate Human Coronary Arterioles via BK(Ca) Channels: Implications for Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Feb; 290 (2): 491-9.
28. Buus NH, Simonsen U, Pilegaard HK, et al. Nitric Oxide, Prostanoid and Non-NO, Non-prostanoid Involvement in Acetylcholine Relaxation of Isolated Human Small Arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 129 (1): 184-92.
29. Coats P, Johnston F, Macdonald J, et al. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor: Identification and Mechanisms of Action in Human Subcutaneous Resistance Arteries. *Circulation* 2001; 103 (12): 1702-8.
30. Lang NN, Luksha L, Newby DE, et al. Connexin 43 Mediates Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor-induced Vasodilatation in Subcutaneous Resistance Arteries from Healthy Pregnant Women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292 (2): H1026-32.
31. Luksha L, Nisell H, Klubickiene K. The Mechanism of EDHF-mediated Responses in Subcutaneous Small Arteries from Healthy Pregnant Women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286 (6): R1102-9.
32. McIntyre CA, Buckley CH, Jones GC, et al. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor and Potassium Use Different Mechanisms to Induce Relaxation of Human Subcutaneous Resistance Arteries. *Br J Pharmacol* 2001; 133 (6): 902-8.
33. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, et al. Bradykinin-induced Vasodilation of Human Forearm Resistance Vessels is Primarily Mediated by Endothelium-dependent Hyperpolarization. *Hypertension* 2000; 35 (6): 1314-8.
34. Inokuchi K, Hirooka Y, Shimokawa H, et al. Role of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Human Forearm Circulation. *Hypertension* 2003; 42 (5): 919-24.
35. Schrage WG, Dietz NM, Eisenach JH, et al. Agonist-dependent Variability of Contributions of Nitric Oxide and Prostaglandins in Human Skeletal Muscle. *J Appl Physiol* 2005; 98 (4): 1251-7.
36. Ueda K, Goto C, Jitsuiki D, et al. The Nicorandil-induced Vasodilation in Humans is Inhibited by Miconazole. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45 (4): 290-4.
37. Fischer D, Landmesser U, Spiekermann S, et al. Cytochrome P450 2C9 is Involved in Flow-dependent Vasodilatation of Peripheral Conduit Arteries in Healthy Subjects and in Patients with Chronic Heart Failure. *Eur J Heart Fail* 2007; 9 (8): 770-5.
38. Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, et al. Characterization of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in the Human Forearm Microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280 (6): H2470-7.
39. Passauer J, Büssemaker E, Lässig G, et al. Baseline Blood Flow and Bradykinin-induced Vasodilator Responses in the Human Forearm are Insensitive to the Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) Inhibitor Sulphaphenazole. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105 (4): 513-8.
40. Taddei S, Versari D, Cipriano A, et al. Identification of a Cytochrome P450 2C9-derived Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Essential Hypertensive Patients. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48 (3): 508-15.
41. Newton DJ, Khan F, Belch JJ. Assessment of Microvascular Endothelial Function in Human Skin. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101 (6): 567-72.
42. Abou-Elenin K, Xydakis A, Hamdy O, et al. The Effect of Aspirin and Various Iontophoresis Solution Vehicles on Skin Microvascular Reactivity. *Microvasc Res* 2002; 63 (1): 91-5.



43. Dalle-Ave A, Kubli S, Golay S, et al. Acetylcholine-induced Vasodilation and Reactive Hyperemia are not Affected by Acute Cyclo-oxygenase Inhibition in Human Skin. *Microcirculation* 2004; 11 (4): 327-36.
44. Kvandal P, Stefanovska A, Veber M, et al. Regulation of Human Cutaneous Circulation Evaluated by Laser Doppler Flowmetry, Iontophoresis, and Spectral Analysis: Importance of Nitric Oxide and Prostaglandines. *Microvasc Res* 2003; 65 (3): 160-71. Erratum In: *Microvasc Res* 2006; 71 (3): 227.
45. Warren JB. Nitric Oxide and Human Skin Blood Flow Responses to Acetylcholine and Ultraviolet Light. *FASEB J* 1994; 8 (2): 247-51.
46. Holowatz LA, Thompson CS, Minson CT, et al. Mechanisms of Acetylcholine-Mediated Vasodilatation in Young and Aged Human Skin. *J Physiol* 2005; 563 (Pt 3): 965-73.
47. Kellogg DL Jr, Zhao JL, Coey U, et al. Acetylcholine-induced Vasodilation is Mediated by Nitric Oxide and Prostaglandins in Human Skin. *J Appl Physiol* 2005; 98 (2): 629-32.
48. Andreassen AK, Gullestad L, Holm T, et al. Endothelium-dependent Vasodilation of the Skin Microcirculation in Heart Transplant Recipients. *Clin Transplant* 1998; 12 (4): 324-32.
49. Veves A, Saouaf R, Donaghue VM, et al. Aerobic Exercise Capacity Remains Normal Despite Impaired Endothelial Function in the Micro- and Macrocirculation of Physically Active IDDM Patients. *Diabetes* 1997; 46 (11): 1846-52.
50. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close Relation of Endothelial Function in the Human Coronary and Peripheral Circulations. *J Am Coll Cardiol* 1991; 26 (5): 1235-41.
51. Morris SJ, Shore AC. Skin Blood Flow Responses to the Iontophoresis of Acetylcholine and Sodium Nitroprusside in Man: Possible Mechanisms. *J Physiol* 1996; 496 (Pt 2): 531-42.
52. Nilsson GE. Perimed LDV Flowmeter. In: Sheperd AP, Oberg PA, Eds. *Laser-Doppler Blood Flowmetry*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1990. P.57-72.
53. Mancy A, Dijols S, Poli S, et al. Interaction of Sulfaphenazole Derivatives with Human Liver Cytochromes P450 2C: Molecular Origin of the Specific Inhibitory Effects of Sulfaphenazole on CYP 2C9 and Consequences for the Substrate Binding Site Topology Of CYP 2C9. *Biochemistry* 1996; 35 (50): 16205-12.
54. Leslie SJ, Affolter J, Denvir MA, et al. Validation of Laser Doppler Flowmetry Coupled with Intra-dermal Injection for Investigating Effects of Vasoactive Agents on the Skin Microcirculation in Man. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59 (2): 99-102.
55. Wenzel RR. Minimal Invasive in Vivo Pharmacology: News of a New Method Holding Promise in Nephrology-related Research. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (4): 649-51. Review.
56. Kubli S, Waeber B, Dalle-Ave A, et al. Reproducibility of Laser Doppler Imaging of Skin Blood Flow as a Tool to Assess Endothelial Function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36 (5): 640-8.
57. Wong BJ, Wilkins BW, Holowatz LA, et al. Nitric Oxide Synthase Inhibition Does not Alter the Reactive Hyperemic Response in the Cutaneous Circulation. *J Appl Physiol* 2003; 95 (2): 504-10.
58. Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, et al. Inhibitors of Nitric Oxide Synthase in Human Skin. *J Invest Dermatol* 1996; 106 (1): 113-8.
59. Bauersachs J, Popp R, Hecker M, et al. Nitric Oxide Attenuates the Release of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor. *Circulation* 1996; 94 (12): 3341-7.
60. Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric Oxide Exerts Feedback Inhibition on EDHF-induced Coronary Arteriolar Dilatation in Vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279 (2): H459-65.
61. Buxton IL, Cheek DJ, Eckman D, et al. N<sup>G</sup>-nitro L-arginine Methyl Ester and Other Alkyl Esters of Arginine are Muscarinic Receptor Antagonists. *Circ Res* 1993; 72 (2): 387-95.
62. Alvarez J, Montero M, Garcia - Sancho J. High Affinity Inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> Channels by Cytochrome P-450 Inhibitors. *J Biol Chem* 1992; 267 (17): 11789-93.
63. Bellien J, Joannides R, Iacob M, et al. Evidence for a Basal Release of a Cytochrome-related Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in the Radial Artery in Humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290 (4): H1347-52.

Prispelo 14. 1. 2008