

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

**Bartłomiej Guzik**

# **Rola anionu ponadtlenkowego w etiopatogenezie tętniaków aorty brzusznej**

*Praca doktorska*

Promotor:

Dr hab. n. med. Krzysztof Żmudka

Zakład Hemodynamiki i Angiokardiografii  
Instytutu Kardiologii Collegium Medicum UJ w Krakowie  
*Kierownik: dr hab. n. med. Krzysztof Żmudka*

Kraków, 2006

## Podziękowania

Dziękuję promotorowi, panu dr. hab. Krzysztofowi Żmudce, za cierpliwość i okazaną pomoc oraz panu prof. dr. hab. Andrzejowi Cencorze, wraz z zespołem, za umożliwienie realizacji projektu.

Pragnę też podziękować całej mojej rodzinie, Mamie za liczne wskazówki merytoryczne i nieocenioną pomoc, Ojcu za nieustające wsparcie i za wiarę we mnie.

Szczególnie dziękuję Bratu, za pomoc zarówno podczas realizacji badań, jak i ich ocenie, interpretacji i przelaniu na papier. Jego wskazówki oraz krytyczne uwagi pozwoliły mi osiągnąć zamierzony cel naukowy.

Wyrazy wdzięczności kieruję również do Kierownika i Zespołu Katedry Farmakologii CM UJ za udostępnienie warsztatu badawczego, cenne rady i wielką życzliwość.

Dziękuję całemu zespołowi Zakładu Hemodynamiki i Angiokardiografii IK CM UJ za wyrozumiałość oraz wsparcie.

# Spis treści

I. Wstęp .....	6
I.1. Wprowadzenie .....	6
I.1.1. Budowa aorty .....	7
I.2. Tętniaki aorty brzusznej .....	10
I.2.1. Definicja .....	10
I.2.2. Epidemiologia .....	11
I.2.3. Charakterystyka ogólna .....	11
I.2.4. Etiopatogeneza .....	13
I.2.4.1. Czynniki ryzyka rozwoju tętniaka .....	14
I.2.4.2. Dysfunkcja śródbłonna .....	15
I.2.4.3. Proces zapalny .....	18
I.2.4.4. Proteolityczna degradacja elementów tkanki łącznej .....	20
I.2.4.5. Biomechaniczne urazy ściany aorty .....	22
I.2.4.6. Czynniki genetyczne .....	22
I.3. Rola wolnych rodników tlenowych w powstawaniu tętniaków aorty brzusznej .....	23
I.3.1. Wolne rodniki tlenowe .....	24
I.3.1.1. Stres oksydacyjny .....	24
I.3.2. Rola reaktywnych form tlenu (ROS) w regulacji mechanizmów powstawania tętniaków aorty brzusznej .....	26
I.3.2.1. Znaczenie ROS w procesie zapalnym .....	26
I.3.2.2. Regulacja procesu proteolizy .....	26
I.3.2.3. Apoptoza a stres oksydacyjny .....	27
I.3.2.4. Angiotensyna II .....	27
I.3.2.5. Peroksydacja lipidów .....	29
I.3.3. Enzymatyczne źródła wolnych rodników .....	29
I.3.3.1. NAD(P)H oksydaza .....	29
I.3.3.2. Oksydaza ksantynowa .....	30
I.3.3.3. Cyklooksygenazy .....	31
I.3.3.4. Oksydazy mitochondrialne .....	31
I.3.3.5. Syntaza tlenku azotu .....	31

I.4. Klinika tętniaków aorty brzusznej .....	33
I.4.1. Charakterystyka kliniczna .....	33
I.4.2. Ocena ryzyka .....	34
I.4.3. Leczenie .....	35
I.4.4. Rokowanie .....	37
II. Cele pracy .....	38
III. Materiał .....	39
IV. Metodyka .....	40
IV.1. Protokół badania .....	40
IV.2. Ocena ogólnoustrojowych parametrów stresu oksydacyjnego .....	42
IV.3. Ocena produkcji i źródeł anionu nadtlenkowego .....	42
IV.4. Histochemiczna ocena produkcji anionu nadtlenkowego .....	47
IV.5. Analiza statystyczna .....	47
V. Wyniki .....	49
V.1. Charakterystyka kliniczna chorych z AAA .....	49
V.2. Charakterystyka morfologiczna tętniaków aorty .....	51
V.3. Oznaczenia poziomu stresu oksydacyjnego .....	52
V.3.1. Porównanie cech klinicznych grup badanych .....	52
V.3.2. Poziom stresu oksydacyjnego w poszczególnych grupach .....	53
V.3.3. Poziom MDA a produkcja anionu nadtlenkowego. ....	55
V.4. Produkcja anionu nadtlenkowego .....	55
V.5. Źródła enzymatyczne anionu nadtlenkowego .....	57
V.5.1. Enzymatyczne źródła anionorodnika nadtlenkowego .....	57
V.5.2. Syntaza tlenu azotu .....	58
V.5.3. Stymulacja przy pomocy NADPH .....	59
V.5.4. Rola kinazy białkowej C w regulacji produkcji anionu nadtlenkowego .....	60
V.6. Histochemiczna lokalizacja anionu nadtlenkowego .....	61
V.7. Znaczenie parametrów klinicznych w produkcji anionu nadtlenkowego .....	62
V.7.1. Wpływ czynników ryzyka na produkcję $O_2^-$ w ścianie AAA .....	62
V.7.2. Skala Vanzetto .....	63
V.8. Wielkość tętniaka a produkcja anionu nadtlenkowego .....	64
V.9. Podsumowanie wyników .....	67

VI. Dyskusja.....	69
VI.1. Poziom stresu oksydacyjnego u pacjentów z tętniakami aorty brzuszej .....	69
VI.2. Produkcja anionu nadtlenkowego w ścianie aorty brzusznej .....	71
VI.3. Enzymatyczne źródła produkcji anionu nadtlenkowego .....	72
VI.4. Histologiczna lokalizacja produkcji anionu nadtlenkowego .....	73
VI.5. Wpływ parametrów klinicznych na produkcję anionu nadtlenkowego .....	74
VI.6. Znaczenie rozmiaru tętniaka .....	75
VII. Wnioski.....	77
VIII. Streszczenie.....	78
IX. Spis skrótów .....	85
X. Spis rycin.....	87
XI. Spis tabel.....	89
XII. Piśmiennictwo .....	90

# I. Wstęp

## I.1. Wprowadzenie

Aorta – duży pień tętniczy – daje początek naczyniom krążenia systemowego. Główną jej funkcją jest odebranie krwi z lewej komory i przekazanie do naczyń oporowych, które doprowadzają krew do tkanek. W ciągu życia człowieka przepływa przez aortę około 200 milionów litrów krwi.

Aorta odgrywa także istotne funkcje hemodynamiczne. Podczas skurczu lewej komory dochodzi do jej poszerzenia. Wówczas część energii kinetycznej krwi jest zamieniana na energię potencjalną, gromadzoną w ścianie aorty. W czasie rozkurczu lewej komory dochodzi do zamiany energii potencjalnej z powrotem na energię kinetyczną i ściana aorty, ulegając odkształceniu, przepompowuje zgromadzoną tam krew. Proces ten odgrywa najważniejszą rolę w utrzymaniu ciągłości przepływu krwi przez naczynia krwionośne, także podczas rozkurczu lewej komory.

Ciśnienie w aorcie wynika z objętości wyrzutowej serca, podatności i elastyczności ściany aorty oraz oporu naczyniowego, generowanego przez grę mięśniówki gładkiej naczyń obwodowych i arteriol oraz w pewnym stopniu przez objętość krwi w aorcie [1, 2].

Oprócz wspomnianych funkcji aorta odgrywa pośrednią rolę w regulacji obciążenia wtórnego (*after-load*) przez wpływ na ciśnienie tętnicze oraz regulację częstości rytmu serca, za pośrednictwem baroreceptorów zlokalizowanych w ścianie aorty wstępującej, łuku oraz jej odgałęzień. Baroreceptory przekazują impulsy do centrum naczynioruchowego w pniu mózgu, skąd przesyłana jest odpowiedź za pośrednictwem nerwu błędnego, prowadząc do zahamowania aktywności

sympatycznej oraz pobudzenia parasympatycznego. Efektem odruchu z baroreceptorów jest zwolnienie częstości rytmu serca oraz zmniejszenie systemowego oporu naczyniowego [1].

Schorzenia tętnicy głównej prowadzą do upośledzenia pełnionych przez nią funkcji [2, 3]. Na przykład utrata podatności ściany aorty, występująca przede wszystkim w starszym wieku, zwiększa o 20 do 40% zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen. Zmniejszenie elastyczności i podatności aorty powoduje zaś wzrost parametrów ciśnienia skurczowego, napięcia ściany lewej komory oraz ciśnienia końcowo rozkurczowego i objętości lewej komory [4].

Tętniaki aorty brzusznej są jednymi z najczęstszych schorzeń dotyczących aorty. Tętniakiem aorty nazywa się każde poszerzenie światła naczynia, które przekracza przynajmniej 1,5-raza prawidłowy rozmiar aorty w danym segmencie. Poszerzenie światła naczynia zaburza przepływ krwi, co może prowadzić do powstawania zakrzepu w świetle naczynia, a to grozi upośledzeniem przepływu obwodowego lub spowodowaniem obwodowej embolizacji [1]. Poszerzenie światła naczynia jest związane ze zmniejszeniem grubości ściany, co może przyczyniać się do pęknięcia ściany aorty. Wśród pacjentów z pęknięciem ściany aorty śmiertelność waha się pomiędzy 70 a 80% [5-8].

Pomimo dowodów, że schorzenia aorty wywołują zaburzenia wielonarządowe, mechanizmy pojawiania się i rozwoju chorób aorty, w tym tętniaka aorty brzusznej, nie zostały jasno określone. Z tego też względu leczenie przyczynowe nie jest obecnie możliwe.

### ***1.1.1. Budowa aorty***

Aorta rozpoczyna się w przedłużeniu stożka tętniczego lewego i rozprowadza krew do całego organizmu przez swoje odgałęzienia.

Najwięcej tych odgałęzień znajduje się w odcinku brzusznej tętnicy. Ostatecznie aorta dzieli się na dwie tętnice biodrowe wspólne i tętnicę krzyżową pośrodkową.

Aorta jest zbudowana z trzech warstw: błony wewnętrznej, środkowej i przydanki. Wraz z oddalaniem się od serca w ścianie aorty wzrasta liczba komórek mięśni gładkich, natomiast ilość elementów elastycznych zmniejsza się.

Błona wewnętrzna (*intima*) składa się z pojedynczej warstwy komórek śródbłonka, wyściełającej światło naczynia, z włókien kolagenowych oraz elastynowych, położonych poniżej. W błonie wewnętrznej zlokalizowane są również skupiska komórek mięśniówki gładkiej oraz koncentrycznie ułożone włókna elastynowe. Śródbłonek pełni ważną rolę w regulacji wielu funkcji aorty, przede wszystkim hamuje aktywację i adhezję płytek krwi oraz leukocytów, co zapewnia skuteczny przepływ krwi [9-11].

Z wiekiem w błonie wewnętrznej dochodzi do zwiększenia liczby komórek mięśniówki gładkiej oraz kolagenu, co powoduje pogrubienie błony wewnętrznej [12, 13]. To przyspiesza rozwój procesu miażdżycowego oraz zmniejsza elastyczność ściany aorty, jak udowodniono na modelach zwierzęcych [13].

Pod wpływem sił mechanicznych wewnątrz naczynia, w tym przepływającej krwi (*shear stress*), komórki śródbłonka, uwalniając czynniki humoralne, wpływają z kolei na komórki mięśniówki gładkiej oraz przydanki, w wyniku czego śródbłonek może oddziaływać na napięcie aorty [14-16]. Podstawowymi czynnikami uwalnianymi przez śródbłonek są: tlenek azotu (NO), prostacyklina (PGI<sub>2</sub>), śródbłonkowy czynnik hyperpolaryzujący (EDHF). W warunkach patologicznych zdarza się, iż dochodzi nie tylko do zaburzenia uwalniania czynników ochronnych przez śródbłonek, lecz także do produkcji czynników uszkadzających, jak na przykład endoteliny czy wolnych rodników tlenowych [17, 18].



Zaburzenie funkcji śródbłónka może prowadzić do aktywacji komórek krwi oraz naciekania ściany aorty [19]. Jest to przede wszystkim wynikiem zwiększenia adhezji leukocytów, przez zwiększenie ekspresji cząstek adhezyjnych [20-24].

Ze względu na znaczny przeciwzapalny wpływ śródbłónka jego dysfunkcja może prowadzić do rozwijania stanu zapalnego w obrębie ściany aorty, a w związku z tym – przyczyniać się do powstawania schorzeń takich jak tętniaki aorty [25-27].

Warstwa środkowa (*media*) zbudowana jest z koncentrycznie ułożonej sieci włókien elastynowych oraz wypełniających przestrzenie pomiędzy nimi komórek mięśni gładkich wraz z tkanką łączną. Błona środkowa aorty jest odpowiedzialna za utrzymanie światła i ciągłego przepływu w naczyniu [28]. W początkowych odcinkach aorty warstwa ta zawiera głównie włókna elastynowe oraz kolagenowe. To one są odpowiedzialne za elastyczność oraz podatność, a także za funkcje z tego wynikające. Wraz z oddalaniem się od serca zwiększa się udział komórek mięśniówki gładkiej w warstwie środkowej aorty. Dzięki temu aorta wpływa na obciążenie następcze.

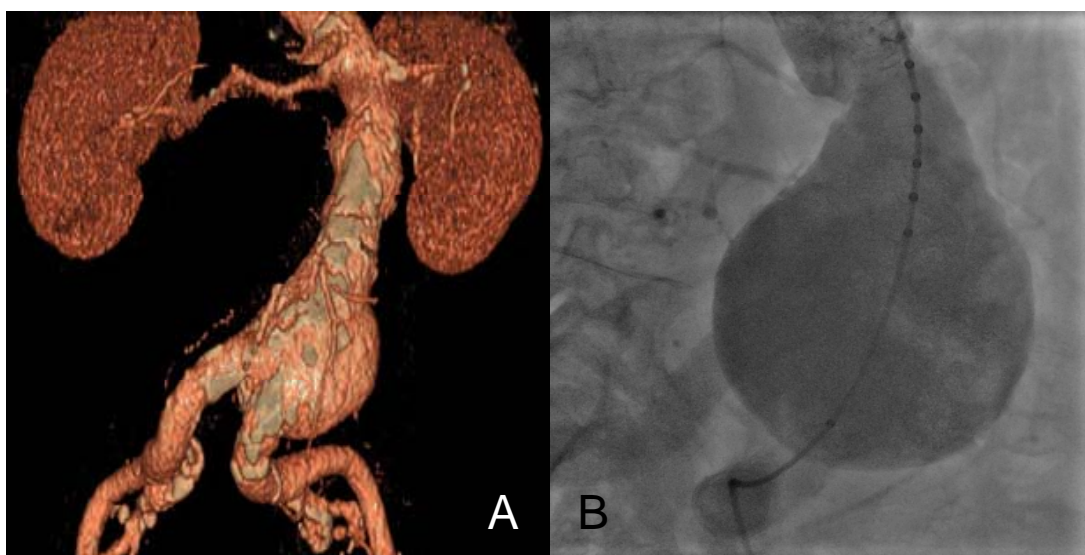
Błona zewnętrzna – (przydanka – *adventitia*), składa się z elementów włóknisto-elastynowych, zakończeń nerwowych oraz naczyń krwionośnych. *Vasa vasorum* to naczynia odżywiające ścianę aorty, a zanikają poniżej odejścia tętnic nerkowych. Z wiekiem dochodzi do znamienego zmniejszenia ich liczby, co także przyczynia się do przyspieszenia rozwoju procesu degradacji ściany aorty.

Podsumowując, jeżeli zostanie zaburzona funkcja regulacyjna błony wewnętrznej, wówczas łatwiej dochodzi do rozwinięcia procesu zapalnego oraz miażdżycowego w ścianie aorty. Podobnie, zaburzenie warstwy środkowej będzie manifestowało się przede wszystkim upośledzeniem elastyczności i podatności aorty. Uszkodzenie przydanki może przyspieszać rozwijanie się degradacji ściany aorty.

## I.2. Tętniaki aorty brzusznej

### I.2.1. Definicja

Tętniak jest to trwałe, patologiczne poszerzenie światła naczynia o co najmniej 50%, zlokalizowane przynajmniej w zakresie jednego segmentu, często wiążące się ze ścięciem ściany [1]. Do tego poszerzenia dochodzi w wyniku działania czynników uszkodzających, takich jak: a) nadmierne działanie sił obciążenia mechanicznego ściany aorty [15] w przebiegu nadciśnienia tętniczego; b) rozwój lokalnych stanów zapalnych, np. w toku miażdżycy, chorób zapalnych lub infekcyjnych. Procesy starzenia i niedotlenienia ściany mogą także uczestniczyć w procesie uszkodzenia ściany naczynia [28-32]. Aktualnie uważa się, iż tętniaki aorty brzusznej zlokalizowane poniżej odejścia tętnic nerkowych w >90% są związane z procesem miażdżycowym [33], podczas gdy pozostałe lokalizacje wynikają często także z innych przyczyn.



Rycina 1. Tętniak aorty brzusznej w tomografii komputerowej (A) oraz w angiografii RTG (B).

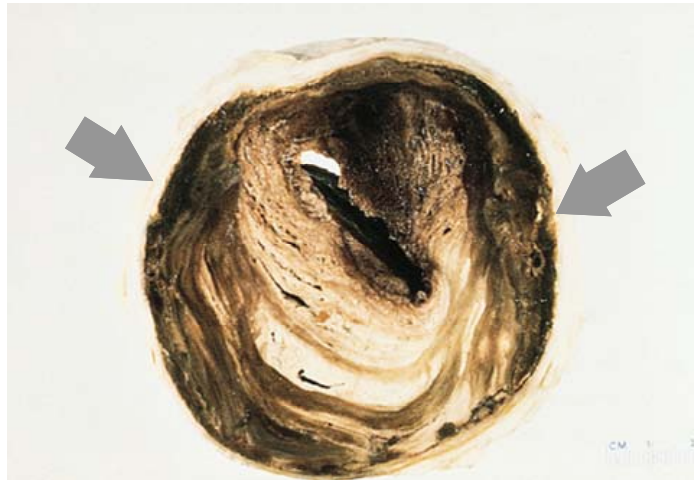
### ***1.2.2. Epidemiologia***

Tętniaki aorty brzusznej (AAA) występują u około 3–4% osób w wieku powyżej 50 roku życia [28, 34, 35]. Po 60 roku życia częstość ta wzrasta do 5–7% [5, 36, 37]. W grupie osób w wieku 60–64 lat mężczyźni chorują 11 razy częściej od kobiet. W starszej populacji stosunek ten zmniejsza się i wśród osób w wieku 85–90 lat wynosi już 3:1. Rozmiary tętniaków u kobiet są najczęściej znamienne mniejsze niż u mężczyzn [5].

### ***1.2.3. Charakterystyka ogólna***

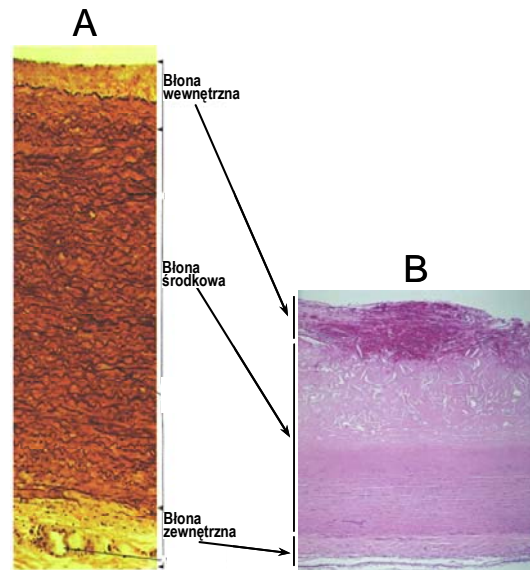
Charakterystyka tętniaków aorty, w tym także w odcinku brzuszny, obejmuje określenie rozmiaru, lokalizacji, morfologii oraz pochodzenia. Czynniki te mają praktyczne znaczenie, gdyż wpływają na przebieg naturalny oraz rokowanie [34, 35, 38, 39]. W szczególności rozmiar tętniaka oraz dynamika przyrostu, obok morfologii i obrazu klinicznego, decydują o wyborze sposobu leczenia [37, 38, 40]. Tętniaki o rozmiarze >5cm oraz o dużej dynamice poszerzania (>0,5–1cm/rok) związane są ze znacznym ryzykiem wystąpienia powikłań, przede wszystkim pęknięcia ściany naczynia [7, 37, 38, 41]. Dlatego wymagają wczesnego leczenia zabiegowego.

Tętniakowate poszerzenie może obejmować wszystkie części aorty i jej odgałęzień. Najczęściej obserwowane są tętniaki rozpoczynające się poniżej ujścia tętnic nerkowych. Spotyka się dwa typy morfologiczne tętniaków: typ wrzecionowaty (*fusiformis*) oraz typ workowaty (*saccularis*) [1]. Typ wrzecionowaty ma jednorodny kształt, z symetrycznym poszerzeniem obejmującym cały obwód aorty (Rycina 2). Występuje on znacznie częściej. Typ workowaty natomiast obejmuje mniejszy obszar aorty i ma kształt wybrzuszenia tylko pewnego obszaru tętnicy [1].



**Rycina 2. Tętniak wrzecionowaty – przekrój przez aortę brzuszna. Strzałki wskazują przejście ściany prawidłowej w ścianę tętniaka – zmodyfikowano za Klatt i wsp. [42]**

Zmiany histopatologiczne – zachodzące w obrębie ściany aorty brzusznej podczas tworzenia się tętniaka – polegają na stopniowym pojawieniu się komórek zapalnych, procesie degradacji elementów strukturalnych, a także na zmniejszeniu grubości ściany aorty, prowadząc ostatecznie do poszerzenia jej obwodu. W obrębie warstwy wewnętrznej dochodzi do naciekania przez komórki zapalne, które uwalniają wiele czynników wzrostu i cytokin, a także prowadzą do migracji i proliferacji miofibroblastów oraz komórek mięśniówki gładkiej. W toku procesu formowania tętniaka warstwa środkowa zostaje najbardziej zredukowana i w jej obrębie najbardziej zaznacza się proces degeneracyjny (Rycina 3). Typ zmian morfologicznych w obrębie tętniaka jest uzależniony od dominującego mechanizmu etiopatogenetycznego [43].



Rycina 3. Różnice histopatologiczne pomiędzy wycinkiem aorty prawidłowej (A) oraz zmienionej tętniakowato (B); (A– zmodyfikowano za Bergman [44]) B – zmodyfikowano za Klatt [42]).

#### 1.2.4. Etiopatogeneza

Etiopatogeneza tętniaków aorty nie jest w pełni poznana i różni się w zależności od lokalizacji tętniaka. U podstaw procesu formowania tętniaka aorty brzusznej leży proces degradacji błony środkowej oraz przydanki. Proces ten jest najczęściej inicjowany przez stan zapalny związany z procesami miażdżycowymi zachodzącymi w ścianie naczynia, któremu towarzyszy obumieranie komórek. Wykazano, iż współistnienie nadciśnienia tętniczego, urazów ściany aorty, a także czynników infekcyjnych w znacznym stopniu ułatwia i nasila te procesy etiopatogenetyczne. Określono cztery główne mechanizmy mogące odgrywać rolę w powstawaniu tętniaków. Są nimi:

1. proces zapalny,
2. proteolityczna degradacja elementów tkanki łącznej,
3. mechaniczny uraz ściany aorty,
4. zaburzenia genetyczne.

W patogenezie tętniaków aorty brzusznej wymienione mechanizmy współistnieją i są ze sobą ściśle powiązane [23, 45].

#### I.2.4.1. Czynniki ryzyka rozwoju tętniaka

Najważniejszymi czynnikami ryzyka są palenie tytoniu i nadciśnienie tętnicze. Te i pozostałe czynniki ryzyka, które mogą mieć znaczenie w patogenezie tętniaków aorty, zebrano w tabeli 1 [29-31, 34, 35, 38, 46-52].

Tabela 1. Czynniki ryzyka wystąpienia tętniaka aorty brzusznej.

<b>Nikotynizm</b>	Płeć Męska (4,5:1)
<b>POChP</b>	Rodzinne występowanie
<b>Nadciśnienie tętnicze</b>	Choroba Niedokrwienna Serca
Miażdżycy uogólniona	Hypercholesterolemia
Wiek > 55 roku życia	Choroby zapalne
Genetyczne uwarunkowanie	Choroby układowe tkanki łącznej

Wykazano, iż *palenie tytoniu* przez wywoływanie stresu oksydacyjnego, a także przyspieszanie procesu degradacji elementów tkanki łącznej, przyczynia się zarówno do rozwinięcia, jak i powiększania tętniaka aorty brzusznej. U osób palących tytoń znacznie częściej występują tętniaki aorty brzusznej. Częstość AAA rośnie wraz ze wzrastającą ilością paczkołat wypalanych (<19 paczkołat – 2,8x; 20–50 paczkołat – 7,3x; >50 paczkołat – 9,5x; wartości przedstawione względem osób niepalących) [31, 37]. Palenie tytoniu prowadzi też do rozwinięcia przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, która w badaniach epidemiologicznych została wykazana jako niezależny czynnik predysponujący do pęknięcia tętniaka [47].

*Nadciśnienie tętnicze* jest związane z przyspieszeniem rozwoju tętniaka. Wśród palaczy, relatywne ryzyko wystąpienia tętniaka aorty brzusznej było 3,4-krotnie większe u osób z ciśnieniem rozkurczowym >90mmHg oraz 4,1-krotnie większe u osób ze średnim ciśnieniem ≥100mmHg [30]. Mechanizm działania nadciśnienia tętniczego w odniesieniu do tętniaków aorty jest złożony i wynika zarówno z działania mechanicznego, zwiększającego siły oddziałujące na ścianę aorty, jak

i z przyśpieszenia procesu miażdżycowego i przyśpieszenia dysfunkcji śródbłonna naczyniowego [17, 28, 53-55].

W literaturze istnieją sprzeczne poglądy na temat roli *zaburzeń gospodarki lipidowej* jako czynnika ryzyka rozwoju tętniaka aorty brzusznej. W badaniach Wanhainena wykazano częstsze występowanie podwyższonych wartości całkowitego cholesterolu, trójglicerydów oraz LDL u pacjentów z tętniakami w porównaniu z grupą kontrolną [31]. Inni badacze jak Blanchard i wsp., nie potwierdzili w wynikach swoich prac takiej korelacji [46]. Wiarygodne badania prospektywne na dużej grupie chorych nie były wykonywane.

Rodzinne występowanie AAA opisali Powell, Salo, Shibamura oraz van Vlijmen [56-59]. Miażdżycy zarostowa kończyn dolnych współistnieje u ok. 25% chorych z AAA [36, 46, 60].

#### ***1.2.4.2. Dysfunkcja śródbłonna***

Dysfunkcja śródbłonna jest zaburzeniem równowagi pomiędzy czynnikami ochronnymi a czynnikami aktywującymi śródbłonek. Wydaje się, iż dysfunkcja śródbłonna odgrywa istotną rolę w patogenezie tętniaków aorty brzusznej [25, 27, 61]. Rozwój stanu zapalnego w ścianie naczyń bardzo często jest powiązany z dysfunkcją i/lub uszkodzeniem śródbłonna naczyniowego, ze względu na jego liczne działania naczynioochronne [53, 62-65]. Tlenek azotu (NO) wykazuje istotne działania przeciwzapalne – hamuje ekspresję cząstek adhezyjnych oraz aktywność metaloproteinaz. Upośledzenie ekspresji i/lub zmniejszenie aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w modelach zwierzęcych predysponuje do rozwinięcia tętniaka aorty [61, 65]. Przyczyną zmian aktywności eNOS może być podwyższone stężenie poziomów białka C reaktywnego (CRP) [66], działanie ox-LDL, cytokin zapalnych, a zwłaszcza zwiększony stres

oksydacyjny prowadzący do degradacji wytwarzanego NO, zanim zadziała on na komórki ściany naczynia [67].

W warunkach fizjologicznych śródbłonek spełnia liczne funkcje, które pod wpływem czynników uszkodzających są zaburzone [10, 17, 53, 65, 67]. Należą do nich między innymi:

- przeciwzapalna – polega na regulacji ekspresji cząstek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka, co moduluje naciekanie ściany naczynia przez komórki zapalne: monocyty, makrofagi i limfocyty. Tlenek azotu hamuje ekspresję zarówno ICAM, jak i VCAM [68, 69], tak w warunkach podstawowych, jak i indukowaną przez cytokiny z komórek zapalnych. Dodatkowo odpowiedź ta jest nasilana przez czynniki promiażdżycowe [20, 26, 70]. W tętniakach aorty brzusznej zauważono zwiększone nacieczenie ściany komórkami zapalnymi [21, 71], tak więc brak przeciwzapalnych efektów NO może odgrywać tu istotną rolę [65].
- przeciwzakrzepowa – produkcja PGI<sub>2</sub> przez cyklooksygenazę śródbłonkową oraz syntazę prostacyklinową zmniejsza agregację płytek, a stymulacja cyklazy adenozynowej zwiększa stężenie cAMP [72]. Także tlenek azotu odgrywa kluczową rolę w działaniu przeciwzakrzepowym, w mechanizmie zależnym od cGMP [73]. NO zmniejsza zarówno agregację, jak i adhezję płytek [10, 17]. Upośledzenie tej funkcji w tętniakach aorty brzusznej może ułatwiać powstawanie skrzeplin w świetle naczynia, w miejscu poszerzenia tętniakowatego.
- profibrynolityczna – śródbłonek produkuje tkankowy (t-PA) oraz urokinazowy aktywator plazminogenu (u-PA). W modelach zwierzęcych wykazano, iż w szczególności u-PA odgrywa



istotną rolę w indukowanych angiotensyną II tętniakach aorty [74, 75]. Podobny efekt zauważono u ludzi [76].

- antyproliferacyjna – śródbłonek przede wszystkim przez tlenek azotu hamuje migrację oraz proliferację komórek mięśni gładkich, dzięki czemu hamuje proces hiperplazji błony wewnętrznej. Tlenek azotu wpływa na ekspresję białek regulujących aktywność proliferacyjną SMC [77] oraz na aktywność metaloproteinaz [78, 79], a także licznych czynników transkrypcyjnych, na przykład NFκB. W związku z istotną rolą hiperplazji intymy zaburzenie tej funkcji śródbłonka jest ważne w patogenezie tętniaków aorty brzusznej [13].
- regulacja napięcia ściany naczyń [80] – proces jest regulowany przez tlenek azotu, który przez zwiększenie stężenia cyklicznego GMP w komórkach mięśniówki gładkiej hamuje aktywność kanałów wapniowych, co prowadzi do rozkurczu naczynia.

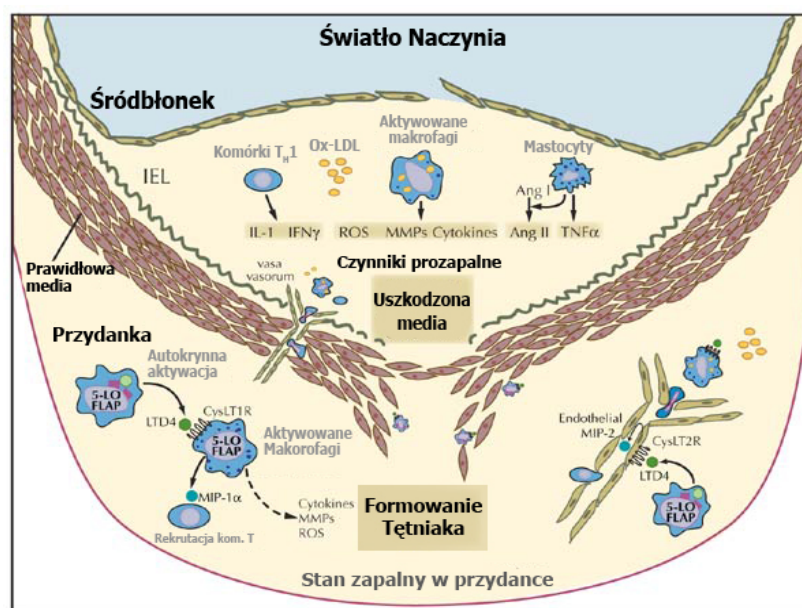
Badanie funkcji śródbłonka naczyniowego jest trudne. Wykorzystuje się przede wszystkim naczyniorozkurczające działanie NO jako biomarker jego dostępności. Jako pierwsi w 1980 roku Furghott i Zawadzki zademonstrowali zależny od acetylocholino (ACh) rozkurcz naczynia (proces mediowany przez śródbłonkowy NO) [14]. Ponieważ tlenek azotu (NO) odgrywa kluczową rolę w czynności śródbłonka, oznaczanie biodostępności NO jest pośrednim wskaźnikiem dysfunkcji śródbłonka – jego biomarkerem.

Dysfunkcja śródbłonka, w badaniach klinicznych, określana jest z wykorzystaniem FMD (*Flow Mediated Dilatation*, FDD – *Flow Dependent Dilatation*). W tym badaniu obserwuje się rozkurcz tętnicy ramiennej wywołany przywróceniem przepływu przez tętnicę. Przywrócenie przepływu krwi w naczyniu oddziałuje na receptory mechaniczne w błonie komórkowej śródbłonka przez siły ścinania „*shear stress*”. Prowadzą one do

aktywacji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu [81]. Inną metodą oceny dysfunkcji śródbłonka jest bezpośrednie podawanie ACh do naczyń wieńcowych. W miejscach, gdzie miała miejsce dysfunkcja śródbłonka, dochodzi do obkurczenia światła naczynia zamiast do rozkurczu [82], wskazując na dysfunkcję śródbłonkowej eNOS oraz na bezpośrednie naczynioskurczowe działanie ACh na mięśniówkę gładką. Co ciekawe, Schachinger i wsp. wykazali, iż w miejscach, gdzie obserwuje się tak zdefiniowaną dysfunkcję śródbłonka, w ciągu kilku lat dochodzi do rozwinięcia się blaszki miażdżycowej [82].

#### 1.2.4.3. Proces zapalny

Obecność przewlekłego procesu zapalnego w ścianie tętniaka wykazywano wielokrotnie. W preparatach histologicznych stwierdzono naciekanie makrofagami, monocytami i limfocytami [19, 21]. Nacieki komórek zapalnych dotyczą praktycznie wszystkich warstw aorty – intymy, medii i przydanki. Komórki te wytwarzają wiele cytokin i innych biologicznie aktywnych substancji [83, 84]. Poziomy w surowicy cytokin IL-1 $\beta$  oraz IL-6 mogą korelować z rozmiarem tętniaka [39, 84-86].



Rycina 4. Proponowany model formowania tętniaka aorty brzusznej. Zmodyfikowano za Wulf Palinski [87, 88].

Proces zapalny prowadzi do zwiększonej aktywności enzymów proteolitycznych, niszczących strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), ułatwiając i/lub utrwalając rozwój poszerzenia [23, 34, 77]. Odpowiadają za to przede wszystkim metaloproteinazy tkankowe (MMPs) [78] oraz ich białka regulujące (TIMPs). Wielu badaczy koncentruje się na znaczeniu metaloproteinaz w patogenezie tętniaków aorty. Cytokiny, takie jak IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , zwiększają ekspresję MMP, a także przyspieszają proces wymiany macierzy zewnątrzkomórkowej [78].

Czynniki inicjujące naciekanie ściany aorty komórkami zapalnymi w patogenezie tętniaków aorty brzusznej nie są do końca poznane.

Proces powstawania blaszki miażdżycowej wiąże się z rozwojem stanu zapalnego w obrębie neointimy. Równocześnie produkty degradacji włókien ściany aorty, powstające pod wpływem działania MMPs, mają właściwości chemotaktyczne, przyciągając komórki zapalne [78], prowadząc w pewnym sensie do zamknięcia się błędnego koła stanu zapalnego w ścianie aorty.

Istnieje także koncepcja, iż powstawanie tętniaka aorty brzusznej jest procesem autoimmunologicznym. Przemawiającym za tym argumentem jest obecność złogów immunoglobulin G w ścianie aorty, które także mogą działać chemotaktycznie i prowadzić do aktywacji komórek zapalnych [89]. Charakter autoantygeny nie jest jednak jasny. Możliwe, iż ma to związek ze zjawiskiem mimikry antygenowej wywoływanej działaniem czynników infekcyjnych [90, 91].

Innym ważnym czynnikiem odgrywającym rolę w patogenezie zapalenia w formowaniu tętniaków aorty brzusznej może być infekcja *Chlamydiae pneumoniae*. Wykazano podwyższony poziom przeciwciał przeciwko *Chlamydiae pneumoniae* w tętniakach aorty brzusznej [92, 93], zaś metodami biologii molekularnej wykazano obecność samych drobnoustrojów w obrębie tętniakowato poszerzonej aorty. Może to jednak mieć związek z przetrwałą obecnością *Chlamydiae pneumoniae*.

Jednym z ważniejszych aspektów przewlekłego procesu zapalnego wydaje się być rola wolnych rodników tlenowych, które uczestniczą praktycznie we wszystkich etapach rozwoju i regulacji stanu zapalnego [94], także w tętniakach aorty brzusznej [77]. Ich udział w procesie powstawania tętniaka zostanie szczegółowo omówiony poniżej.

#### *1.2.4.4. Proteolityczna degradacja elementów tkanki łącznej*

Liczne badania podkreślają rolę procesów proteolitycznych jako ważnego patomechanizmu poszerzenia tętniakowatego. Enzymami zaangażowanymi w ten proces są przede wszystkim metaloproteinazy (MMP) [78, 95], a także aktywatory plazminogenu, katepsyny i inne [74, 95]. Mechanizmy regulacji ekspresji i aktywności MMP, zwłaszcza w odniesieniu do patogenezy tętniaków aorty, nie są do końca wyjaśnione.

Źródłem tych enzymów są makrofagi oraz komórki mięśniówki gładkiej (SMC). Enzymy te, w warunkach prawidłowych, uczestniczą w procesie remodelingu tkankowego [45]. W przypadku AAA dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy ekspresją proteinaz i ich aktywacją a produkcją ich endogennych inhibitorów. Ekspresja metaloproteinazy 2 (MMP-2, gelatynaza A), MMP-9 (gelatynaza B) oraz MMP-12 (elastaza makrofagowa) czy MMP-7 (matrylizyna) jest zwiększona w tętniakach aorty brzusznej [24, 96, 97]. Metaloproteinazy te odpowiadają przede wszystkim za trawienie włókien elastynowych. Rolę w trawieniu pozakomórkowego kolagenu przypisuje się kolagenazom MMP-1 (kolagenaza-1) i MMP-13 (kolagenaza-13) [24, 39, 78, 96-98]. Niedawno opisano rolę MMP-8 (kolagenazy neutrofilowej) w etiopatogenezie tętniaków aorty brzusznej [99]. Opisano też zdolność aktywacji MMP-2 przez inne MMP, szczególnie MMP-14 [24].

O roli MMPs w patogenezie tętniaków aorty brzusznej świadczyć mogą prace prowadzone na modelach zwierzęcych zmodyfikowanych

genetycznie. Na przykład u myszy pozbawionych genu dla MMP-9 lub MMP-2 nie dochodzi do rozwinięcia tętniaków, inaczej niż u zwierząt kontrolnych [100]. Dowodów na znaczenie MMPs w patogenezie tętniaków aorty brzusznej dostarczają także badania kliniczne, wskazujące na korelacje pomiędzy ekspresją czy aktywacją MMPs a rozmiarem tętniaka (np. MMP-9) [39, 101]. W innym badaniu przedstawiono korelację pomiędzy aktywnością kolagenaz a rozmiarem tętniaka [102]. Petersen i wsp. zauważyli, iż zwiększona ekspresja MMP-9 jest związana z łatwiejszym pękaniem dużego tętniaka [103].

Z drugiej strony zauważono na modelach zwierzęcych, iż inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) zapobiegają rozwojowi tętniaków oraz ich pęknięciu. Aktualnie poznane są cztery endogenne, tkankowe inhibitory MMPs – TIMP 1–4; Aktywność TIMP-1 jest związana z blokowaniem aktywacji pro-MMP-9, natomiast TIMP-2 hamuje aktywację pro-MMP-2. W innych badaniach zauważono, że zaburzenie równowagi pomiędzy aktywnością MMP-9 a jej tkankowym inhibitorem (TIMP-1) ma miejsce w tętniakach aorty brzusznej [104, 105]. W modelu zwierzęcym pozbawienie genu dla TIMP-1 wiązało się z wywołaniem większych tętniaków [106].

Co ciekawe, zauważono, iż proste leki przeciwzapalne oraz nieselektywne inhibitory MMP (tetracykliny) hamują degradację ściany aorty [23, 78, 107]. Stosowanie doksacykliny zmniejszyło 5-krotnie ekspresję mRNA dla MMP-9 [23, 78, 107]. Są już pierwsze badania wskazujące skuteczność doksacykliny w leczeniu pacjentów z tętniakami aorty brzusznej [108-110].

Inne proteinazy, takie jak aktywatory plazminogenu, elastazy osoczowe, katepsyny, również przyczyniają się do degeneracji tętniakowatej. Zauważono zwiększoną ekspresję katepsyny S w AAA, a równocześnie zmniejszoną ekspresję cystatyny C, głównego inhibitora proteaz cysteinowych [111, 112].

Szczegółowe mechanizmy zwiększonej ekspresji i aktywacji enzymów proteolitycznych przy równoczesnym upośledzeniu ekspresji i działania inhibitorów nie są jeszcze dokładnie poznane. Jednym z mechanizmów sugerowanych jest aktywacja, pochodzących z komórek zapalnych i SMC ściany naczynia, latentnych enzymów przez wolne rodniki tlenowe.

#### ***1.2.4.5. Biomechaniczne urazy ściany aorty***

Najczęstsza lokalizacja tętniaków – podnerkowa – w odcinku poniżej odejścia tętnic nerkowych od aorty brzusznej nie jest przypadkowa. W dużej mierze wynika to ze zmiany struktury histologicznej aorty. Proporcja elastyny do kolagenu w strukturze aorty zmniejsza się wraz z oddalaniem się od serca – im bardziej obwodowy fragment tętnicy, tym więcej jest kolagenu, a mniej elastyny, co predysponuje do poszerzenia tętniakowatego aorty [23, 45]. Badania przepływowe wykazały, iż przepływ krwi jest zaburzony w regionie podnerkowym przy równoczesnym zwiększeniu napięcia ściany aorty [15, 113], co czyni ten rejon szczególnie podatnym na rozwój tętniaków. Zwiększonemu obciążeniu biomechanicznemu towarzyszy często także niedotlenienie głębszych obszarów ściany aorty w tym właśnie odcinku [23, 43, 45]. *Vasa vasorum* kończą się w okolicy odejścia tętnic nerkowych. Stan cyklicznego niedokrwienia i reperfuzji może dodatkowo prowadzić do zwiększonej produkcji wolnych rodników tlenowych. Na wspomniane procesy może nałożyć się tępy uraz, najczęściej komunikacyjny, który stanowi czynnik wyzwalający powstanie tętniaka [114, 115].

#### ***1.2.4.6. Czynniki genetyczne***

Czynnik genetyczny stanowi niezależny czynnik ryzyka tętniaków aorty [56-59]. O roli czynników genetycznych w patogenezie tętniaków aorty brzusznej świadczy, że AAA występuje w 25% u krewnych bliskiego

pokrewieństwa [23, 43, 56, 57]. U ok. 20% chorych z tętniakami aorty brzusznej występują genetycznie uwarunkowane schorzenia, najczęściej jest to zespół Marfana, w którym występuje mutacja genu dla fibryliny-1 (FBN-1), lub zespół Ehlers-Danlosa typ IV, gdzie występuje uszkodzenie genu prokolagenu typ III (COL3A1) [43, 45, 116].

Mutacje genetyczne w obrębie elementów strukturalnych aorty mogą prowadzić do rozwinięcia tętniaków, czy też ich rozwarstwienia. Sugerowano również, że łatwiej rozwija się tętniak, gdy dochodzi do nakładania się zaburzeń genetycznych dotyczących składników tkanki łącznej na proces miażdżycowy czy nadciśnienie [43, 45]. Te synergiczne efekty mogą znacznie przyspieszać proces ściężczenia ściany aorty [23]. Różne dodatkowe fenotypy współtowarzyszą rozwojowi AAA. Przykładem tego może być występowanie deficytu  $\alpha$ 1-antytrypsyny u chorych z AAA [117, 118]. Zauważono, iż u pacjentów bez antygeny Rh rzadziej rozwijają AAA [119].

Poza omawianymi mutacjami, które mogą prowadzić do upośledzenia wytrzymałości mechanicznej aorty, u większości chorych predyspozycja do rozwoju tętniaków aorty brzusznej ma charakter wielogenowy [43, 45]. W literaturze opisywane są również polimorfizmy, które częściej występują u pacjentów z tętniakami aorty brzusznej [23, 43, 45].

### **I.3. Rola wolnych rodników tlenowych w powstawaniu tętniaków aorty brzusznej**

W literaturze podkreśla się rolę wolnych rodników tlenowych w powstawaniu tętniaków aorty brzusznej [77, 120, 121]. \

### ***1.3.1. Wolne rodniki tlenowe***

Wolne rodniki tlenowe biorą udział we wszystkich czterech opisywanych powyżej procesach uczestniczących w formowaniu się tętniaka. Stres oksydacyjny w ścianie naczynia obserwowano zarówno u chorych z AAA, jak i w eksperymentalnych modelach indukowanych AAA [62, 77, 121, 122]. Odgrywają one istotną rolę we wszystkich etapach procesu zapalnego, aktywują proteiny, które z kolei mogą dalej nasilać zwiększoną produkcję wolnych rodników. Wolne rodniki tlenowe również wpływają na apoptozę, która występuje podczas formowania AAA [22, 65, 77].

#### ***1.3.1.1. Stres oksydacyjny***

W ostatnich latach wykazano, iż dysfunkcji śródbłonna towarzyszy znaczny stopień stresu oksydacyjnego związany z nadprodukcją anionu nadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) [53, 63, 65]. Stres oksydacyjny to stan, w którym produkcja wolnych rodników tlenowych przewyższa przeciwutleniające możliwości komórek, prowadząc do ujawnienia się toksycznych właściwości wolnych rodników, równocześnie z utlenianiem białek, lipidów oraz DNA [65, 123, 124]. Stres oksydacyjny może w istotny sposób uczestniczyć w patogenezie tętniaków aorty przez zmniejszenie aktywności NOS oraz biodostępności NO. Możliwe są także bezpośrednie działania warunkujące wzrost ekspresji i aktywacji metaloproteinaz tkankowych [65, 121]. Udokumentowano indukcję licznych prozapalnych genów [22] i oksydacyjnej modyfikacji białek [122]. Są dowody na indukcję apoptozy komórek mięśniówki gładkiej naczyń [45, 77, 122].

Wstępne badania eksperymentalne wykazały zwiększoną produkcję anionu nadtlenkowego w ścianie tętniaka w porównaniu do prawidłowej aorty [121]. Dotychczas tylko jedno badanie analizowało produkcję wolnych rodników tlenowych w tętniakach aorty u człowieka [77]. Źródła, a także znaczenie czynnościowe nadprodukcji anionu nadtlenkowego



w tętniakach aorty brzusznej nie są obecnie poznane. Potencjalnym źródłem anionu ponadtlenkowego w naczyniach są komórki zapalne infiltrujące ścianę naczynia, a także komórki ściany naczynia, zwłaszcza komórki mięśni gładkich (SMC) [32, 53, 63, 77]. Komórki te, akumulując lipoproteidy, przekształcają się w komórki piankowate [125], które stają się wydatnym źródłem proteinaz i wolnych rodników tlenowych [65, 126, 127].

Anion ponadtlenkowy jest wysoko reaktywnym wolnym rodnikiem tlenowym. Podczas reakcji z tlenkiem azotu powstaje nadtlendioazotyn (ONOO<sup>-</sup>), który utlenia lipoproteiny, inaktywuje NO, uszkadza białka przez ich utlenianie i nitrowanie oraz zaburza przekąźnictwo zależne od cyklicznego GMP [32, 53, 77, 121].

Anion ponadtlenkowy, pod wpływem dysmutazy ponadtlenkowej, jest metabolizowany do nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), substancji wywołującej rozkurcz naczynia, ale także jednego z najsilniejszych regulatorów procesów redukcyjno-oksydacyjnych (red-ox) – zależnych od genów, w szczególności genów prozapalnych [32, 53, 65, 77]. Nadtlenek wodoru może być metabolizowany enzymatycznie do wody (H<sub>2</sub>O) przez katalazę. Jak zauważono w eksperymentalnych tętniakach poziom ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej był znacznie mniejszy w porównaniu do kontroli [121]. Nadtlenek wodoru oraz nadtlendioazotyn mogą być źródłem rodnika wodorotlenowego (.OH) [128]. Rodnik ten odgrywa kluczową rolę w aktywacji genów (zależnych od procesów red-ox), pobudza mitogenezę, zwiększa produkcję prostaglandyn, kanałów potasowych, oraz ekspresję kinazy białkowej C, a także moduluje przekąźnictwo zależne od cyklicznego GMP [53, 65, 128].

### *1.3.2. Rola reaktywnych form tlenu (ROS) w regulacji mechanizmów powstawania tętniaków aorty brzusznej*

#### *1.3.2.1. Znaczenie ROS w procesie zapalnym*

Nie jest jasne, jak wolne rodniki tlenowe inicjują i nasilają proces zapalny w ścianie aorty podczas formowania tętniaka. Wiadomo, iż wolne rodniki tlenowe, powodują zmniejszenie biodostępności tlenku azotu, dzięki czemu przyczyniają się do rozwinięcia dysfunkcji śródbłonna [11]. Prowadzi to do zwiększenia ekspresji cząstek adhezyjnych, takich jak ICAM-1 czy interleukiny-1 $\alpha$  [19, 68, 129], i nasilenia migracji komórek zapalnych, takich jak makrofagi, monocyty czy limfocyty. Zmniejszona biodostępność NO i bezpośrednie oddziaływanie wolnych rodników tlenowych na komórki zapalne powodują zwiększenie ekspresji cytokin. W modelach zwierzęcych AAA zauważono zwiększoną ekspresję IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\beta$ R [121]. Aktywowane komórki zapalne stają się same źródłem wolnych rodników, które dalej rozwijają i podtrzymują proces zapalny w ścianie aorty. Aktywowane komórki zapalne są także źródłem enzymów proteolitycznych, miejscem peroksydacji lipidów, oraz regulują apoptozę. Nieznany pozostaje czynnik wywołujący naciekanie ściany aorty komórkami zapalnymi.

#### *1.3.2.2. Regulacja procesu proteolizy*

Wolne rodniki tlenowe będą dwójako wpływać na regulację proteolizy. Z jednej strony, zarówno przez proces zapalny, jak i bezpośrednie działanie, zwiększają ekspresję genów dla enzymów. Z drugiej strony zwiększają aktywność metaloproteinaz. W eksperymentalnych modelach stresu oksydacyjnego zauważono zwiększoną ekspresję genów dla MMP-9, MMP-12, MMP-8 oraz dla kolagenazy [121].

Wolne rodniki tlenowe mogą znosić interakcję pomiędzy cysteiną propeptydu a atomem cynku w miejscu aktywnym. Mechanizm ten nazwany został „włącznikiem cysteinowym”. Reaktywne formy tlenu, modyfikując strukturę białka mogą powodować odsłonięcie centrum aktywnego enzymu przez reakcję z grupami tiolowymi enzymu [130]. W badaniach *in vitro* wolne rodniki tlenowe, takie jak anion ponadtlenkowy, tlenek azotu oraz nadtlenuk wodoru aktywowały i modulowały aktywność metaloproteinaz [131, 132]. Wolne rodniki tlenowe wywierały wpływ na aktywność MMP-9 oraz MMP-12 głównie za pośrednictwem nadtlenuk azotu (ONOO<sup>-</sup>), który reaguje z grupą tiolową enzymu [132]. Opisywana jest również rola kwasu podchlorawego (HOCl) w modulacji aktywności metaloproteinaz [131].

#### ***1.3.2.3. Apoptoza a stres oksydacyjny***

Proces apoptozy może również odgrywać rolę w patogenezie tętniaków aorty brzusznej [133]. Apoptoza w tętniakach dotyczy głównie komórek mięśniówki gładkiej, gdzie zauważono zwiększony poziom fragmentacji DNA [77, 133]. Zwiększenie stresu oksydacyjnego, a w szczególności anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenuk wodoru, prowadzi do nasilenia apoptozy [77]. Apoptoza podlega ścisłej regulacji w zależności od biodostępności NO w komórce [77]. Może to być kolejny istotny mechanizm, w którym wolne rodniki tlenowe regulują procesy apoptozy w rozwoju tętniaków aorty.

#### ***1.3.2.4. Angiotensyna II***

Rola angiotensyny II w patogenezie tętniaków wychodzi poza jej rolę w nadciśnieniu tętniczym, jako jednego z głównych czynników ryzyka tej choroby.

W modelu zwierzęcym zauważono, że infuzja angiotensyny II znacząco przyspiesza rozwój wszystkich procesów miażdżycowych, w tym generowanie dużych tętniaków aorty brzusznej [134, 135]. Zjawisko to jest obserwowane także w odniesieniu do dawek angiotensyny II, które nie powodują nadciśnienia. Wskazuje na to, że działanie angiotensyny II promujące powstawanie tętniaków aorty brzusznej jest niezależne od znanej roli angiotensyny II w nadciśnieniu. Autorzy prac związanych z zastosowaniem angiotensyny w wywoływaniu AAA sugerują, iż może to mieć związek ze zwiększaniem ekspresji białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) przez angiotensynę II, co prowadzi do rozwoju procesu zapalnego. Wiadomo, iż angiotensyna II zwiększa ekspresję cząsteczek adhezyjnych, w tym VCAM-1, za pośrednictwem mechanizmu aktywacji genów zależnego od NFκB [136]. Najprawdopodobniej zwiększenie ekspresji MCP-1 odbywa się na podobnej drodze. Wymienione geny regulowane przez NFκB są w znacznym stopniu redoks-wrażliwe, co sugeruje, iż ten mechanizm jest istotny w powstawaniu AAA zależnych od angiotensyny II.

Angiotensyna II stymuluje produkcję wolnych rodników tlenowych przez aktywację oksydazy NAD(P)H [137]. Zespół prof. Kathy Griendling wykazał jasno, iż wolne rodniki tlenowe są głównym przekaźnikiem sygnału w odpowiedzi na działanie angiotensyny II [138]. Dokładny mechanizm aktywacji oksydazy NAD(P)H przez angiotensynę II nie jest do końca poznany. Metabolizm kwasu arachidonowego może odgrywać tu znaczną rolę. W tej kaskadzie enzymatycznej uczestniczy fosfolipaza C $\beta$ , aktywowana za pośrednictwem białka G po aktywacji receptora AT $_1$  [138]. Wynika z tego, że w aktywacji stresu oksydacyjnego ważną rolę odgrywa kinaza białkowa C [74, 138, 139], co stwarza możliwość zastosowania bardzo ciekawych nowych metod leczenia selektywnymi inhibitorami kinazy białkowej C.

### ***1.3.2.5. Peroksydacja lipidów***

Wolne rodniki tlenowe odgrywają również istotną rolę w peroksydacji lipidów. Pojawienie się ox-LDL wywołuje kaskadę procesów promiażdżycowych, takich jak zwiększenie ekspresji genów promiażdżycowych, zwiększenie produkcji metaloproteinaz. Ox-LDL powodują także zwiększenie apoptozy komórek mięśniówki gładkiej oraz zmniejszenie śródbłonkowej produkcji tlenu azotu [125]. Produktem peroksydacji lipidów jest MDA (malonylo dialdehyd), którego poziom w osoczu jest cennym markerem stresu oksydacyjnego w badaniach klinicznych [140-143].

### ***1.3.3. Enzymatyczne źródła wolnych rodników***

Enzymatycznymi źródłami anionu ponadtlenkowego mogą być oksydaza NAD(P)H, oksydaza ksantynowa, cyklooksygenaza, oksydazy mitochondrialne oraz syntaza tlenu azotu (NOS) czy indukowalna syntaza tlenu azotu (i-NOS) [53, 63, 64, 77]. Jasne określenie źródeł i mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększony stres oksydacyjny w tętniakach aorty brzusznej oraz określenie ich związków z progresją degradacji ściany aorty może pozwolić w przyszłości na zastosowanie nowych strategii antyoksydacyjnych w zapobieganiu i leczeniu tętniaków aorty brzusznej.

#### ***1.3.3.1. NAD(P)H oksydaza***

Po raz pierwszy została opisana jako enzym odpowiedzialny za wybuch tlenowy neutrofilów i makrofagów [144, 145]. Dopiero na początku lat '90 odkryto obecność tego enzymu w wielu innych komórkach, w tym w śródbłonku, mięśniówce gładkiej czy fibroblastach [137, 146]. Dalsze badania wykazały wiele różnic w zależności od typu komórek, w których jest stwierdzana. Wiadomo, że oksydaza NAD(P)H składa się

z podjednostek błonowych (p22phox oraz gp91phox lub jej homologów NOX1-5) tworzących centrum aktywne enzymu, oraz cytoplazmatycznych, odgrywających funkcje regulacyjne (p67phox, p47phox, p40phox), a także białka G (rac), [146]. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach w komórkach mięśniówki gładkiej, zamiast podjednostki gp91phox znajduje się jeden z homologów nox1 lub nox4 [65, 147].

Leukocytarna oksydaza NAD(P)H nie jest zdolna do produkcji wolnych rodników tlenowych bez zewnętrznej stymulacji, która doprowadzi do związania wszystkich, wcześniej zdysocjowanych podjednostek oksydazy. Co więcej, nasze własne badania wskazują, iż w komórkach fagocytarnych NADPH podane z zewnątrz nie prowadzi do aktywacji enzymu, podczas gdy w komórkach naczyniowych zjawisko to jest obserwowane. Wynika to z innej topografii oksydazy w błonie komórkowej. Przypuszcza się bowiem, że miejsce wiązania enzymu, w komórkach fagocytarnych zlokalizowane jest wewnątrzkomórkowo, lub komórki fagocytarne nie mają zdolności transportowania NAD(P)H do wnętrza komórki [146]. Istnieją także różnice w budowie samego enzymu – komórki fagocytarne posiadają głównie podjednostkę NOX-2 (Gp91phox), natomiast nie posiadają NOX-4, która jest charakterystyczna dla komórek mięśniówki gładkiej [67, 138].

### ***1.3.3.2. Oksydaza ksantynowa***

Aktywność oksydazy ksantynowej może wykazywać śródbłonkowa dehydrogenaza ksantynowa, w warunkach hipoksji lub reoksygenacji [148]. Dokładne znaczenie oksydazy ksantynowej nie jest określone. Opisywano jej rolę w zmniejszeniu biodostępności tlenu azotu w doświadczalnej hypercholesterolemii [149]. U szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym zauważono, iż stosowanie oksypurinołu, inhibitora oksydazy ksantynowej, powodowało zmniejszenie ciśnienia tętniczego krwi [150].

### ***1.3.3.3. Cyklooksygenazy***

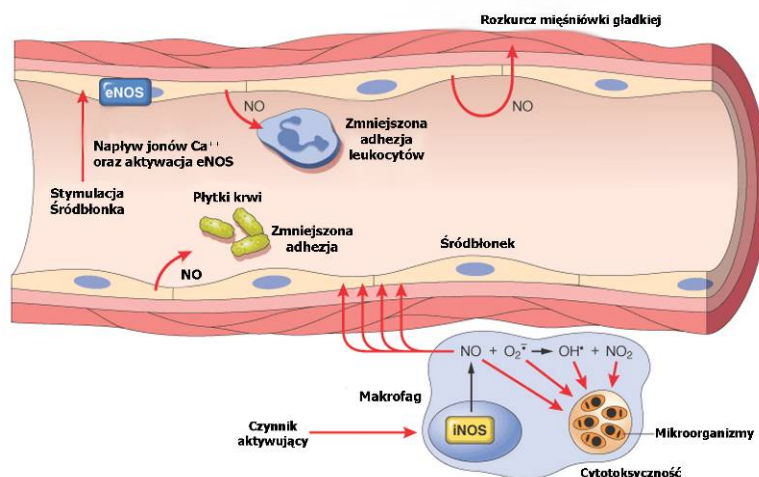
Jest to grupa enzymów, uczestnicząca w metabolizmie kwasu arachidonowego oraz procesach red-ox. Wówczas istnieje możliwość przekazania dodatkowego elektronu z kofaktora (np. z NAD(P)H) na tlen cząsteczkowy [128]. Znaczenie cyklooksygenazy w dysfunkcji śródbłonna oraz w stresie oksydacyjnym nie jest poznane. Zauważono rolę cyklooksygenazy w aktywacji oksydazy NAD(P)H [53].

### ***1.3.3.4. Oksydazy mitochondrialne***

Jest to grupa enzymów, które wchodzą w skład łańcucha oddechowego, konstytutywnie produkują wolne rodniki tlenowe, które są niezwłocznie wymiatane przez dysmutazę ponadtlenkową [150].

### ***1.3.3.5. Syntaza tlenu azotu***

Syntaza tlenu azotu (NOS), jest enzymem, katalizującym przemianę L-argininy do L-cytruliny, podczas której powstaje NO. Do tego procesu konieczna jest tetrahydrobiopteryna (BH<sub>4</sub>) jako kofaktor oraz NADPH jako źródło elektronów. Istnieją trzy izoformy tego enzymu: eNOS (NOS3) – śródbłonkowa NOS – występuje głównie w śródbłonku naczyniowym i odpowiada za stałą produkcję tlenu azotu w naczyniach krwionośnych. nNOS (NOS1) – neuronalna NOS – jest to izoforma zlokalizowana głównie w centralnym systemie nerwowym i odpowiada za procesy regulatorowe. Te dwie izoformy są stale obecne w komórkach, aktywowane przez wzrost śródkomórkowego stężenia jonów wapnia [151]. Trzecią izoformą jest iNOS – indukowana syntaza tlenu azotu (NOS2; Rycina 5). Jest ona zdolna do produkcji bardzo dużych ilości NO, niezależnie od obecności



Rycina 5. Znaczenie eNOS oraz iNOS w ludzkich naczyniach.  
Zmodyfikowano za Kumar i wsp. [151].

podwyższonego stężenia jonów wapnia, czego wymagają pozostałe izoformy [152]. Proces zapalny oraz układ immunologiczny aktywują iNOS. W przypadku zakażenia odgrywa ona kluczową rolę w opanowaniu infekcji [152]. Opisano także jej obecność w procesie miażdżycowym, obejmującym aortę [153].

W przypadku niedoboru L-argininy lub  $BH_4$  dochodzi do rozprężenia transportu elektronów. Powoduje to dysfunkcję NOS [65, 154]. Dochodzi wówczas do przekazania elektronu na tlen cząsteczkowy, co prowadzi do powstania anionu nadadtlenkowego. Suplementacja  $BH_4$  lub stosowanie inhibitorów syntazy NO prowadzi do zahamowania produkcji wolnych rodników tlenowych [67]. Zauważono to u palaczy, gdzie suplementacja  $BH_4$  powodowała poprawę czynności śródbłonna [123]. W ludzkich naczyniach zauważono zależność pomiędzy dysfunkcją NOS a stresem oksydacyjnym, który przez utlenianie  $BH_4$  do  $BH_2$  nasila dysfunkcję eNOS [155]. W ludzkich naczyniach rola iNOS w przeciwieństwie do eNOS nie jest jeszcze dokładnie poznana.



## **I.4. Klinika tętniaków aorty brzusznej**

### *I.4.1. Charakterystyka kliniczna*

Przebieg naturalny tętniaków aorty brzusznej w 75% przypadków jest bezobjawowy. Są one najczęściej wykrywane przypadkowo [7, 28, 37, 156]. Objawy są następstwem powiększania się lub procesu pęknięcia ściany tętniaka, ucisku na otaczające struktury, niekiedy embolizacji obwodowej. Owrzodzenie w ścianie zmienionej aorty zostaje pokryte skrzepliną, która może stać się materiałem zatorowym. Częstą kliniczną postacią zatorowości jest zespół „niebieskiego palucha” [157]. Obserwowano też zatorowość w nerkach i tętnicach kręzkowych [50, 52].

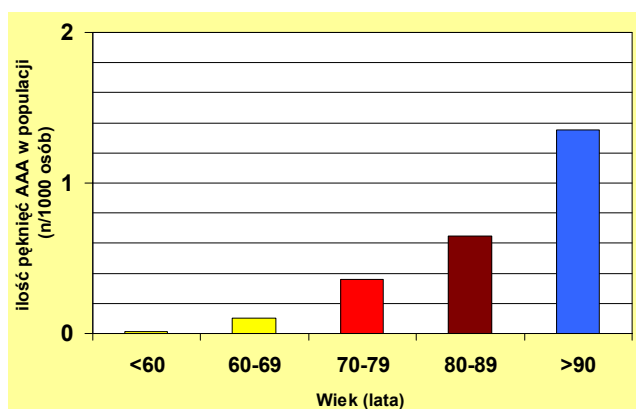
W przypadku tętniaków stabilnych głównymi dolegliwościami, na jakie skarżą się pacjenci, są niecharakterystyczne bóle brzucha [7, 28, 40, 157].

Tętniaki duże i szybko rosnące są często również zupełnie bezobjawowe. Mogą występować nieswoiste bóle, pojawiające się nagle [7, 28, 157], oraz czasem uczucie pulsowania w jamie brzusznej. Pacjenci mogą się także skarżyć na uczucie sytości po niewielkich posiłkach, mogą także występować nudności, wymioty, a także utrata masy ciała. Jednym z objawów mogą być bóle w okolicy nerek oraz rozwinięcie odmiedniczkowego zapalenia nerek, co jest wynikiem ucisku na moczowód [7, 28, 157].

Często pierwszym objawem klinicznym tętniaka aorty brzusznej jest jego ostre rozwarstwienie powikłane pęknięciem i wynaczynieniem krwi do przestrzeni zaotrzewnowej. Pacjenci często skarżą się na silny ból, promieniujący do pleców, miednicy i nóg. W zależności od wielkości pęknięcia może dochodzić do hipotensji, zaburzenia świadomości, omdleń, utraty przytomności oraz rozwinięcia pełnych objawów wstrząsu hypowolemicznego i zgonu [5, 28, 47, 157].

### 1.4.2. Ocena ryzyka

Ocena ryzyka u chorych jest bardzo ważna dla wyboru formy leczenia, aby wykorzystać najlepszy moment do zastosowania leczenia inwazyjnego lub chirurgicznego. Ryzyko pęknięcia zależy od rozmiaru tętniaka, a dokładnie od maksymalnego wymiaru poprzecznego naczynia [5-7, 35, 47, 158]. Dla tętniaków, których rozmiar wynosi 4–5cm ryzyko pęknięcia wynosi 1–3%, dla większych tętniaków (5–7cm) ryzyko wynosi 6–11%, natomiast dla największych (>7cm) tętniaków 20% [5, 6, 35]. Tętniaki o rozmiarze poniżej 4 cm obarczone są najmniejszym ryzykiem pęknięcia [37, 38, 47]. Większe tempo poszerzania się tętniaka zauważono u chorych z nadciśnieniem tętniczym, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc oraz z obecną skrzepliną w świetle naczynia [6, 35, 47].



Rycina 6. Częstość pęknięcia AAA w zależności od wieku – zmodyfikowano za Creager M [159].

Szybki (>0,5–1cm/rok) przyrost średnicy tętniaka zwiększa dodatkowo prawdopodobieństwo pęknięcia ściany naczynia [5-7, 35, 37, 41, 47, 52, 158]. Najsilniejszymi czynnikami ryzyka pęknięcia, oprócz rozmiaru tętniaka, są przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz ból (nawet jeżeli jest niejednoznaczny i niewyraźny). Innymi czynnikami pęknięcia tętniaka są wiek, płeć żeńska oraz niewydolność nerek [35, 38, 47, 49, 52].

Istnieją trzy główne skale, stosowane do oceny ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych u chorych z tętniakami aorty brzusznej [50]. Skala Vanzetto najlepiej wyodrębniła grupę pacjentów, u których częściej

pojawiały się incydenty sercowo-naczyniowe oraz wśród których śmiertelność była większa.

#### *Skala Vanzetto*

W literaturze skala ta jest używana do oceny ryzyka operacji tętniaków aorty brzusznej, obok skali Glasgow, Leidena oraz zmodyfikowanej Leidena. Nesi w swoim opracowaniu, porównując skalę Veznetto do pozostałych, pokazuje jej skuteczność w wyodrębnieniu grupy pacjentów z większym ryzykiem okołoperacyjnym [50]. Skala ta bierze pod uwagę takie parametry jak: wiek powyżej 70 lat, obecność choroby niedokrwiennej serca oraz przebyty zawał mięśnia serca, obecność załamków Q i zmian w zakresie odcinka ST w zapisie EKG, współistnienie zastoinowej niewydolności krążenia, cukrzycy oraz nadciśnienia tętniczego z przerostem lewej komory [160].

#### ***1.4.3. Leczenie***

Celem leczenia pacjenta z tętniakiem aorty brzusznej jest zapobieganie śmierci spowodowanej pęknięciem tętniaka oraz zniesienie potencjalnych objawów klinicznych. Jedną z najważniejszych strategii terapeutycznych jest wpływ na czynniki ryzyka. Szczególnie dotyczy to zaprzestania palenia tytoniu, które pozwala zarówno zmniejszyć ryzyko powstania tętniaka, jak i ma znaczenie w profilaktyce wtórnej oraz zmniejsza ryzyko powikłań okołoperacyjnych [49, 51]. W przypadku tętniaków poniżej 4cm szerokości zalecana jest okresowa kontrola ultrasonograficzna lub tomograficzna rozmiaru tętniaka co 6 miesięcy.

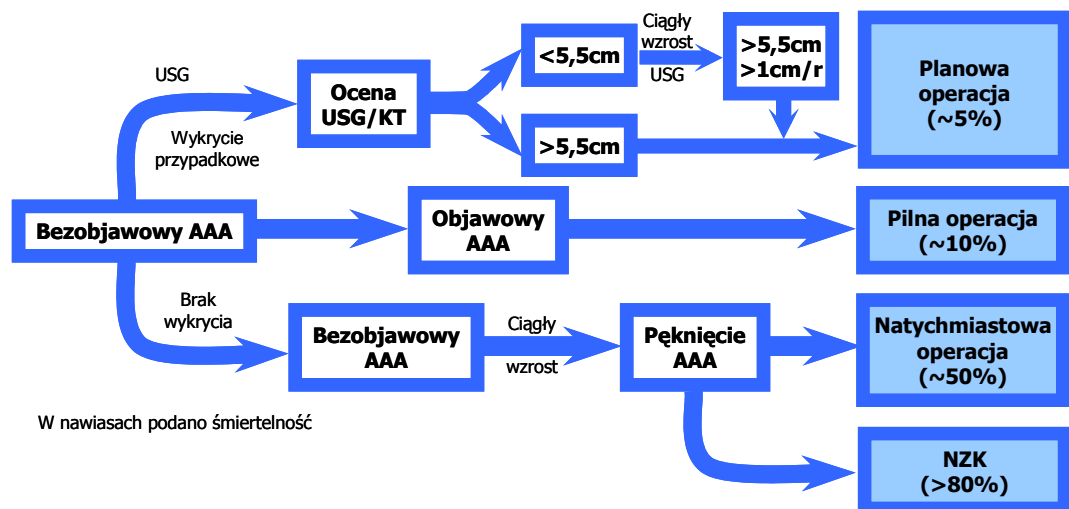
W przypadku tętniaków 4–6cm również zalecana jest częstsza kontrola [37, 38, 41, 47]. W badaniu Ballarda nie wykazano różnic w śmiertelności pomiędzy chorymi z tętniakami <5,5cm, których poddano operacji, a tymi, którzy pozostawali pod kontrolą ultrasonograficzną [37]. Konkluzją tego

badania było, iż pacjent powinien zostać skierowany do leczenia zabiegowego, jeżeli tętniak szybko rośnie (>1cm/rok) lub jeżeli osiągnie rozmiar 5,5cm.

U chorych z AAA o niskim ryzyku stosuje się najczęściej  $\beta$ -blokery oraz statyny. Nie wykazano różnicy w przeżywalności pomiędzy chorymi zażywającymi propranolol i placebo. Zostało to udowodnione w randomizowanym badaniu z podwójnie ślepą próbą [40]. Badanie Gadowskiego [41] pokazało natomiast, że u chorych zażywających propranolol przyrost wielkości jest znacznie wolniejszy. Kertai wykazał, iż przewlekłe stosowanie statyn, niezależnie od stosowania propranololu, wiązało się ze zmniejszeniem śmiertelności [161]. Coraz więcej mówi się o roli inhibitorów ACE w spowolnieniu powiększania się tętniaka. Brak jednak jednoznacznych wyników na ten temat [162, 163].

W przypadku dużych tętniaków, jak i szybko powiększających się, chory powinien zostać poddany leczeniu zabiegowemu tętniaka albo przez klasyczną operację albo przez endowaskularne wszczepienie stentgraftu.

Operacja wiąże się ze śmiertelnością ok. 1,2%, natomiast inne powikłania pojawiają się u 17% chorych [5, 36, 37, 48, 158]. Przeżywalność 5-letnia wynosi 75%, natomiast 10-letnia 49% [6].



Rycina 7. Śmiertelność w zależności od przebiegu naturalnego AAA – zmodyfikowano na podstawie Thompson M. i wsp. [164].

Endowaskularny zabieg wykluczenia tętniaka aorty brzusznej jest alternatywą dla operacji. Duże, randomizowane badanie Prinsena [165] z 2004 roku dotyczyło leczenia zabiegowego chorych z tętniakami o rozmiarze >5cm. Wykazało ono mniejszą śmiertelność okołoperacyjną, znamienne mniejszą częstość powikłań (do 30 dni od zabiegu) u pacjentów poddawanych wszczepieniu stentgraftu względem tych poddanych klasycznej operacji.

#### ***1.4.4. Rokowanie***

Tętniaki aorty obarczone są dużym ryzykiem śmiertelności, a leczenie operacyjne jest nadal związane z wysokim odsetkiem powikłań [49, 166]. Najpoważniejszym powikłaniem naturalnego przebiegu choroby jest pęknięcie ściany aorty. Śmiertelność tych chorych waha się pomiędzy 70–80% [5, 6, 36, 47, 158]. Jeżeli uda się chorych z AAA poddać leczeniu inwazyjnemu lub chirurgicznemu, wówczas śmiertelność spada do ok. 40% [5, 6, 158].

Natomiast jeżeli tętniaki aorty brzusznej zostaną poddane leczeniu w sposób planowy wówczas śmiertelność wynosi ok. 1–5% [5, 28, 37, 158]. Przeżywalność 5-letnia u chorych poddanych chirurgicznej naprawie tętniaka aorty brzusznej waha się w granicach 49–84% [5, 35, 37, 47, 158].

## II. Cele pracy

Wstępne badania eksperymentalne na zwierzętach wykazały zwiększoną produkcję anionu nadtlenkowego w ścianie tętniaka w porównaniu do prawidłowej części naczynia [121, 140]. Dotychczas tylko jedno badanie analizowało produkcję wolnych rodników tlenowych w tętniakach aorty (AAA) u człowieka [77]. Źródła, a także znaczenie nadprodukcji anionu nadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej nie są do tej pory poznane.

Celem pracy jest:

1. Porównanie ogólnoustrojowych parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z AAA oraz w grupie kontrolnej.
2. Ocena jakościowa i ilościowa produkcji anionu nadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej.
3. Zbadanie źródeł enzymatycznych oraz podstawowych mechanizmów regulujących produkcję anionu nadtlenkowego w AAA.
4. Określenie związku produkcji anionu nadtlenkowego z cechami klinicznymi AAA.

### III. Materiał

Badaniem zostało objętych 40 chorych poddawanych zabiegowi resekcji tętniaka aorty brzusznej w Oddziale Chirurgii Naczyniowej Szpitala im. J. Grandego w Krakowie. Spośród tych pacjentów wyodrębniono grupę 16 chorych, od których pobrano krew przed zabiegiem dla oceny parametrów stresu oksydacyjnego. U 5 chorych, u których warunki anatomiczne pozwalały na to, pobrano wycinek ściany tętniaka z marginesem zdrowej tkanki.

Grupę kontrolną dla oceny parametrów stresu oksydacyjnego we krwi stanowiło 16 pacjentów Kliniki Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi CM UJ. Byli oni dobierani każdorazowo jako para dla pacjenta z grupy z AAA. Podczas łączenia chorych w pary w pełni zgodne były następujące czynniki kliniczne: wiek ( $\pm 5$  lat), płeć, występowanie nadciśnienia tętniczego, palenia tytoniu oraz chorób płuc, w tym przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Zwracano uwagę na inne czynniki ryzyka, takie jak współistnienie hypercholesterolemii, cukrzycy, choroby niedokrwiennej serca, miażdżycy uogólnionej, zaburzeń genetycznych.

Do badania nie zostali włączeni chorzy z chorobami nowotworowymi.

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zgodnie z wymogiem Komisji Etycznej, uzyskiwano świadomą zgodę pacjenta na udział w badaniu.

## IV. Metodyka

### IV.1. Protokół badania

Podczas wywiadu lekarskiego oraz badania fizykalnego zebrano poniższe dane kliniczne: dane demograficzne, charakterystyka dolegliwości, obecność czynników ryzyka: nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów, przewlekła obturacyjna choroba płuc, objawy miażdżycy uogólnionej (rozsiane zmiany w tętnicach obwodowych), choroba niedokrwienna serca, zaburzenia gospodarki lipidowej, cukrowej, wywiad rodzinny w kierunku chorób naczyniowych, obecność układowych chorób tkanki łącznej, chorób wrodzonych (Zespół Marfana, Zespół Ehlers-Danlos).

Analizowano również następujące dane laboratoryjne: wartości morfologii krwi, poziomy elektrolitów, lipidogram, poziom glukozy we krwi. U większości chorych w analizie uwzględniono również wyniki innych badań dodatkowych (ultrasonografia oraz tomografia komputerowa), określające rozmiary tętniaka i jego rodzaj przed zabiegiem. Skalą Vanzetto oceniano ryzyko przedoperacyjne – obliczano dla każdego pacjenta zgodnie z punktacją skali, opisaną poniżej [50, 167]. Uzyskano dane śródoperacyjnie, takie jak kształt morfologiczny tętniaka, jego rozmiar i dokładna lokalizacja.

Krew pełną uzyskano od 16 chorych z AAA oraz 16 chorych z grupy kontrolnej. Krew pobierano od chorego z AAA przed zabiegiem operacyjnym (20 ml) na EDTA i następnie wirowano w temperaturze 4°C, przez 10 min. (3000 obrotów/min.), a uzyskane w ten sposób osocze i leukocyty przechowywano w temperaturze -70°C do momentu oznaczeń.

Od pacjentów z AAA uzyskano wycinek ściany aorty poszerzonej tętniakowato. Wycinek o rozmiarach 1cm x 2cm każdorazowo był pobierany z miejsca największego poszerzenia. Tkanka była zbędna dla



celów chirurgicznych. U 5 chorych, u których istniały odpowiednie warunki anatomiczne, chirurg pobrał wycinek aorty obejmujący region maksymalnego poszerzenia oraz margines zdrowej ściany aorty.

Każdorazowo wycinek, natychmiast po pobraniu, przenoszono do schłodzonego buforu Krebs-HEPES (99 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,9 mM CaCl<sub>2</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 11,1 mM Glukoza and 20 mM HEPES). Tak zabezpieczony fragment tętniaka transportowano do laboratorium. Krew oraz wycinek ściany aorty były przechowywane na lodzie do momentu opracowania i oznaczeń czynnościowych.

W laboratorium skrawek każdorazowo dzielono na trzy fragmenty. Pierwszy zamrażany w medium OCT (Sakura, Japonia; -70°C) dla celów późniejszych oznaczeń histologicznych. Drugi zamrażany (-70°C) dla późniejszego określenia aktywności czynników związanych ze stresem oksydacyjnym. Trzeci był natychmiast poddawany ilościowej ocenie produkcji wolnych rodników tlenowych w stanie podstawowym jak i po stymulacji przy pomocy NADPH w celu maksymalnego pobudzenia oksydazy NAD(P)H. Doświadczenia czynnościowe rozpoczynano 30 minut od pobrania naczynia.

Kliniczna ocena ryzyka przedoperacyjnego była przeprowadzona z wykorzystaniem skali Vanzetto [50, 167]. Punktacja skali mieści się w zakresie od 0 do 8 punktów. Punktowana jest obecność poniższych czynników: wiek powyżej 70 lat (1 punkt), dławica piersiowa (1 punkt), przebyty zawał serca (1 punkt), załamki Q w zapisie spoczynkowego EKG (1 punkt), obniżenie odcinka ST o przynajmniej 0,1mV (1 punkt), nadciśnienie tętnicze (1 punkt), przewlekła niewydolność krążenia (1 punkt) oraz cukrzyca (1 punkt). Jako najlepszą wartość odcięcia uznano 3 punkty [50].

## **IV.2. Ocena ogólnoustrojowych parametrów stresu oksydacyjnego**

Ocenie parametrów stresu oksydacyjnego poddano chorych zarówno z AAA, jak i z grupy kontrolnej.

W badaniach wykorzystywane są liczne metody oznaczania stresu oksydacyjnego za pośrednictwem poziomu peroksydacji lipidów. Wykorzystują one substancje reagujące z tiobarbituranami (TBARS). Jedną z nich, uważaną za najbardziej specyficzną, jest oznaczanie poziomu MDA (malonylo dialdehydu) z wykorzystaniem HPLC [168]. Metoda ta jest powszechnie wykorzystywana do oceny poziomu peroksydacji lipidów i jako biomarker stresu oksydacyjnego [141-143, 169, 170]. MDA jest jednym z ostatecznych produktów peroksydacji lipidów w osoczu. MDA, reagując z N-metylo-2-fenyliodatem, tworzy kompleks chromoforowy, który później może być oznaczony metodą wysokiej czułości analiz chromatografii cieczowej z detekcją masową (HPLC/MS) [168].

Oznaczenia HPLC/MS wykonano w Katedrze Farmakologii CM UJ wg zmodyfikowanej metody opisanej przez Sim i wsp [168]. Próbki osocza wyjściowo inkubowano z NaOH celem uwolnienia związanego MDA, a następnie z zastosowaniem kwasu nadchlorawego strącano białka. Następnie nadsącz poddany był dwukrotnej ekstrakcji z n-heksanem. Oddzielona faza organiczna była analizowana w HPLC/MS [168].

## **IV.3. Ocena produkcji i źródeł anionu ponadtlenkowego**

Produkcję anionu ponadtlenkowego oznaczano zarówno ilościowo, jak i jakościowo. Pomiarów dokonywano w skrawkach naczyniowych w ciągu ok. 30 minut od momentu pobrania. Cały czas segmenty były przechowywane w lodzie, gdyż, jak wykazano we wstępnych

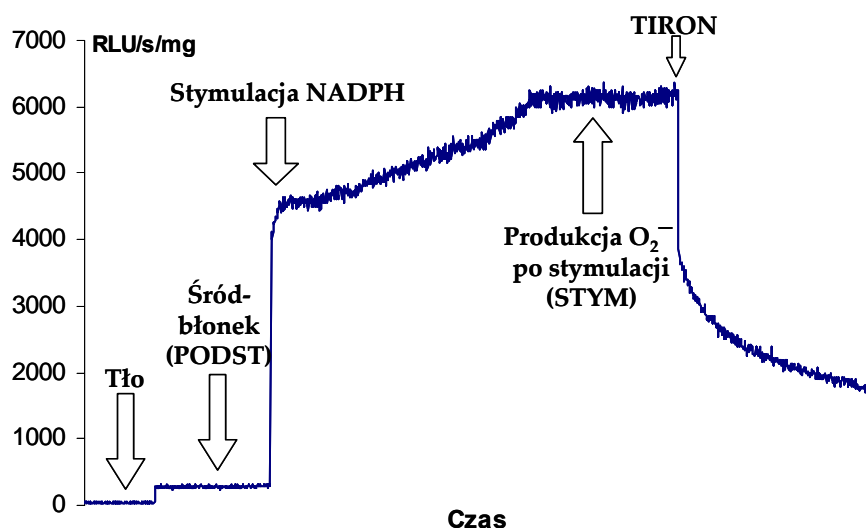
doświadczeniach pozwala to na zachowanie niezmienionej produkcji anionu ponadtlenkowego [53].

Określenie produkcji wolnych rodników przeprowadzono metodą chemiluminescencji zależnej od lucygeniny [53, 65, 171-173]. Badanie przeprowadzono w stałej temperaturze (37°C) i przy stałym stężeniu lucygeniny (5µM) [171, 173] z zastosowaniem chemiluminometru FB12 (Berthold, Niemcy) [53, 63, 77]. Lucygenina (bis-N-methylacridinium; Sigma, Anglia) jest substancją chemiluminescencyjną, która jest szeroko stosowana do wykrywania produkcji anionu ponadtlenkowego. Lucygenina, wchodząc w reakcję z anionem ponadtlenkowym, produkuje foton światła, który jest oznaczany. Wyniki wyrażano jako ilość względnych jednostek światła – RLU (Relative Light Unit) w czasie, w przeliczeniu na miligram suchej masy (RLU/s/mg). Technika ta jest szeroko stosowana w literaturze [53, 63, 65, 77, 127, 149, 171-174]. W badaniach wstępnych określono, iż wartości suchej masy są ściśle skorelowane z ilością białka w tkance. Optymalny rozmiar tętniaka do analizy określono w doświadczeniach wyjściowych i ustalono jako 5–10mg suchej masy. Tak określony zakres fragmentów tętniaka umożliwia porównawczą ocenę ilościową. Roztwór lucygeniny był przygotowywany w formie stężonej – 500x (1,25mg/ml) i był przechowywany w ciemności.

Oznaczenie chemiluminescencji wykonywano zarówno w stanie podstawowym jak i po stymulacji oksydazy NAD(P)H: przez NADPH (stężenie ostateczne 100µM). Fragment tętniaka był inkubowany w stałej temperaturze (37°C) przez 30 min. w natlenowanym (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Linde, Polska) buforze Krebs-HEPES. Następnie fragment tętniaka był przenoszony do komory pomiarowej do roztworu lucygeniny (5 µM) w 2ml buforu Krebs-HEPES, z którego uprzednio zapisano chemiluminescencję tła.

Fragment tętniaka umieszczano tak aby śródbłonek był skierowany na kamerę luminometru i mierzono chemiluminescencję przez ok. 15 min.

(do uzyskania stabilnego zapisu). Następnie dodawano NADPH w celu uzyskania maksymalnej aktywacji oksydazy NAD(P)H, którą zapisywano przez ok. 30 min., aż do uzyskania stabilnego zapisu (plateau – Rycina 8).



Rycina 8. Przykładowy zapis z chemiluminometru. W pierwszym etapie było zapisywane promieniowanie tła, mierzono promieniowanie ze ściany tętniaka – ze śródbłonek (PODST). Ostatecznie podawano NADPH celem uzyskania maksymalnej stymulacji oksydazy NAD(P)H – STYM. Podawanie TIRON-u na końcu doświadczenia potwierdzało specyficzność sygnału dla anionu ponadtlenkowego.

Swoistość dla anionu ponadtlenkowego potwierdzano doświadczeniem z preinkubacją z PEG-SOD (500 U/ml) lub z wykorzystaniem TIRON-u (sól dwusodowa kwasu 4,5-dihydroxy-1,3-benzodisulfonowego – stężenie ostateczne 10  $\mu$ M) zarówno do preinkubacji, jak i przez dodanie tego wymiatacza wolnych rodników na końcu doświadczenia [53].

Aby określić źródła i podstawowe mechanizmy stresu oksydacyjnego zastosowano wiele inhibitorów oksydaz i enzymów, które mogłyby potencjalnie uczestniczyć w generacji anionu ponadtlenkowego. Segmenty naczyń były inkubowane w natlenowanych roztworach (37°C) wymienionych substancji przez minimum 30 min. Następnie fragment tętniaka przenoszony był do komory pomiarowej luminometru, gdzie

znajdowała się ta sama substancja w stężeniu, jak podczas inkubacji [65]. Pomiar były wykonywane identycznie.

Specyficzność sygnału dla anionu ponadtlenkowego identyfikowano przez doświadczenia z wykorzystaniem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), która jest wymiataczem  $O_2^-$  [175, 176]. Enzym ten katalizuje przemianę dwóch cząstek anionu ponadtlenkowego w tlen cząsteczkowy oraz nadtlenek wodoru. Podobnie działa TIRON, który jest mimetykiem SOD, penetrującym przez błony komórkowe [176].

Aby określić aktywność oksydazy NAD(P)H wykorzystywano selektywny inhibitor tego enzymu, jakim jest apocynina [63, 177]. Aktywność syntazy tlenu azotu najpierw modyfikowano inhibitorem nieselektywnym dla izoform (L-NAME), a następnie specyficznym dla enzymu iNOS – benzylo-acetamidyną N-(3-Aminometylu) – 1400W. Jest on bardziej specyficzny dla iNOS 1000-krotnie niż dla eNOS i 200-krotnie niż dla nNOS [178, 179].

Rolę pozostałych potencjalnych źródeł anionu ponadtlenkowego określano każdorazowo z wykorzystaniem specyficznych dla danego enzymu inhibitora (Tabela 2). Rolę kinazy białkowej C (PKC) w regulacji produkcji anionu ponadtlenkowego była, precyzowana z wykorzystaniem Chelerytryny, inhibitora PKC [180].

Po zakończeniu doświadczenia fragment tętniaka był suszony w temperaturze 45–50°C przez 24h. Sucha masa była określana przy pomocy wagi miligramowej.

Tabela 2. Używane czynniki modyfikujące dostępność anionu nadtlenkowego.

Nazwa	Mechanizm działania	Stężenie ostateczne	Producent
<i>Apocynina</i>	swoisty inhibitor aktywacji oksydazy NAD(P)H	500 $\mu$ M	Calbiochem
<i>Difenyleneiodonium (DPI)</i>	inhibitor oksydaz flawinowych	100 $\mu$ M	Sigma, Anglia
<i>Indometacyna</i>	nieselektywny inhibitor cyklooksygenazy	10 $\mu$ M	Sigma, Anglia
<i>Allopurinol</i>	inhibitor oksydazy ksantynowej	100 $\mu$ M	Sigma, Anglia
<i>Rotenon</i>	inhibitor oksydaz mitochondrialnych	100 $\mu$ M	Sigma, Anglia
<i>Ester Metylowy L-NG-nitroargininy (L-NAME)</i>	inhibitor syntazy tlenu azotu	100 $\mu$ M	Sigma, Anglia
<i>Benzylo Acetamidyna N-(3-Aminometylu) (1400W)</i>	selektywny nieodwracalny inhibitor indukowanej syntazy tlenu azotu	100 $\mu$ M	Calbiochem
<i>Chelerytryna</i>	inhibitor kinazy białkowej C (*)	1 $\mu$ M	Calbiochem
<i>Dysmutaza nadtlenkowa (SOD)</i>	wymiatacz anionu nadtlenkowego	500 U/ml	Sigma, Anglia
<i>TIRON</i>	mimetyk SOD penetrujący do środka komórki	10 mM	Sigma, Anglia
(*) – Blokuje on translokację tej kinazy z cytozolu do błony komórkowej.			

#### **IV.4. Histochemiczna ocena produkcji anionu ponadtlenkowego**

Dihydroetydyna (DHE) jest niebieskim barwnikiem fluoroscencyjnym, który wykazuje zdolność do przenikania błon komórkowych. Produktem utlenienia DHE przez reaktywne formy tlenu jest, wykorzystujący czerwoną fluorescencję, bromek etydyny (EtBr), który wykazuje powinowactwo do DNA, dzięki czemu utleniona forma barwnika pozostanie w komórce. DHE wykazuje w pewnym stopniu swoistość wobec anionu ponadtlenkowego [65]. Ze względu na możliwość utleniania DHE przez inne wolne rodniki badania prowadzono w obecności SOD.

Przygotowany skrawek o grubości 30 $\mu$ m umieszczano na szkiełku podstawowym i inkubowano początkowo przez 30 min. w roztworze DHE (stężenie ostateczne 2 $\mu$ M). Tak przygotowane skrawki były oznaczane w mikroskopie konfokalnym z wykorzystaniem spektrum wzbudzenia 488nm, spektrum emisji natomiast 610nm [53, 63, 174].

#### **IV.5. Analiza statystyczna**

Do oceny statystycznej wykorzystywano program SPSS for Windows v5.5. Analizowano korelację oraz porównywanie średnich arytmetycznych.

W pierwszym etapie zbadano rozkład normalny dla wszystkich zmiennych ilościowych ciągłych, a normalność rozkładu potwierdzano testem Shapiro-Wilk'a. Dla danych parametrycznych w pierwszym etapie wykorzystano standardowe statystyki opisowe oraz wyznaczono dystrybuanty empiryczne.

Dla porównywania średnich arytmetycznych wykorzystywano następujące testy statystyczne: test t-studenta dla zmiennych związanych

oraz dla zmiennych niezwiązanych, test F-Fishera, test Wilcoxon (gdy rozkład różny od normalnego).

Dla analizy korelacji zastosowano test rang Pearsona i Spearmana oraz test  $\chi^2$  z poprawką Yatesa dla korelacji w tabelach wielodzielniczych.

Wartości  $p < 0,05$  uznawane są za znamienne statystycznie.



## V. Wyniki

### V.1. Charakterystyka kliniczna chorych z AAA

Większość spośród badanych 40 chorych z AAA stanowili mężczyźni (35 pacjentów – 87,5%; Tabela 3). Średni wiek chorych wynosił  $65,7 \pm 6,7$  lat; najmłodszy miał 51 lat, a najstarszy 75. Nadciśnienie tętnicze występowało u 31 (77,5%) chorych, a 28 (70% – wg danych z wywiadu) pacjentów paliło tytoń, przy czym jedynie 13 (32,5%) przyznawało, iż są czynnymi palaczami. Zaburzenia gospodarki lipidowej występowały u 26 (65%) owych chorych, najczęściej pod postacią mieszanej hiperlipidemii (14 pacjentów) lub hypercholesterolemii (12 pacjentów). U 1/3 chorych z zaburzeniami gospodarki lipidowej stosowano leczenie farmakologiczne.

Tabela 3. Charakterystyka ogólna chorych z AAA.

	<b>Chorzy z AAA</b>
Liczba badanych	40 pacjentów
Średni wiek	$65,7 \pm 6,7$ (51–75)
Płeć męska (żeńską)	87,5% (K: 12,5%)
BMI	$26,9 \pm 3,3$ (19,9–33,3)

Spośród pozostałych czynników ryzyka miażdżycy cukrzyca występowała jedynie u 3 chorych (Tabela 4). Choroba niedokrwienno serca współwystępowała u 27 (67,5) pacjentów, pod postacią stabilnej duszniczo bolesnej. Przebyty zawał mięśnia serca (>30 dni do momentu hospitalizacji) stwierdzono u 12 (30%) chorych. Zmiany odcinka S-ST w zapisie spoczynkowego EKG występowały u 14 (35%) chorych, najczęściej były to niewielkiego stopnia obniżki odcinka S-ST.

Istotnymi czynnikami ryzyka rozwinięcia tętniaków aorty brzusznej, oprócz nadciśnienia tętniczego oraz nikotynizmu, jest rozedma płuc, a także

przewlekła obturacyjna choroba płuc, które rozpoznawane były u 13 (32,5%) operowanych. Współistnienie zaawansowanych zmian miażdżycowych dotyczyło 12 (30%) pacjentów i występowało głównie pod postacią niedokrwienia kończyn dolnych, które u 2 chorych wymagało rewaskularyzacji w trakcie hospitalizacji. U 7 (17,5%) osób tętniaki aorty brzusznej występowały rodzinnie. W wywiadzie jeden chory zgłaszał incydent niedokrwienia centralnego układu nerwowego, pod postacią przejściowego niedokrwienia (TIA).

Tabela 4. Charakterystyka chorych z AAA cz.1 – choroby współistniejące.

Parametr	n (%)
Nadciśnienie	31 (77,5%)
Rozedma/ POChP	13 (32,5%)
Palenie (wywiad)	28 (70%)
Palenie (aktualnie)	13 (32,5%)
Miażdżyca obwodowa	12 (30%)
Cukrzyca	3 (7,5%)
Zaburzenia gospodarki lipidowej	26 (65%)
Wywiad rodzinny	7 (17,5%)
Przejściowe niedokrwienie mózgu	2 (5%)
Choroba niedokrwienna serca	27 (67,5%)
Zawał mięśnia serca	12 (30%)
Zmiany S-ST	14 (35%)
Podwyższony poziom fibrynogenu	24 (60%)

Podwyższony poziom fibrynogenu (>3,5mg/dl) występował u 24 (60%) chorych. Średnia jego wartość wynosiła 3,9±1,6 mg/dl (Tabela 5). Prawie 50% operowanych chorych było otyłych (BMI>26). Średnia wartość wskaźnika BMI wynosiła 26,9±3,3 (Tabela 3).

Najważniejsze wartości badań dodatkowych charakteryzujących grupę chorych z AAA zebrano w Tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka chorych z AAA cz.2 – badania laboratoryjne.

Parametr	Jednostka	Średnia	Minimum	Maksimum
Cholesterol całk.	mM	6,3 ±1,8	4,6	11,1
HDL	mM	1,3 ±0,5	0,7	2,8
LDL	mM	4,0 ±1,6	1,2	8,4
TG	mM	2,2 ±1,0	0,7	4,1
Płytki	tys/mm <sup>3</sup>	204 ±15,8	240	350
Fibrynogen	mg/dl	3,9 ±1,6	1,7	8,1

Pacjenci w momencie przyjmowania do szpitala zażywali głównie inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (25 pacjentów – 62,5%) oraz β-bloker (14 pacjentów – 35%; Tabela 6).

Tabela 6. Charakterystyka chorych z AAA cz.3 – zażywane leki.

Grupa leków	n (%)
β-bloker	14 (35%)
ACEI	25 (62,5%)
Statyna	7 (17,5%)
Steroidy	5 (12,5%)

Wspomniane leki były zażywane w celu leczenia chorób współistniejących – nadciśnienia i choroby niedokrwiennej serca.

## V.2. Charakterystyka morfologiczna tętniaków aorty

Najważniejszymi parametrami opisującymi AAA, są rozmiar tętniaka oraz jego lokalizacja a także obecność skrzepliny. U wszystkich pacjentów poszerzenie dotyczyło odcinka poniżej odejścia tętnic nerkowych. Zaledwie w 1/3 przypadków poszerzenie przechodziło na tętnice biodrowe wspólne, co wymagało korekcji operacyjnej.

W badaniu ultrasonograficznym, wykonywanym przed operacją, średni rozmiar tętniaka wynosił 64,5±17,8mm (42–120 mm; Tabela 7). W

przypadku tętniaków o rozmiarze poniżej 50mm wskazaniem do zabiegu była duża dynamika poszerzania, morfologia poszerzenia oraz objawy kliniczne.

Pomiar rozmiaru i ocena morfologii tętniaka były wykonywane również śródoperacyjnie. Rozmiary tętniaków w niewielkim stopniu różniły się od wartości z badania ultrasonograficznego (różnica wynosiła średnio 7%).

Tabela 7. Przed- i śródoperacyjna ocena morfologiczna tętniaków.

	Parametr	Średnia	Minimum	Maksimum
Badanie USG	Maksymalne poszerzenie (L3) mm	64,5 ±17,8	42	120
	Rozmiar aorty podprzeponowo (L1) mm	26,0 ±4,1	19	33
	Stopień poszerzenia (L3/L1)	2,4 ±0,6	1,7	3,8
Zabieg	Śródoperacyjny pomiar mm	69,2 ±21,9	43	150
	Zakrzep w ścianie	77,5%	31 pacjentów	

Dodatkowo analizowanym parametrem był stopień poszerzenia. Jest to stosunek rozmiaru w miejscu maksymalnego poszerzenia do rozmiaru aorty w odcinku podprzeponowym. Stopień poszerzenia średnio wynosił 2,4±0,6.

U 77,5% pacjentów stwierdzano śródoperacyjnie w ścianie tętniaka obecność zakrzepu.

### V.3. Oznaczenia poziomu stresu oksydacyjnego

#### V.3.1. Porównanie cech klinicznych grup badanych

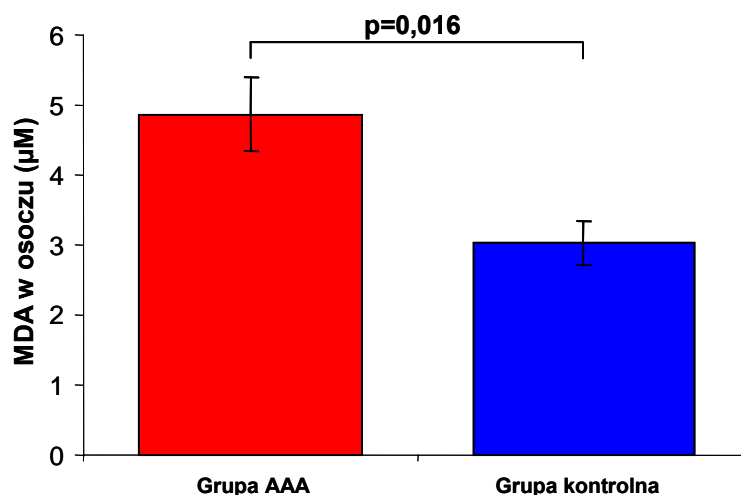
W Tabeli 8 przedstawiono porównanie głównych cech pacjentów z AAA oraz z grupy kontrolnej.

Tabela 8. Porównanie parametrów klinicznych w grupie badanej i kontrolnej.

Parametr	Chorzy z AAA n (%)	Chorzy bez AAA n (%)
Liczba badanych	16 pacjentów	16 pacjentów
Średni wiek	65,4±5,7 (51–75)	64,6±6,8 (54–74)
Płeć męska (żeńska)	75% (K:25%)	75% (K:25%)
BMI	26,9±3,3 (19,9–33,3)	29,7±5,2 (23,2–39,4)
Nadciśnienie	12 (75%)	12 (75%)
Rozedma/ POChP	5 (31,2%)	4 (25%)
Palenie (w wywiadzie)	11 (68,7%)	12 (75%)
Palenie (aktualnie)	5 (31,2%)	6 (37,5%)
Miażdżycy obwodowa	4 (25%)	3 (18,7%)
Cukrzyca	1 (6,2%)	2 (12,5%)
Zaburzenia gospodarki lipidowej	11 (68,7%)	10 (62,5%)
Wywiad rodzinny (AAA)	3 (18,7%)	0 (0%)
Przejściowe niedokrwienie mózgu	1 (6,2%)	1 (6,2%)
Choroba niedokrwienna serca	10 (62,5%)	11 (68,7%)
Zawał mięśnia serca	5 (31,2%)	4 (25%)

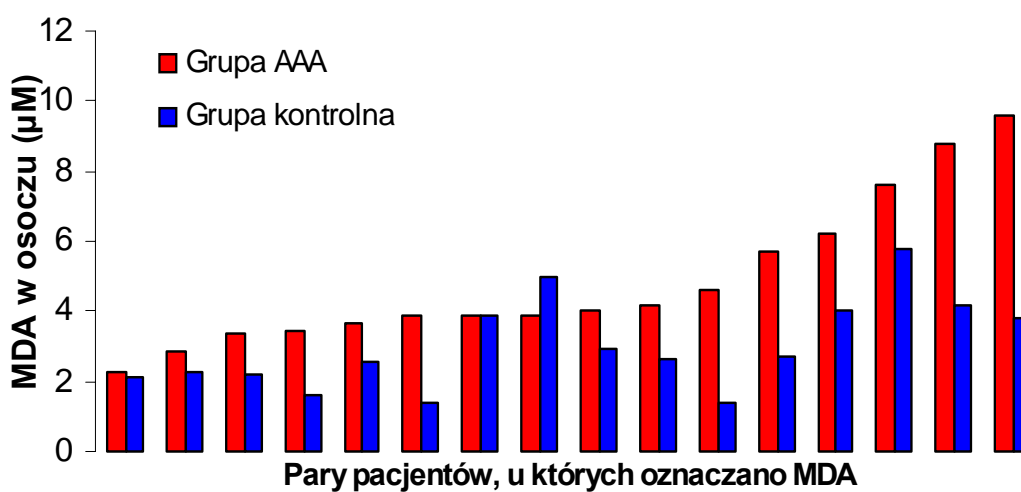
### V.3.2. Poziom stresu oksydacyjnego w poszczególnych grupach

W grupach AAA oraz kontrolnej mierzono stężenie malonylo dialdehydu (MDA,  $\mu\text{M}$ ) jako wykładnik stresu oksydacyjnego z osocza krwi pobieranej od pacjentów. Średnie stężenie MDA w osoczu pacjentów operowanych z powodu tętniaka aorty brzusznej wynosiła  $4,87 \pm 2,14 \mu\text{M}$  i była 1,6-krotnie większa od stężenia u chorych z grupy kontrolnej ( $3,02 \pm 1,29 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,02$ ; Rycina 9).



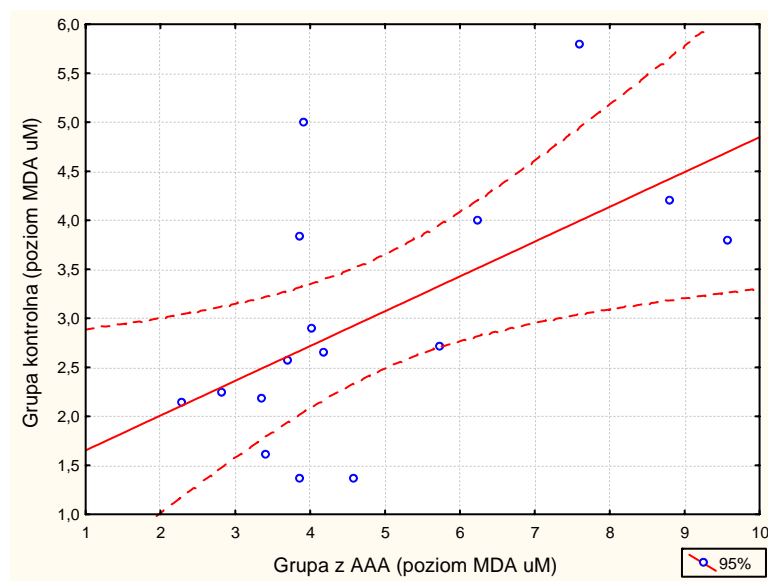
Rycina 9. Wartości MDA w osoczu chorych z grup AAA oraz kontrolnej (\*p=0,016).

U wszystkich par chorych, oprócz jednej, wartości MDA były niższe w grupie kontrolnej (Rycina 10).



Rycina 10. Rozkład wartości MDA w poszczególnych parach w badanych grupach.

Wartości MDA wykazywały znamiennej korelację pomiędzy dobranymi względem czynników ryzyka wieku i płci pacjentami z grup kontrolnej i z AAA. Współczynnik korelacji wynosi  $r=0,58$ ;  $p<0,05$  (Rycina 11).



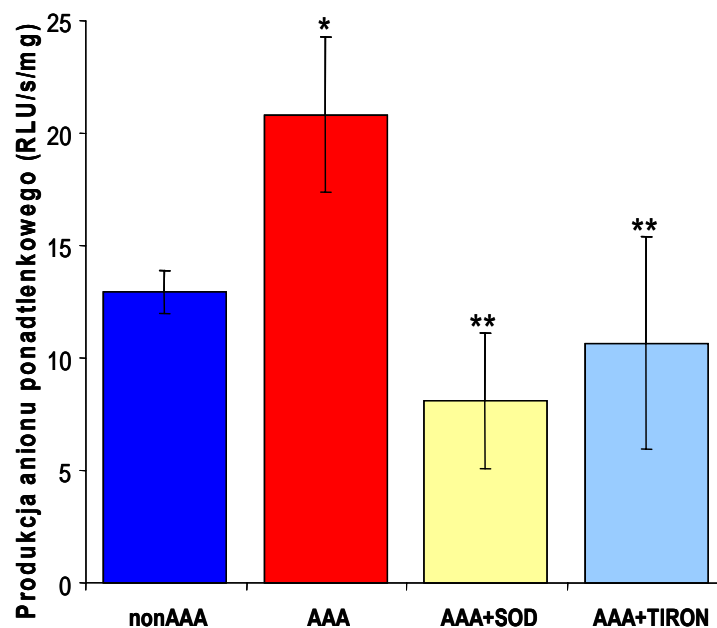
**Rycina 11. Korelacja pomiędzy wartościami MDA w grupach badanej oraz kontrolnej. Współczynnik korelacji wynosi  $r=0,58$ ;  $p<0,05$ .**

### ***V.3.3. Poziom MDA a produkcja anionu nadadtlenkowego.***

Porównywano wyniki wartości MDA z wynikami pomiarów z chemiluminescencji fragmentów ściany tętniaka aorty brzusznej. Nie wykazano korelacji pomiędzy wartościami MDA a poziomem produkcji wolnych rodników ze ściany aorty.

## **V.4. Produkcja anionu nadadtlenkowego**

Produkcja anionu nadadtlenkowego w odcinku maksymalnego poszerzenia była średnio 1,8-krotnie większa aniżeli we fragmencie nieposzerzonym ( $23,1 \pm 3,7$  RLU/s/mg suchej masy vs.  $12,9 \pm 1,0$  RLU/s/mg sm,  $p < 0,001$ ; Rycina 12). Aby udowodnić swoistość sygnału dla anionu nadadtlenkowego, wykonano pomiary w obecności wymiataczy anionorodnika nadadtlenkowego: dysmutazy nadadtlenkowej (PEG-SOD; 500U/ml) oraz TIRON-u (stężenie ostateczne 10mM).



Rycina 12. Produkcja anionorodnika ponadtlennkowego – pomiary z: AAA – ściany tętniaka; non-AAA- fragmentu aorty nieposzerzonego; (\* $p < 0,001$  vs. nonAAA; \*\*  $p < 0,001$  vs. AAA).

Zarówno PEG-SOD, jak i TIRON prowadziły do znacznego zmniejszenia wartości chemiluminescencji zależnej od lucygeniny mierzonej w obecności AAA, potwierdzając swoistość pomiaru dla anionu ponadtlennkowego. Wartości chemiluminescencji wynosiły odpowiednio 8,1 RLU/s/mg sm w obecności PEG-SOD ( $p < 0,001$  vs. AAA) oraz w obecności TIRON-u – 10,7 RLU/s/mg sm ( $p < 0,001$  vs. AAA).

Powyższe wyniki wyraźnie wskazują, iż w miejscu poszerzenia tętniakowatego produkcja anionu ponadtlennkowego jest znamienne podwyższona.

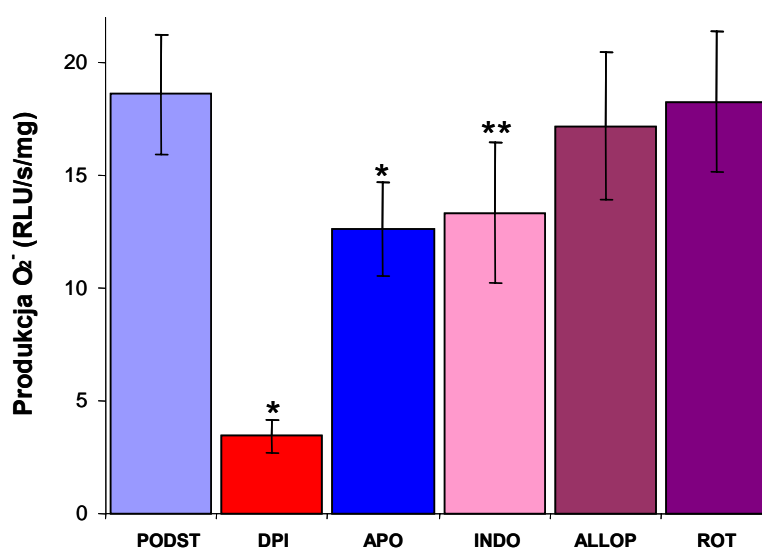


## V.5. Źródła enzymatyczne anionu ponadtlenkowego

Aby ocenić enzymatyczne źródła produkcji anionu ponadtlenkowego w ścianie tętniaka aorty brzusznej, wykonywano pomiary produkcji anionorodnika ponadtlenkowego po preinkubacji oraz w obecności inhibitorów oksydaz naczyniowych.

### V.5.1. Enzymatyczne źródła anionorodnika ponadtlenkowego

Produkcja anionu ponadtlenkowego była najsilniej hamowana (o 84%) przez inhibitor wszystkich oksydaz flawinowych – chlorek difenyleneiodonium (DPI; 100 $\mu$ M) – co odpowiada 16% wartości wyjściowej (Rycina 12). Apocynina, swoisty inhibitor oksydazy NAD(P)H (APO; 500 $\mu$ M), powodowała redukcję do 51,1% produkcji podstawowej anionu. Zahamowanie cyklooksygenaz przy pomocy indometacyny (INDO; 10 $\mu$ M) powodowało umiarkowane, lecz znamienne statystycznie zahamowanie produkcji  $O_2^{\cdot-}$  o 37,7% (Rycina 13).

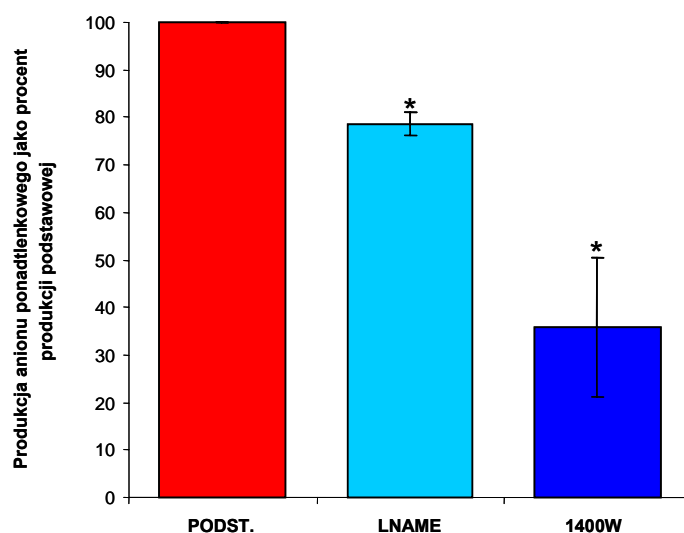


Rycina 13. Źródła enzymatyczne anionu ponadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej. (\*- $p < 0,001$  vs. podstawowa; \*\* $p < 0,04$  vs. podstawowa).

Pozostałe inhibitory nie powodowały znaczącego hamowania podstawowej produkcji anionorodnika nadtlenkowego. Allopurinol (ALLOP, 100 $\mu$ M) powodował zmniejszenie produkcji o 19,8%, natomiast rotenon (ROT, 100 $\mu$ M) o 14,8%.

### V.5.2. Syntaza tlenu azotu

W celu określenia roli syntazy tlenu azotu (NOS) w produkcji anionu nadtlenkowego wykonano pomiary po preinkubacji z nieselektywnym inhibitorem NOS (ester metylowy L-NG-nitroargininy – L-NAME; 100  $\mu$ M),



Rycina 14. Rola syntazy tlenu azotu w produkcji anionu nadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej (\*- $p < 0,01$  vs. podstawowa).

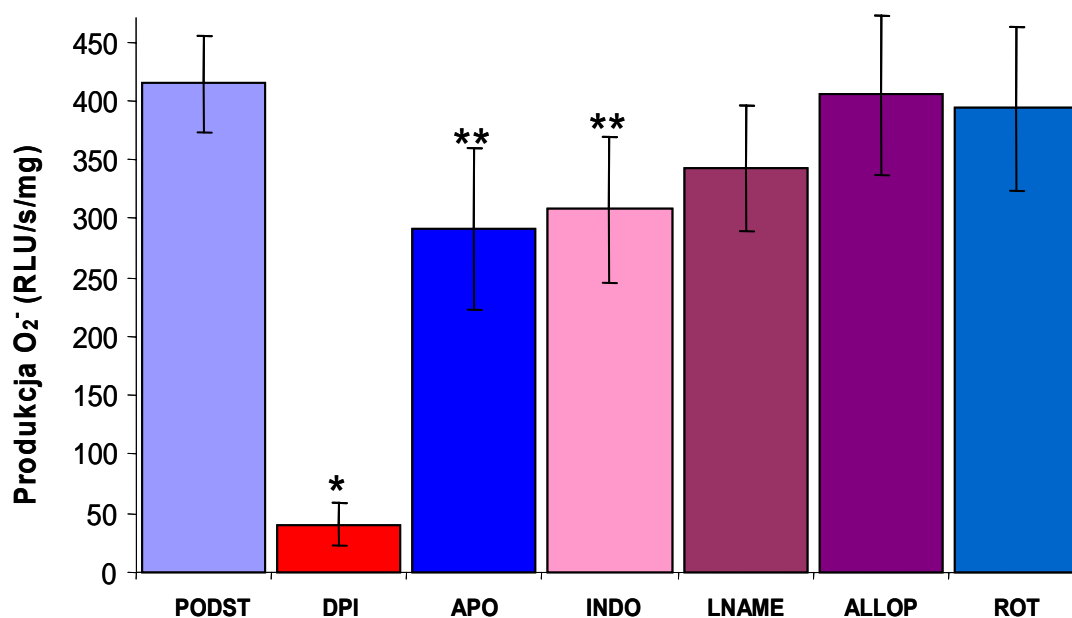
oraz po preinkubacji z nieodwracalnym, wysoce selektywnym inhibitorem indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) – (benzylo-acetamidyno-N-(3-aminomethyl – 1400W; 100 $\mu$ M).

Zarówno L-NAME, jak i 1400W powodowały zahamowanie produkcji anionorodnika nadtlenkowego. Efekt ten był mniej znaczący w odniesieniu do L-NAME (19,8 $\pm$ 4,8 RLU/s/mg sm do 16,8 $\pm$ 3,0 RLU/s/mg sm; spadek produkcji o 21,3%  $p < 0,01$ ; Rycina 14). W przypadku 1400W

obserwowano znaczne hamowanie produkcji anionu ponadtlenkowego – 64,2% (vs. Post. –  $p < 0,01$ ) względem pomiaru podstawowego (spadek z  $11,2 \pm 6,0$  RLU/s/mg sm do  $4,2 \pm 2,4$  RLU/s/mg sm).

### V.5.3. Stymulacja przy pomocy NADPH

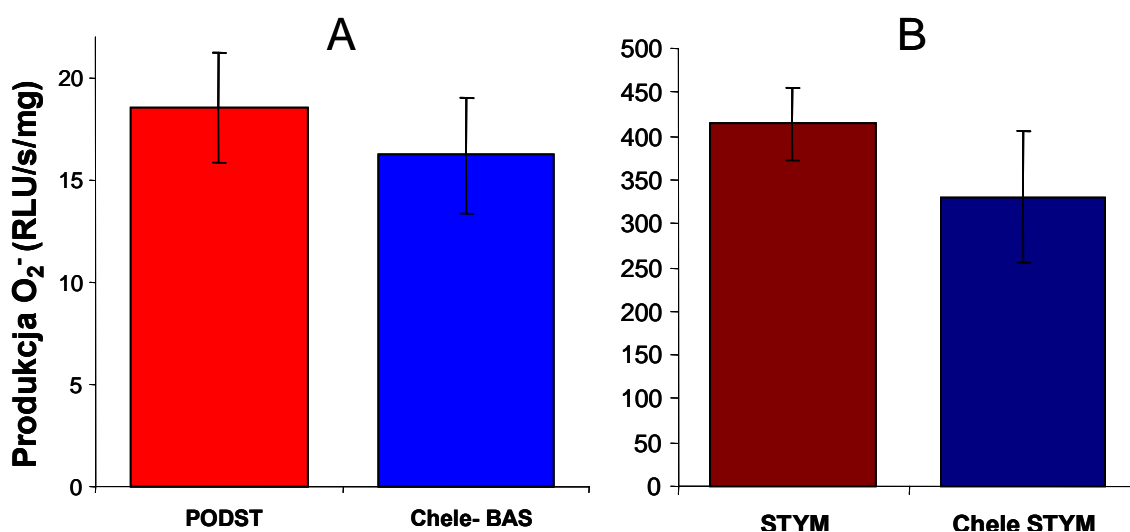
Oksydaza NAD(P)H odgrywa istotną rolę w produkcji  $O_2^{\cdot-}$ . W AAA zastosowano stymulację z użyciem jej swoistego substratu – NADPH ( $100\mu M$ ). Zaobserwowano, że stymulacja ta powodowała średnio 19-krotny wzrost produkcji anionu ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) względem produkcji podstawowej. Zaobserwowano hamowanie stymulowanej przez NADPH produkcji  $O_2^{\cdot-}$  przez inhibitory oksydaz NAD(P)H – difenyleiodonium (DPI) – oraz apocyninę, a także przez indometacynę. Pozostałe inhibitory (w tym L-NAME) nie wpływały znamienne na stymulowaną NADPH produkcję  $O_2^{\cdot-}$  (Rycina 15).



Rycina 15. Wpływ poszczególnych inhibitorów na produkcję anionu ponadtlenkowego po stymulacji NADPH (\* $p < 0,001$ ; \*\* $p = 0,01$ ; \*\*\* $p = 0,02$  vs. podstawowa).

#### V.5.4. Rola kinazy białkowej C w regulacji produkcji anionu ponadtlenkowego

Kinaza białkowa C (PKC) stanowi jeden z mechanizmów aktywacji oksydazy NAD(P)H w neutrofilach. Aby ocenić rolę kinazy białkowej C w aktywacji oksydazy NAD(P)H w tkankach AAA, wykonano doświadczenia

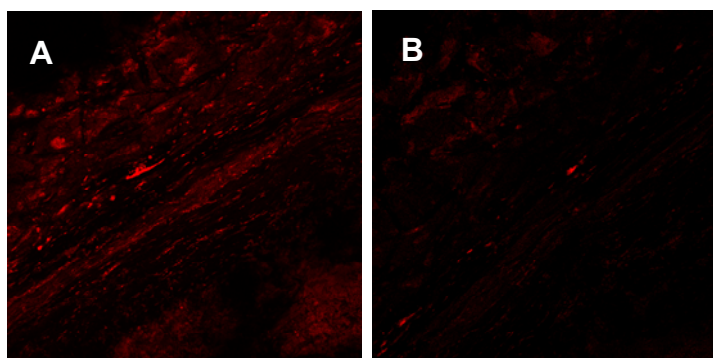


Rycina 16. Wpływ chelerytryny na produkcję anionu ponadtlenkowego w stanie podstawowym (A) oraz po stymulacji NADPH (B).

z inhibitorem PKC chelerytryną (Chele;  $1\mu\text{M}$ ). W przypadku podstawowej produkcji  $O_2^-$  chelerytryna powodowała jedynie nieznamiennej redukcję o 11,1%. Stymulowana produkcja była nieznacznie bardziej hamowana – redukcja produkcji o 22,9%, choć nie osiągała ona znamienności statystycznej (Rycina 16).

## V.6. Histochemiczna lokalizacja anionu ponadtlenkowego

Dla oceny lokalizacji produkcji anionorodnika ponadtlenkowego wykorzystano barwienie histochemiczne, z zastosowaniem bromku dihydroetydyny (DHE). Inkubacja z PEG-SOD (500U/ml) w trakcie barwienia, podobnie jak w przypadku chemiluminescencji, powodowała znaczne hamowanie intensywności barwienia fluorescencyjnego (Rycina 17).



**Rycina 17. Histochemiczne barwienie (DHE) przedstawia produkcję anionu ponadtlenkowego in situ w ścianie aorty brzusznej poszerzonej tętniakowato (A) oraz po preinkubacji z 500U/ml PEG-SOD (B).**

Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego ma charakter rozlany w ścianie tętniaka aorty brzusznej. Istotnym miejscem produkcji anionu ponadtlenkowego w ścianie aorty poszerzonej tętniakowato są komórki zapalne naciekające błony środkową, wewnętrzną, a także przydanek. Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego jest jednak widoczna także w komórkach mięśniówki gładkiej w medii, a także w przydanie.

## V.7. Znaczenie parametrów klinicznych w produkcji anionu nadadtlenkowego

### V.7.1. Wpływ czynników ryzyka na produkcję $O_2^-$ w ścianie AAA

W analizie statystycznej uwzględniono czynniki ryzyka związane z występowaniem tętniaków aorty brzusznej, które przedstawiono we wstępie. Czynniki, takie jak płeć męska oraz występowanie nadciśnienia tętniczego, wiązały się ze zwiększoną produkcją wolnych rodników tlenowych. Efekty te nie są jednak znamienne statystycznie, w przeciwieństwie do takich czynników, jak palenie tytoniu, zaburzenia gospodarki lipidowej, występowanie choroby niedokrwiennej serca, które znamienne wiązały się ze zwiększoną produkcją anionu nadadtlenkowego w tkankach tętniaka (Tabela 9).

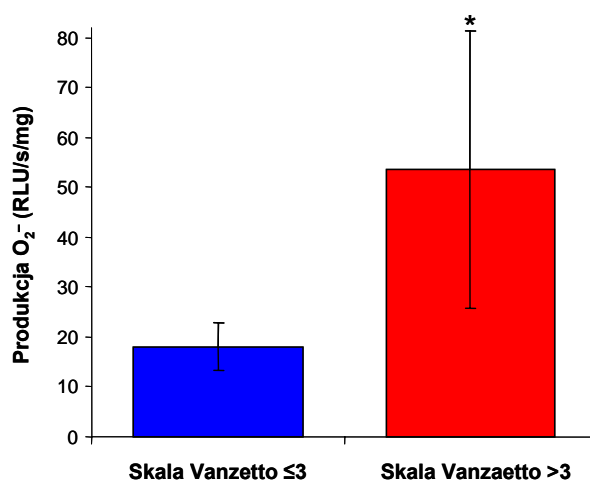
Tabela 9. Rozkład wartości chemiluminescencji (RLU/s/mg sm) z uwzględnieniem niektórych czynników ryzyka.

Czynniki ryzyka	TAK	NIE	p
Płeć męska	8,44 ± 2,55	29,82 ± 14,16	0,22
Nadciśnienie	31,55 ± 12,73	22,56 ± 10,2	0,45
Palenie papierosów	37,08 ± 13,89	13,38 ± 2,75	0,03
Zaburzenia gosp. lipid.	40,36 ± 16,23	13,89 ± 3,28	0,013
Choroba niedokrwien serca	41,79 ± 15,91	14,05 ± 4,71	0,037
Zmiany ST-T	38,84 ± 6,6	18,64 ± 18,54	0,07

Występowanie pozostałych czynników – takich jak cukrzyca, rodzinne występowanie tętniaka, miażdżycy uogólniona, występowanie zmian ST-T w zapisie EKG, choroby zapalne, uwarunkowanie genetyczne oraz choroby układowe tkanki łącznej – wiązało się z niewielkim wzrostem wartości chemiluminescencji, który nie osiągał znamienności statystycznej.

### V.7.2. Skala Vanzetto

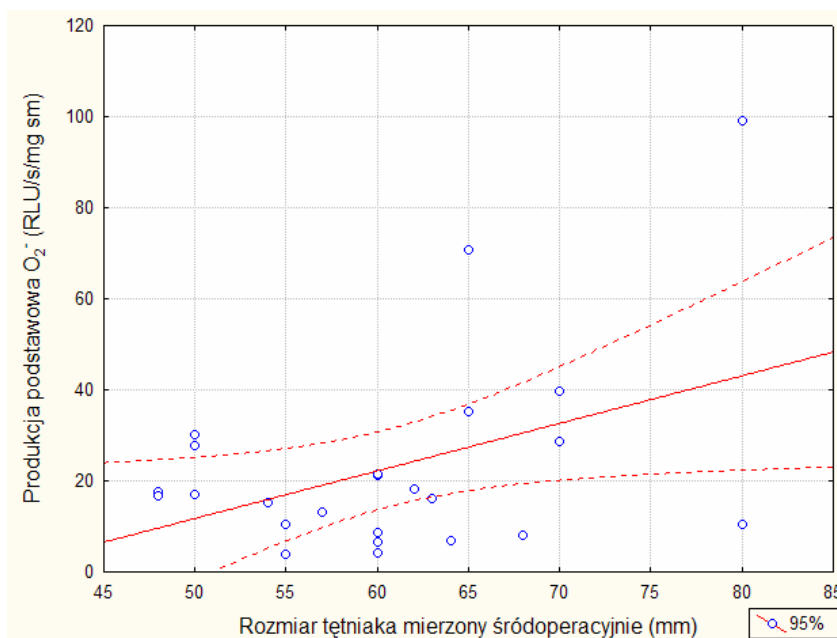
W analizie statystycznej uwzględniono także skalę Vanzetto, opisaną szczegółowo we wstępie. Jako wartość odcięcia ustalono 3 punkty. U osób, które uzyskały >3 punkty w skali Vanzetto, obserwowano większą produkcję anionu nadtlenkowego niż w grupie, która miała  $\leq 3$  punktów. Grupy podobne pod względem liczebności (19 vs. 21 osób). Różnica ta była znamienna statystycznie ( $p=0,007$ , Rycina 18).



Rycina 18. Produkcja anionu nadtlenkowego w zależności od punktacji w skali Vanzetto; (18,1 RLU/s/mg vs. 53,7RLU/s/mg;  $p=0,007$ ).

## V.8. Wielkość tętniaka a produkcja anionu ponadtlenkowego

Rozmiar tętniaka – średnica w miejscu największego poszerzenia – ma istotne znaczenie w ocenie ryzyka oraz podczas podejmowania decyzji co do dalszej strategii leczenia. Analizowano związki pomiędzy wielkością tętniaka (wartość mierzona śródoperacyjnie) a produkcją podstawową anionu ponadtlenkowego oraz po stymulacji oksydaz naczyniowych NADPH.

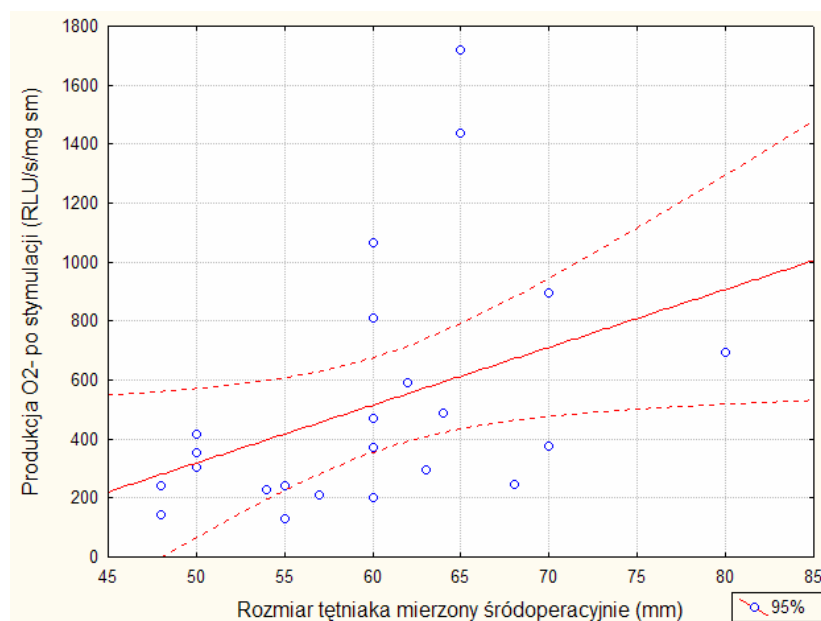


Rycina 19. Korelacja pomiędzy produkcją podstawową a rozmiarem tętniaka.

Zauważono znamiennej, pozytywnej korelację pomiędzy podstawową produkcją anionu ponadtlenkowego w zależności od rozmiaru tętniaka (Rycina 19;  $r=0,425$ ;  $p=0,038$ ).

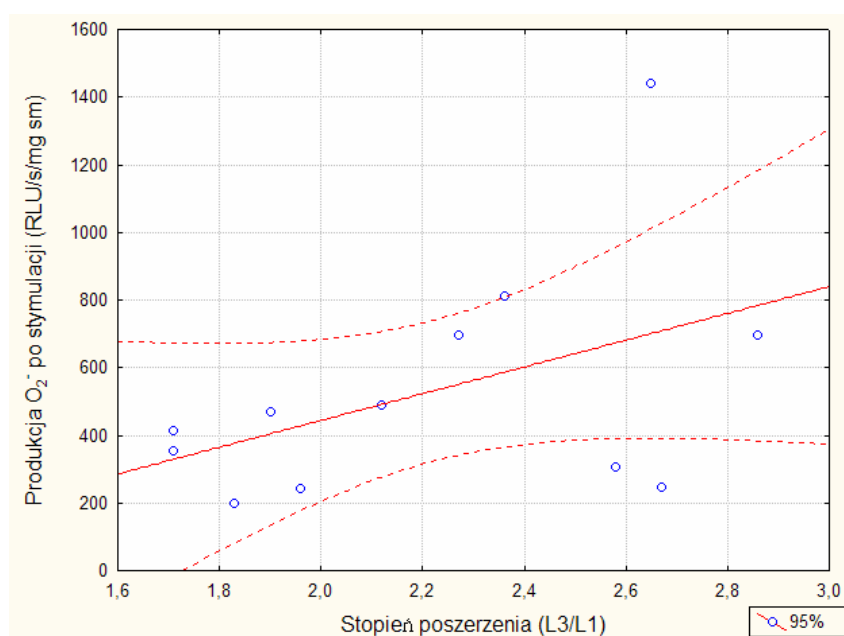
Podobnie znamiennej, dodatnia korelacja występowała pomiędzy produkcją anionu ponadtlenkowego po stymulacji NADPH (100uM) a rozmiarem tętniaka (Rycina 20;  $p=0,038$ ;  $r=0,426$ ).





**Rycina 20. Korelacja pomiędzy stymulowaną produkcją anionu ponadtlenkowego a rozmiarem tętniaka.**

Zauważono także zależność pomiędzy produkcją anionu ponadtlenkowego w stanie wzbudzenia po stymulacji NADPH a stopniem poszerzenia (stosunkiem maksymalnego poszerzenia do szerokości w zdrowym odcinku) ( $r=0,5$ ,  $p<0,02$ ; Rycina 21)



**Rycina 21. Korelacja pomiędzy stymulowaną produkcją anionu ponadtlenkowego a stopniem poszerzenia (stosunek L3/L4).**

Powyższe analizy wykazały pozytywną zależność pomiędzy rozmiarem tętniaka a produkcją anionu nadtlenkowego. Przydatnym parametrem okazał się parametr, jakim jest stopień poszerzenia, który wykazywał najsilniejszą korelację z produkcją anionu nadtlenkowego.

## V.9. Podsumowanie wyników

1. Pacjenci operowani z powodu tętniaka aorty brzusznej mieli 1,6-krotnie wyższy poziom markera ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego (MDA). Wartości MDA nie korelowały jednak z lokalną produkcją anionu nadtlenkowego w ścianie aorty poszerzonej tętniakowato, wskazując na bardziej złożony mechanizm ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego.
2. Produkcja wolnych rodników w miejscu maksymalnego poszerzenia tętniaka aorty była 1,8-krotnie większa względem fragmentu nieposzerzonego. Swoistość pomiarów dla anionu nadtlenkowego potwierdzono doświadczeniami z dysmutazą nadtlenkową oraz TIRON-em.
3. Głównym miejscem produkcji anionu nadtlenkowego w ścianie aorty poszerzonej tętniakowato są przede wszystkim naciekające komórki zapalne, a także komórki błony środkowej i przydanki.
4. Głównymi źródłami produkcji anionu nadtlenkowego są indukowalna syntaza tlenku azotu oraz oksydaza NAD(P)H, zaś dodatkową rolę odgrywa metabolizm kwasu arachidonowego w szlaku cyklooksygenazowym. Niewielką rolę odgrywają natomiast oksydaza ksantynowa czy oksydazy mitochondrialne.

5. W przeciwieństwie do innych ludzkich naczyń krwionośnych, w obrębie tętniaków aorty brzusznej kinaza białkowa C nie wydaje się odgrywać istotnej roli w regulacji produkcji anionu nadtlenkowego.
  
6. Produkcja anionu nadtlenkowego była znamienne większa u chorych palących tytoń, pacjentów z zaburzeniami gospodarki lipidowej oraz z chorobą niedokrwienną serca. Produkcja anionu nadtlenkowego była podwyższona u mężczyzn oraz u chorych z nadciśnieniem tętniczym (różnica ta nie osiągała jednak znamienności statystycznej).
  
7. Zarówno podstawowa produkcja anionu nadtlenkowego jak i maksymalna aktywność oksydazy NAD(P)H były znamienne skorelowane z rozmiarem tętniaka oraz ze stopniem poszerzenia tętniaka.

## VI. Dyskusja

### VI.1. Poziom stresu oksydacyjnego u pacjentów z tętniakami aorty brzusznej

Powstawanie tętniaków aorty brzusznej przebiega z udziałem procesu zapalnego z mechanizmami proteolitycznymi. Rozwijają się one na podłożu urazu biomechanicznego oraz zaburzeń genetycznych [23, 45]. We wszystkich tych procesach mogą brać udział wolne rodniki tlenowe, które uczestniczą w regulacji i propagacji procesów zapalnych, a także powodują zmiany ogólnoustrojowe związane ze stresem oksydacyjnym.

Wykazano, iż ważną rolę w inicjacji i progresji procesów zapalnych w ścianie naczynia odgrywa dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, która jest w znacznym stopniu wywoływana nadprodukcją anionu nadadtlenkowego ( $O_2^-$ ) [53, 63]. Z jednej strony anion nadadtlenkowy może uczestniczyć w procesie powstawania tętniaka przez wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych oraz cytokin [146], aktywację prozapalnych genów [77, 125, 128, 132, 146], zwiększanie produkcji oraz aktywację metaloproteinaz tkankowych [24, 45, 78, 97, 100, 104, 132]. A z drugiej – podwyższony poziom anionu nadadtlenkowego w ścianie aorty brzusznej może wiązać się z systemowymi zmianami w osoczu, prowadzącymi między innymi do peroksydacji lipidów i nasilania się zmian miażdżycowych i zapalnych, tak istotnych w patogenezie tętniaków aorty [125].

Przeprowadzone w obecnej pracy doświadczenia z wykorzystaniem oznaczenia malonylo dialdehydu (MDA), jako pośredniego markera ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego, wykazały, iż pacjenci operowani z powodu tętniaka aorty brzusznej, w porównaniu z pacjentami bez tętniaka, mają podwyższony poziom stresu oksydacyjnego. Wyniki te są zgodne z

obserwacjami opisanymi w literaturze, dokonywanymi dotychczas w modelach zwierzęcych i *in vitro*. Sigala i wsp. w eksperymentalnych tętniakach u szczurów Wistar zaobserwowali podwyższone poziomy MDA w osoczu [140] w porównaniu ze szczurami, które nie miały poszerzonej aorty. Podobne wyniki uzyskał Miller. Jednak on mierzył poziom stresu oksydacyjnego lokalnie w obrębie homogenatów tkankowych, a nie jak w prezentowanej pracy – w osoczu [77].

Co ciekawe, wbrew oczekiwaniom nie wykazano znamiennej korelacji pomiędzy poziomem stresu oksydacyjnego w osoczu krwi a produkcją anionu ponadtlenkowego w ścianie poszerzonej aorty. W literaturze nie znaleziono porównania produkcji anionu ponadtlenkowego z parametrami stresu oksydacyjnego w osoczu. Obserwacja ta może jednak wskazywać, iż ogólnoustrojowy stres oksydacyjny, którego wykładnikiem jest MDA ma znacznie więcej komponent niż tylko lokalna produkcja anionu ponadtlenkowego w obrębie tętniaka. Podwyższone poziomy MDA w osoczu mogą być wyrazem bardziej zaawansowanych procesów dysfunkcji śródbłonna oraz uogólnionego stanu zapalnego lub też ogólnoustrojowej dysfunkcji układów antyoksydacyjnych u chorych z tętniakami aorty brzusznej, zachodzących pomimo podobnego profilu podstawowych czynników ryzyka miażdżycy [76, 181].

Z obserwacji tej może również wynikać istotny wniosek kliniczny, iż na podstawie pomiarów parametrów ogólnoustrojowych w osoczu chorych niezmiernie trudno jest scharakteryzować zjawiska zachodzące lokalnie w ścianie naczyń krwionośnych. Dlatego też w dalszej części pracy skoncentrowano się na analizach zjawisk zachodzących w obrębie zmienionej tętniakowato aorty.

## VI.2. Produkcja anionu nadtlenkowego w ścianie aorty brzusznej

Anion nadtlenkowy może uczestniczyć we wszystkich opisywanych we wstępie procesach formowania tętniaka. Jak wspomniano, odgrywa kluczową rolę we wszystkich etapach procesu zapalnego [62, 77, 121, 122]. Rzeczywiście, w literaturze opisywano rolę produkcji anionu nadtlenkowego zarówno w samoistnych AAA, jak i w eksperymentalnych modelach AAA [62, 77, 121, 122], jednak większość prac dotychczas prowadzonych dotyczyła modeli zwierzęcych oraz doświadczeń *in vitro*.

Anion nadtlenkowy, przez wywołanie dysfunkcji śródbłonna, prowadzi do zwiększenia ekspresji cząstek adhezyjnych, takich jak ICAM-1 czy interleukiny- $\alpha$ L [19, 68, 129]. Ułatwia to migrację komórek zapalnych (makrofagi, monocyty oraz limfocyty) do ściany aorty [19, 22, 182], które same mogą stawać się źródłem anionu nadtlenkowego. Stres oksydacyjny może powodować zwiększenie produkcji cytokin w komórkach zapalnych [121].

Stres oksydacyjny może także odgrywać pewną rolę w regulacji procesu proteolizy w ścianie aorty, zarówno przez zwiększenie ekspresji genów dla tych enzymów, jak i ich aktywowanie. Zwiększona ekspresja genów dla MMP-9, MMP-12, MMP-8 oraz dla kolagenazy została opisana w literaturze [121].

W procesie formowania tętniaka odgrywa także rolę proces apoptozy, który może być indukowany przez stres oksydacyjny [77, 133].

W przeprowadzonych badaniach zauważono, że produkcja anionu nadtlenkowego była znamienne większa w miejscu maksymalnego poszerzenia względem miejsca nieposzerzonego. Specyficzność oznaczenia dla anionu nadtlenkowego potwierdziły doświadczenia ze swoistymi wymiataczami anionu nadtlenkowego (SOD, TIRON). Uzyskane wyniki

były zgodne z doniesieniami w literaturze [77, 121]. Miller i wsp. poczynili podobne obserwacje do przedstawianych w powyższej pracy, iż produkcja anionu nadadtlenkowego, oznaczana chemiluminescencją zależną od lucygeniny, jest większa w obrębie tętniaków aorty niż w obrębie naczynia niezmiennego [77]. Yajima i wsp. w swoim doniesieniu zauważają zwiększoną ekspresję genów dla oksydaz, w tym indukowalnej syntazy tlenku azotu w obrębie zmian tętniakowatych. Autorzy ci zauważyli także obniżenie ekspresji antyoksydacyjnych genów dla SOD, reduktazy NAD Cyt-b-5,S-transferazy glutationowej [121].

### **VI.3. Enzymatyczne źródła produkcji anionu nadadtlenkowego**

Szczegółowa analiza enzymatycznych źródeł anionorodnika nadadtlenkowego nie była dotychczas przeprowadzona. Autorzy z góry zakładali kluczową rolę oksydazy NAD(P)H w produkcji  $O_2^{\cdot-}$  i koncentrowali się przede wszystkim na tym enzymie [77]. W prezentowanej pracy po raz pierwszy w przeprowadzonych badaniach z udziałem inhibitorów potencjalnych oksydaz naczyniowych wykazano, iż głównym źródłem produkcji podstawowej anionu nadadtlenkowego są indukowana syntaza tlenku azotu oraz oksydaza NAD(P)H. Hamowanie stymulowanej przez NADPH produkcji  $O_2^{\cdot-}$  przez indometacynę wskazuje na rolę metabolizmu cyklooksygenazy oraz metabolizmu kwasu arachidynowego w regulacji aktywności oksydazy NAD(P)H w AAA.

Rola oksydazy ksantynowej oraz oksydaz mitochondrialnych jest marginalna.

Jak dotąd istnieją dwie publikacje opisujące możliwą rolę iNOS w etiopatogenezie tętniaków aorty brzusznej. Zhang i wps. w 2003 roku wykazali zwiększoną ekspresję mRNA dla iNOS w ludzkich tętniakach w porównaniu z grupą kontrolną (bez tętniaków) [122]. Sigala i wsp. opisują



wykorzystanie selektywnego inhibitora iNOS (1400W) w celu ustalenia roli iNOS w apoptozie oraz zwiększeniu markerów proliferacji. Grupy szczurów, otrzymujące 1400W, wykazywały znamienne mniejsze poziomy ekspresji iNOS (wartości porównywalne do grupy kontrolnej) oraz znamienne mniejsze parametry wzrostu komórek [140].

Rolę oksydazy NAD(P)H w remodelingu AAA opisywali Miller i wsp. [77]. Zauważyli oni zwiększoną ekspresję podjednostek p22phox oraz p47phox we fragmencie poszerzonym tętniakowato (*versus* we fragmencie nieposzerzonej aorty).

Po aktywacji oksydazy NAD(P)H substratami (NADH i NADPH) uzyskano znamienne większą produkcję anionu nadadtlenkowego w ścianie tętniaka. Uzyskane wyniki potwierdzają dane przedstawione przez Millera i wsp. [77]. Badania przeprowadzone na innych niż aorta naczyniach ludzkich wykazały również zwiększoną produkcję anionu nadadtlenkowego po stymulacji substratem [67].

#### **VI.4. Histologiczna lokalizacja produkcji anionu nadadtlenkowego**

W doświadczeniu z wykorzystaniem barwienia dihydroetydyną (DHE), stwierdzono, iż głównym miejscem produkcji anionu nadadtlenkowego są przede wszystkim komórki zapalne, które naciekają wszystkie warstwy ściany tętniaka, a także komórki w obrębie medii oraz przydanki. Zwraca uwagę bardziej rozlany charakter barwienia niż w innych, nie zmienionych tętniakowato, naczyniach ludzkich (dane nie pokazane). Podobny obraz AAA w barwieniu DHE przedstawił Miller w swojej publikacji [77]. W innych naczyniach ludzkich, bez poszerzenia tętniakowatego, produkcja anionu nadadtlenkowego jest zlokalizowana głównie w błonie środkowej, ale także w pozostałych warstwach [174], ma

ona jednak charakter znacznie bardziej zlokalizowany i dużo wyraźniej udaje się określić źródła komórkowe. Bardziej rozlany i mniej wyrazisty charakter barwienia DHE obserwowany w prezentowanej pracy – można wyjaśnić faktem produkcji przez rozsiane komórki zapalne. Bardzo ciekawym problem w związku z tym staje się określenie głównych enzymatycznych źródeł anionorodnika ponadtlenkowego w badanych naczyniach poszerzonych tętniakowato.

## **VI.5. Wpływ parametrów klinicznych na produkcję anionu ponadtlenkowego**

Jako najważniejsze czynniki ryzyka w rozwoju tętniaka aorty brzusznej uznaje się: nikotynizm, POChP, nadciśnienie tętnicze, wiek (>55r.ż.), płeć męską oraz hypercholesterolemię [31, 33, 35, 37, 50, 51]. Czynniki te odgrywają rolę zarówno w procesie powstawania tętniaka, jak i przyspieszają jego rozwój. Palenie 20–34 paczkolet oraz >50 paczkolet dawało odpowiednio 7,31-krotnie częstsze i 9,55-krotnie częstsze występowanie choroby [31, 37]. Podwyższone ciśnienie tętnicze krwi odgrywa kluczową rolę w przyspieszeniu procesu miażdżycowego [17, 28, 53]. W badaniach Wanhainena wykazano częstsze występowanie podwyższonych wartości całkowitego cholesterolu, trójglicerydów oraz LDL u pacjentów z tętniakami w porównaniu z grupą kontrolną [31]. Blanchard i wsp. natomiast w swoich badaniach nie zauważyli takiej korelacji [46].

W przeprowadzonej analizie porównywano produkcję anionu ponadtlenkowego w obrębie maksymalnego poszerzenia tętniakowatego z czynnikami ryzyka wystąpienia tętniaka aorty brzusznej wraz z czynnikami ryzyka miażdżycy. Produkcja anionu ponadtlenkowego była większa u chorych z takimi czynnikami ryzyka, jak palenie tytoniu, hyperlipidemia oraz występowanie choroby niedokrwiennej serca. Zauważono również

nieznacznie większą produkcję  $O_2^-$  u osób płci męskiej oraz u osób z nadciśnieniem tętniczym. W literaturze brak jest jak dotąd doniesień analizujących produkcję anionu nadadtlenkowego w połączeniu z obrazem klinicznym

## **VI.6. Znaczenie rozmiaru tętniaka**

Jednym z najważniejszych czynników decydujących o wyborze sposobu leczenia jest rozmiar tętniaka [37, 38, 40]. Wraz ze wzrostem rozmiaru tętniaka zwiększa się także ryzyko wystąpienia powikłań, przede wszystkim pęknięcia ściany [7, 37, 38, 41]. Dla tętniaków, dla których ten rozmiar wynosi 4–5 cm ryzyko pęknięcia wynosi 1–3%, dla większych tętniaków (5–7 cm) ryzyko wynosi 6–11%. Natomiast dla największych (>7 cm) tętniaków 20% [5, 6, 35]. Tętniaki o rozmiarze poniżej 4 cm obarczone są najmniejszym ryzykiem pęknięcia [37, 38, 47].

Większe tempo poszerzania się tętniaka zauważono u chorych z nadciśnieniem tętniczym, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc oraz z obecną skrzepliną w świetle naczynia [6, 35, 47].

Nie jest obecnie wiadomo, czy produkcja anionu nadadtlenkowego w obrębie ściany tętniaka jest w rzeczywistości powiązana z tym tak istotnym klinicznie parametrem. W literaturze brak jest doniesień, w których by dokonano takiego porównania. Dlatego też bardzo ważną obserwacją jaką uzyskano w toku prezentowanej pracy jest fakt, iż produkcja anionu nadadtlenkowego dodatnio korelowała z rozmiarem tętniaka – większa produkcja anionu nadadtlenkowego była obserwowana u pacjentów z większymi tętniakami aorty brzusznej.

W grupie z AAA zauważono też dodatnią korelację pomiędzy produkcją anionu nadadtlenkowego, po pobudzeniu przez NADPH, a stopniem poszerzenia. Parametr ten okazał się wykazywać najsilniejszy

stopień korelacji spośród wszystkich parametrów opisujących rozmiar tętniaka. W literaturze brak jest doniesień omawiających stosowanie tego parametru.

Podczas gdy związki pomiędzy produkcją anionorodnika ponadtlenkowego a rozmiarem tętniaka nie były jak dotąd w literaturze analizowane, stwierdzono znamienne korelacje pomiędzy ekspresją [39], aktywnością [103], metaloproteinaz oraz ich stężeniem osoczym [39, 98, 101, 103]. Wykazano, iż ekspresja, aktywność enzymatyczna oraz stężenie osocze metaloproteinazy 9 korelują dodatnio z rozmiarem tętniaka aorty brzusznej. Korelacja pomiędzy rozmiarem tętniaka a produkcją anionu ponadtlenkowego może wskazywać na rolę wolnych rodników tlenowych w omawianych procesach patogenetycznych tętniaków aorty brzusznej.

## VII. Wnioski

1. Pacjenci z tętniakiem aorty brzusznej mają znamienne większe wartości parametrów ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego w porównaniu z chorymi bez tętniaków aorty brzusznej.
2. Produkcja anionu nadtlenkowego w ścianie aorty brzusznej była zwiększona w miejscu maksymalnego jej poszerzenia względem miejsca nieposzerzonego.
3. Podstawowymi źródłami produkcji anionu nadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej są indukowalna syntaza tlenu azotu oraz oksydaza NAD(P)H.
4. Produkcja anionu nadtlenkowego w obrębie zmiany tętniakowatej była skorelowana z paleniem tytoniu, z zaburzeniami gospodarki lipidowej, z chorobą niedokrwienną serca, płcią oraz nadciśnieniem tętniczym.
5. Produkcja anionu nadtlenkowego dodatkowo korelowała z rozmiarem tętniaka: im większy tętniak aorty brzusznej, tym większa była produkcja anionu nadtlenkowego.

## VIII. Streszczenie

Tętniaki aorty brzusznej (AAA) występują u ok. 3–4% osób w wieku >50r.z. Wiadomo, iż u podstaw formowania tętniaków aorty brzusznej leżą cztery główne procesy: proces zapalny, proteolityczna degradacja elementów tkanki łącznej, mechaniczny uraz ściany aorty oraz zaburzenia genetyczne. Obecność wolnych rodników tlenowych w powyższych procesach opisano w literaturze. Mechanizmy prowadzące do powstania AAA, szczególnie rola wolnych rodników tlenowych w powyższych procesach nie są obecnie poznane.

Wstępne badania eksperymentalne na zwierzętach wykazały zwiększoną produkcję wolnych rodników tlenowych w ścianie tętniaka w porównaniu do prawidłowej części naczynia. Dotychczas tylko jedno badanie analizowało produkcję wolnych rodników tlenowych, a w szczególności anionu nadadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) w tętniakach aorty u człowieka. Źródła, a także znaczenie kliniczne nadprodukcji anionu nadadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej nie są do tej pory poznane. Celem powyższej pracy jest: porównanie ogólnoustrojowych parametrów stresu oksydacyjnego w grupie pacjentów z AAA oraz u chorych bez AAA. Ocena jakościowa i ilościowa produkcji anionu nadadtlenkowego w AAA. Zbadanie źródeł enzymatycznych oraz podstawowych mechanizmów regulujących produkcję anionu nadadtlenkowego w AAA. Określenie związku produkcji anionu nadadtlenkowego z cechami klinicznymi AAA, w szczególności z rozmiarem tętniaka.

Badaniem objętych zostało 40 chorych, poddanych resekcji AAA oraz 16 chorych bez AAA, z takimi samymi czynnikami ryzyka jak pacjenci z AAA. Poziom ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego oceniany był z wykorzystaniem oznaczenia MDA w osoczu. Produkcja  $O_2^{\cdot-}$  była oceniana z

wykorzystaniem chemiluminescencji zależnej od lucygeniny. Specyficzność pomiaru dla  $O_2^{\cdot -}$  była potwierdzana przy pomocy wymiataczy wolnych rodników – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz jej mimetyku Tiron-u. Enzymatyczne źródła produkcji były określane w eksperymentach z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów dla szeregu potencjalnych oksydaz tkankowych. Poza określeniem źródeł enzymatycznych badano także mechanizmy ich aktywacji – np. rola kinazy białkowej C (PKC) była oceniana z wykorzystaniem jej inhibitora chelerytryny. Lokalizacja produkcji  $O_2^{\cdot -}$  w ścianie AAA była oceniana przy pomocy histochemicznego barwienia z zastosowaniem dihydroetydyny. Ocena ryzyka klinicznego związanego z obecnością AAA była oceniana przy pomocy skali Vanzetto. Śródoperacyjnie wykonywano dokładny pomiar rozmiaru tętniaka aorty brzusznej.

Poziom MDA był znacząco większy u chorych z AAA ( $4,87\mu\text{M}$  vs.  $3,02\mu\text{M}$ ;  $p<0,02$ ). Nie wykazano jednak korelacji pomiędzy wartościami MDA a poziomem produkcji wolnych rodników w ścianie aorty.

Produkcja wolnych rodników tlenowych była większa w miejscu poszerzonym tętniakowato w porównaniu z aortą nieposzerzoną ( $23,1\text{RLU/s/mg}$  vs.  $12,9\text{RLU/s/mg}$ ;  $p<0,001$ ).  $O_2^{\cdot -}$  był znacząco wymiatany przez SOD oraz Tiron (SOD – spadek chemiluminescencji o 65%,  $p<0,001$  oraz Tiron – spadek o 54%,  $p<0,001$ ). Inhibitor oksydaz flawinowych (DPI) powodował zmniejszenie produkcji  $O_2^{\cdot -}$  o 84%. Co ciekawe, 1400W, swoisty inhibitor iNOS powodował zahamowanie produkcji  $O_2^{\cdot -}$  o 64,2% ( $p<0,01$ ). Apocynina, swoisty inhibitor oksydazy NAD(P)H zmniejszyła produkcję  $O_2^{\cdot -}$  do 51,1% ( $p<0,01$ ). Zahamowanie cyklooksygenaz przy pomocy indometacyny powodowało umiarkowane, lecz statystycznie zahamowanie produkcji  $O_2^{\cdot -}$  o 37,7% ( $p<0,04$ ). Allopurinol, inhibitor oksydazy ksantynowej, powodował zmniejszenie produkcji o 19,8% ( $p=\text{NS}$ ), natomiast rotenon, inhibitor oksydaz mitochondrialnych, o 14,8% ( $p=\text{NS}$ ).

W przeciwieństwie do klasycznych naczyń obwodowych człowieka, w których kinaza białkowa C odgrywa kluczową rolę w mediowaniu stresu oksydacyjnego, chelerytryna, inhibitor PKC, powodowała jedynie nieznamiennej redukcję produkcji  $O_2^{\cdot-}$  - o 11,1%. Stymulowana przez NADPH produkcja  $O_2^{\cdot-}$  była nieznacznie bardziej hamowana – redukcja o 22,9%, choć nie osiągała ona znamienności statystycznej.

Analiza histochemiczna wykazała, iż produkcja anionorodnika ponadtlenkowego ma charakter rozlany w ścianie tętniaka aorty brzusznej. Istotnym miejscem produkcji anionu ponadtlenkowego w ścianie aorty poszerzonej tętniakowato są komórki zapalne naciekające błony – środkową, wewnętrzną, a także przydanę. Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego jest jednak widoczna także w komórkach mięśniówki gładkiej w medii, a także w przydanie.

Występowanie zaburzeń gospodarki lipidowej, choroby wieńcowej oraz palenia papierosów wiązało się ze znamienne większą produkcją  $O_2^{\cdot-}$ . Pacjenci z dużym ryzykiem operacyjnym (>3ptk. w skali Vanzetto) wykazywali większą produkcję  $O_2^{\cdot-}$  (53,7RLU/s/mg vs. 18,1 RLU/s/mg;  $p=0,007$ ).

Produkcja  $O_2^{\cdot-}$  dodatkowo korelowała z rozmiarem tętniaka ( $r=0,42$ ;  $p=0,038$ ). Szczególnie silną korelację wykazywał stopień poszerzenia (stosunek rozmiaru maksymalnego poszerzenia do szerokości w zdrowym odcinku) z produkcją  $O_2^{\cdot-}$  ( $r=0,5$ ,  $p<0,02$ ).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że pacjenci z tętniakiem aorty brzusznej wykazują cechy ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego w porównaniu z chorymi bez tętniaków aorty brzusznej. Produkcja anionu ponadtlenkowego w ścianie aorty brzusznej jest większa w miejscu maksymalnego jej poszerzenia względem aorty nieposzerzonej. W AAA głównymi źródłami produkcji anionu ponadtlenkowego są



indukowalna syntaza tlenku azotu oraz oksydaza NAD(P)H. Pacjenci z większym ryzykiem okołoperacyjnym (>3 punktów w skali Vanzetto), względem tych z niskim ryzykiem, wykazywali zwiększoną produkcję anionu ponadtlenkowego. Zwiększona produkcja anionu ponadtlenkowego w obrębie zmiany tętniakowatej korelowała z paleniem tytoniu, z zaburzeniami gospodarki lipidowej, z chorobą niedokrwioną serca, płcią męską oraz nadciśnieniem tętniczym. Stwierdzono ponadto dodatnią korelację pomiędzy produkcją anionu ponadtlenkowego a wielkością tętniaka.

Przeprowadzone badania sugerują iż stres oksydacyjny, a w szczególności produkcja anionu ponadtlenkowego przez iNOS oraz oksydazy NAD(P)H w ścianie naczynia mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie AAA, a także wykazują powiązanie z szeregiem czynników klinicznych.

### **Abstract**

Abdominal aortic aneurysms (AAA) occur in 3-4% in patients above 50 years of age. Pathogenesis of AAA is complex and appears to result from concomitant actions of inflammation, proteolytic degradation of aortic wall connective tissue, biomechanical wall stress and molecular genetic susceptibility. Reactive oxygen species (ROS) may play an important effectors and regulatory roles in each of those processes. In spite of reasonably large amount of literature on AAA, the mechanisms of their formation, and particularly role of free radicals in those processes remain unknown.

Preliminary studies in animal models, demonstrated increased production of ROS in AAA than in normal aorta. Until now, only one paper analyzed role of ROS in human AAA, especially superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ). Sources and clinical relevance of  $O_2^{\cdot-}$  in AAA were not studied up to date.

Objectives of the thesis are: (1) to compare generalized oxidative stress as well as local aortic  $O_2^{\cdot-}$  production in patients with and without AAA. (2) to find the importance of individual enzymatic sources  $O_2^{\cdot-}$  production and its major regulation in AAA. (3) to determine an association between  $O_2^{\cdot-}$  production and clinical features of AAA, particularly clinical scoring system and intraoperatively determined AAA size.

40 patients, who underwent surgical resection of AAA and 16 patients without AAA, but with the same risk factors as patients with AAA were enrolled to the study. Systemic oxidative stress was determined by measurement of MDA plasma levels.  $O_2^{\cdot-}$  production was estimated using luciferin-dependent chemiluminescence. Specificity of signal for  $O_2^{\cdot-}$  was confirmed with ROS scavengers: superoxide dismutase (SOD) and Tiron. Enzymatic sources of  $O_2^{\cdot-}$  production were investigated with the use of specific oxidase inhibitors. Role of protein kinase C in the activation of tissue oxidases was examined using its inhibitor – chelerythrin. Histochemical dihydroethidium staining was used to localize  $O_2^{\cdot-}$  production within the AAA wall. Clinical risk stratification was performed with Vanzetto scale. Precise AAA diameter measurement was done during surgery.

MDA plasma levels were significantly higher in patients with AAA (4,87 $\mu$ M vs. without AAA – 3.02  $\mu$ M;  $p < 0.02$ ). Surprisingly no correlation was found between plasma MDA levels and local  $O_2^{\cdot-}$  production in AAA wall indicating that this relationship is more complex.

ROS production was higher in aneurysmatic versus non-aneurysmatic segments of AAA wall (23.1 RLU/s/mg vs. 12.9 RLU/s/mg;  $p < 0.001$ ).  $O_2^{\cdot-}$  production was suppressed by preincubation with superoxide scavenger Tiron (54% decrease,  $p < 0.001$ ) or the superoxide dismutase (PEG-SOD – 65% decrease,  $p < 0.001$ ). Diphenyleneiodonium (DPI) which is a flavine oxidase inhibitor caused 84% decrease in  $O_2^{\cdot-}$  production. Most interestingly,  $O_2^{\cdot-}$

production was significantly inhibited by iNOS specific inhibitor - 1400W to 36% of control levels ( $p < 0,01$ ). Apocinin, NAD(P)H oxidase specific inhibitor, decreased  $O_2^{\cdot-}$  production to 51,1% of control levels ( $p < 0.01$ ). Modest inhibition (to 62% of control levels  $p < 0.04$ ) was observed when indomethacine (cyclooxygenase specific) was used. Minor effect was achieved when allopurinol (xanthine oxidase specific inhibitor) was used – production decreased to 80% of control levels ( $p = NS$ ). Similar inhibition was gained when rotenone (mitochondrial oxidase specific) was used (15% decrease to control levels,  $p = NS$ ).

In contrast to human peripheral vessels, where protein kinase C (PKC) plays an important role in the regulation of oxidative stress, chelerythrin, inhibitor of PKC caused only minor (11%) decrease in  $O_2^{\cdot-}$  production. Insignificant increase in the inhibition was observed NADPH-stimulated  $O_2^{\cdot-}$  production – 23% reduction ( $p = NS$ ).

Histochemical analysis revealed that  $O_2^{\cdot-}$  production was diffused throughout whole AAA wall. Major source of  $O_2^{\cdot-}$  production are inflammatory cells infiltrating all layers of AAA wall.  $O_2^{\cdot-}$  production is also noted in smooth muscle cells in media and adventitia.

Patients with hypercholesterolemia, coronary artery disease and smokers had increased  $O_2^{\cdot-}$  production. Patients with high preoperative risk ( $> 3$  points in Vanzetto scale) had higher  $O_2^{\cdot-}$  production (53.7 RLU/s/mg vs. 18.1 RLU/s/mg;  $p = 0.007$ ).

$O_2^{\cdot-}$  production correlated with AAA size ( $r = 0.42$ ;  $p = 0.038$ ). Particularly the dilatation index (maximal AAA diameter to healthy aorta diameter ratio) showed strongest correlation ( $r = 0.5$ ,  $p < 0.02$ ) with  $O_2^{\cdot-}$  production.

These results lead to conclusion, that patients with AAA have increased oxidative stress levels than patients without AAA.  $O_2^{\cdot-}$  production in AAA wall is higher than in dilated segments than not dilated aortic segments.

Main sources of  $O_2^-$  production in AAA are iNOS and NAD(P)H oxidase. Higher  $O_2^-$  production was observed in patients with high preoperative risk (>3 points in Vanzetto scale). Increased  $O_2^-$  production in AAA patients was observed in subjects with hypercholesterolemia, coronary artery disease, male gender and smoking. Positive correlation was found between  $O_2^-$  production and AAA size.

Presented thesis suggests that oxidative stress, especially  $O_2^-$  production by iNOS and NAD(P)H oxidase in AAA wall can play important role in AAA pathogenesis and demonstrate relationship with several clinical features of aortic abdominal aneurysms.

## IX. Spis skrótów

AAA – tętniak aorty brzusznej  
ACE – enzym konwertujący angiotensynę  
Ach – acetylocholina  
AT<sub>1</sub> – receptor dla angiotensyny – 1  
BH<sub>4</sub> – tetrahydrobiopteryna  
cAMP – cykliczny adenozymonofosforan  
cGMP – cykliczny guanozyno-5'-monofosforan  
CRP – białko C reaktywne  
DHE – dihydroetydyna  
DPI – difenyleneiodonium  
ECM – macierz zewnątrzkomórkowa  
EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący  
EDRF – śródbłonkowy czynnik naczyniorozkurczający  
eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu  
FDD – rozkurcz zależny od przepływu krwi  
FMD – rozkurcz wywołany przez przepływ krwi  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – nadtlenek wodoru  
HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości  
HOCl – kwas podchlorawy  
HPLC/MS – chromatografia cieczowa z detekcją masową  
ICAM – wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna  
IL – interleukina  
iNOS – indukowana syntaza tlenu azotu  
LDL – lipoproteina o niskiej gęstości  
L-NAME – ester metylowy L-NG-nitroargininy  
MCP – białko chemotaktyczne monocytów  
MDA – malonylo dialdehyd  
MMP – metaloproteinazy  
mRNA – informacyjne RNA  
NADH – zredukowana forma dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego  
NADPH – zredukowana forma fosforanu dwunukleotydu  
nikotynamidoadeninowego  
NFκB – czynnik transkrypcyjny κB  
nNOS – neuronalna syntaza tlenu azotu  
NO – tlenek azotu  
NOX – homolog podjednostki oksydazy NAD(P)H  
O<sub>2</sub><sup>·-</sup> – anion ponadtlenkowy  
.OH – rodnik wodorotlenowy  
ONOO<sup>·</sup> – nadtlendioazotyn  
ox-LDL – utlenione LDL

PEG-SOD - dysmutaza ponadtlenkowa sprzężona z glikolem  
polietylenowym  
PGI<sub>2</sub> – prostacyklina  
PKC – kinaza białkowa C  
POChP – przewlekła obturacyjna choroba płuc  
RLU – relatywne jednostki światła  
ROS – reaktywne formy tlenu  
SMC – komórki mięśniówki gładkiej  
SOD – dysmutaza ponadtlenkowa  
TIMP – inhibitory metaloproteinaz  
TK – tomografia komputerowa  
TNF – czynnik martwicy nowotworów  
t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu  
u-PA – urokinazowy aktywator plazminogenu  
USG – ultrasonografia  
VCAM – naczyniowa cząsteczka adhezyjna  
1400W – benzylo-acetamidyna N-(3-aminomethyl)

## X. Spis rycin

Rycina 1. Tętniak aorty brzusznej w tomografii komputerowej (A) oraz w angiografii RTG (B).	10
Rycina 2. Tętniak wrzecionowaty – przekrój przez aortę brzuszną. Strzałki wskazują przejście ściany prawidłowej w ścianę tętniaka – zmodyfikowano za Klatt i wsp. [42]	12
Rycina 3. Różnice histopatologiczne pomiędzy wycinkiem aorty prawidłowej (A – zmodyfikowano za Bergman [43]) oraz zmienionej tętniakowato (B – zmodyfikowano za Klatt [42]).	13
Rycina 4. Proponowany model formowania tętniaka aorty brzusznej. Zmodyfikowano za Wulf Palinski [85, 86].	18
Rycina 5. Znaczenie eNOS oraz iNOS w ludzkich naczyniach. Zmodyfikowano za Kumar i wsp. [149].	32
Rycina 6. Częstość pęknięcia AAA w zależności od wieku – zmodyfikowano za Creager M [157].	34
Rycina 7. Śmiertelność w zależności od przebiegu naturalnego AAA – zmodyfikowano na podstawie Thompson M. i wsp. [162].	36
Rycina 8. Przykładowy zapis z chemiluminometru. W pierwszym etapie było zapisywane promieniowanie tła, mierzono promieniowanie ze ściany tętniaka – ze śródbłonna (PODST). Ostatecznie podawano NADPH celem uzyskania maksymalnej stymulacji oksydany NAD(P)H – STYM. Podawanie TIRON-u na końcu doświadczenia potwierdziło specyficzność sygnału dla anionu nadadtlenkowego.	44
Rycina 9. Wartości MDA w osoczu chorych z grup AAA oraz kontrolnej (*p=0,016).	54
Rycina 10. Rozkład wartości MDA w poszczególnych parach w badanych grupach.	54
Rycina 11. Korelacja pomiędzy wartościami MDA w grupach badanej oraz kontrolnej. Współczynnik korelacji wynosi r=0,58; p=<0,05.	55

Rycina 12. Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego – pomiary z: AAA – ściany tętniaka; non-AAA– fragmentu aorty nieposzerzonego; (*p<0,001 vs. nonAAA; ** p<0,001 vs. AAA).	56
Rycina 13. Źródła enzymatyczne anionu ponadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej. (*-p<0,001 vs. podstawowa; **p<0,04 vs. podstawowa).	57
Rycina 14. Rola syntazy tlenu azotu w produkcji anionu ponadtlenkowego w tętniakach aorty brzusznej (*-p<0,01 vs. podstawowa).	58
Rycina 15. Wpływ poszczególnych inhibitorów na produkcję anionu ponadtlenkowego po stymulacji NADPH (*p<0,001; **p=0,01; ***p=0,02 vs. podstawowa).	59
Rycina 16. Wpływ chelerytryny na produkcję anionu ponadtlenkowego w stanie podstawowym (A) oraz po stymulacji NADPH (B).	60
Rycina 17. Histochemiczne barwienie (DHE) przedstawia produkcję anionu ponadtlenkowego in situ w ścianie aorty brzusznej poszerzonej tętniakowato (A) oraz po preinkubacji z 500U/ml PEG-SOD (B).	61
Rycina 18. Produkcja anionu ponadtlenkowego w zależności od punktacji w skali Vanzetto.	63
Rycina 19. Korelacja pomiędzy produkcją podstawową a rozmiarem tętniaka.	64
Rycina 20. Korelacja pomiędzy stymulowaną produkcją anionu ponadtlenkowego a pomiarem tętniaka.	65
Rycina 21. Korelacja pomiędzy stymulowaną produkcją anionu ponadtlenkowego a stopniem poszerzenia (stosunek L3/L4).	65



## XI. Spis tabel

Tabela 1. Czynniki ryzyka wystąpienia tętniaka aorty brzusznej. ....	14
Tabela 2. Czynniki modyfikujące dostępność anionu ponadtlenkowego. ....	46
Tabela 3. Charakterystyka ogólna chorych z AAA .....	49
Tabela 4. Charakterystyka chorych z AAA cz.1 – choroby współistniejące.....	50
Tabela 5. Charakterystyka chorych z AAA cz.2 – badania laboratoryjne.....	51
Tabela 6. Charakterystyka chorych z AAA cz.3 – zażywane leki. ....	51
Tabela 7. Przed- i śródoperacyjna ocena morfologiczna tętniaków. ....	52
Tabela 8. Porównanie parametrów klinicznych w grupie badanej i kontrolnej .....	53
Tabela 9. Rozkład wartości chemiluminescencji (RLU/s/mg sm) z uwzględnieniem niektórych czynników ryzyka .....	62

## XII. Piśmiennictwo

1. Isselbacher, E.M., *Diseases of the Aorta; Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 7th ed. 2005: Saunders.
2. Sonesson, B., et al., *Sex difference in the mechanical properties of the abdominal aorta in human beings*. J Vasc Surg, 1994. **20**(6): p. 959-69.
3. Shimojo, M., et al., *Age-related changes in aortic elasticity determined by gated radionuclide angiography in patients with systemic hypertension or healed myocardial infarcts and in normal subjects*. Am J Cardiol, 1991. **68**(9): p. 950-3.
4. Kelly, R.P., R. Tunin, and D.A. Kass, *Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle*. Circ Res, 1992. **71**(3): p. 490-502.
5. Ashton, H.A., et al., *The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9345): p. 1531-9.
6. Bown, M.J., et al., *A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair*. Br J Surg, 2002. **89**(6): p. 714-30.
7. Daly, K.J., et al., *Screening, diagnosis and advances in aortic aneurysm surgery*. Gerontology, 2004. **50**(6): p. 349-59.
8. Kim, L.G., et al., *Implications of screening for abdominal aortic aneurysms on surgical workload*. Br J Surg, 2005. **92**(2): p. 171-6.
9. Ganburgskii, A.N., *[Condition of the endothelium of the aorta during hypodynamia]*. Arkh Anat Gistol Embriol, 1986. **91**(8): p. 13-7.
10. Gryglewski, R.J. and S. Moncada, *Secretory function of vascular endothelium*. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res, 1987. **17A**: p. 397-404.
11. Gryglewski, R.J., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor*. Nature, 1986. **320**(6061): p. 454-6.
12. Schwartz, S.M., D. deBlois, and E.R. O'Brien, *The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis*. Circ Res, 1995. **77**(3): p. 445-65.
13. Matsushita, M., et al., *A rabbit model of abdominal aortic aneurysm associated with intimal thickening*. Eur Surg Res, 1999. **31**(4): p. 305-13.
14. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
15. Leung, J., et al., *Flow patterns and wall shear stresses in patient-specific models of the abdominal aortic aneurysm*. Stud Health Technol Inform, 2004. **103**: p. 235-42.
16. Wentzel, J.J., et al., *Does shear stress modulate both plaque progression and regression in the thoracic aorta? Human study using serial magnetic resonance imaging*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(6): p. 846-54.
17. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 61-74.
18. Kinlay, S., et al., *Biological mechanisms for the clinical success of lipid-lowering in coronary artery disease and the use of surrogate end-points*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(6): p. 389-97.

19. van der Wal, A.C., et al., *Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions*. Am J Pathol, 1992. **141**(6): p. 1427-33.
20. Wang, G., et al., *Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1777-83.
21. Cohen, J.R., et al., *Neutrophil chemotaxis and neutrophil elastase in the aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysms*. J Invest Surg, 1991. **4**(4): p. 423-30.
22. Sho, E., et al., *Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms*. Exp Mol Pathol, 2004. **76**(2): p. 108-16.
23. Wassef, M., et al., *Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute*. J Vasc Surg, 2001. **34**(4): p. 730-8.
24. Shah, P.K., *Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2115-7.
25. Holmes, D.R., et al., *Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications*. J Vasc Surg, 1995. **21**(5): p. 761-71; discussion 771-2.
26. Scalia, R., G. Booth, and D.J. Lefer, *Vascular endothelial growth factor attenuates leukocyte-endothelium interaction during acute endothelial dysfunction: essential role of endothelium-derived nitric oxide*. Faseb J, 1999. **13**(9): p. 1039-46.
27. Paik, D. and M.D. Tilson, *Neovascularization in the abdominal aortic aneurysm. Endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and elastolysis*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **800**: p. 277.
28. Crawford, C.M., et al., *Abdominal aortic aneurysm: an illustrated narrative review*. J Manipulative Physiol Ther, 2003. **26**(3): p. 184-95.
29. Cornuz, J., et al., *Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies*. Eur J Public Health, 2004. **14**(4): p. 343-9.
30. Franks, P.J., et al., *Risk factors for abdominal aortic aneurysms in smokers*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1996. **11**(4): p. 487-92.
31. Wanhainen, A., et al., *Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data*. J Vasc Surg, 2005. **41**(3): p. 390-6.
32. Zalba, G., et al., *Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications*. J Physiol Biochem, 2000. **56**(1): p. 57-64.
33. Reed, D., et al., *Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis?* Circulation, 1992. **85**(1): p. 205-11.
34. Belsley, S.J. and M.D. Tilson, *Two decades of research on etiology and genetic factors in the abdominal aortic aneurysm (AAA)--with a glimpse into the 21st century*. Acta Chir Belg, 2003. **103**(2): p. 187-96.
35. Powell, J.T. and L.C. Brown, *The natural history of abdominal aortic aneurysms and their risk of rupture*. Adv Surg, 2001. **35**: p. 173-85.
36. Szostek, M., *Vascular surgery in Poland*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1996. **12**(3): p. 261-2.

37. Ballard, D.J., F.G. Fowkes, and J.T. Powell, *Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD001835.
38. Englund, R., et al., *Expansion rates of small abdominal aortic aneurysms*. Aust N Z J Surg, 1998. **68**(1): p. 21-4.
39. McMillan, W.D., et al., *Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2228-32.
40. *Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial*. J Vasc Surg, 2002. **35**(1): p. 72-9.
41. Gadowski, G.R., D.B. Pilcher, and M.A. Ricci, *Abdominal aortic aneurysm expansion rate: effect of size and beta-adrenergic blockade*. J Vasc Surg, 1994. **19**(4): p. 727-31.
42. Klatt, E., *Abdominal Aortic Aneurysm*. 2005, WebPath.
43. Grange, J.J., V. Davis, and B.T. Baxter, *Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: an update and look toward the future*. Cardiovasc Surg, 1997. **5**(3): p. 256-65.
44. Bergman, R., *Atlas of Microscopic Anatomy: Section 8 - Cardiovascular System*, N.a.-. hystology, Editor. 2005.
45. Ailawadi, G., J.L. Eliason, and G.R. Upchurch, Jr., *Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm*. J Vasc Surg, 2003. **38**(3): p. 584-8.
46. Blanchard, J.F., H.K. Armenian, and P.P. Friesen, *Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study*. Am J Epidemiol, 2000. **151**(6): p. 575-83.
47. Brown, L.C. and J.T. Powell, *Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants*. Ann Surg, 1999. **230**(3): p. 289-96; discussion 296-7.
48. Coselli, J.S., et al., *Mortality and paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a risk factor analysis*. Ann Thorac Surg, 2000. **69**(2): p. 409-14.
49. Lederle, F.A., et al., *The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators*. Arch Intern Med, 2000. **160**(10): p. 1425-30.
50. Nesi, F., et al., *Preoperative risk stratification in patients undergoing elective infrarenal aortic aneurysm surgery: evaluation of five risk scoring methods*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. **28**(1): p. 52-8.
51. Powell, J.T., et al., *Smoking as a risk factor for abdominal aortic aneurysm*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **800**: p. 246-8.
52. Jedynek, M. and A. Siemiatkowski, *[Risk assessment of patients and preparation for abdominal aortic aneurysm repair--the effect of collaboration among the internist, anaesthesiologist and surgeon]*. Przegł Lek, 2004. **61**(7): p. 807-12.
53. Guzik, T.J., et al., *Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors*. Circ Res, 2000. **86**(9): p. E85-90.
54. Grajek, S., et al., *[Arterial hypertension complicated by aortic dissection. Clinical analysis, results of conservative treatment]*. Przegł Lek, 1996. **53**(2): p. 60-6.

55. Mitkowski, P., et al., [*Unusual clinical course of ruptured aortic aneurysms--reports of three cases*]. *Pol Arch Med Wewn*, 1995. **93**(2): p. 171-8.
56. Powell, J.T., *Familial clustering of abdominal aortic aneurysm--smoke signals, but no culprit genes*. *Br J Surg*, 2003. **90**(10): p. 1173-4.
57. Salo, J.A., et al., *Familial occurrence of abdominal aortic aneurysm*. *Ann Intern Med*, 1999. **130**(8): p. 637-42.
58. Shibamura, H., et al., *Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13*. *Circulation*, 2004. **109**(17): p. 2103-8.
59. van Vlijmen-van Keulen, C.J., G. Pals, and J.A. Rauwerda, *Familial abdominal aortic aneurysm: a systematic review of a genetic background*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2002. **24**(2): p. 105-16.
60. Shteinberg, D., et al., *Abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease: a comparison of risk factors and inflammatory response*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2000. **20**(5): p. 462-5.
61. Kuhlencordt, P.J., et al., *Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice*. *Circulation*, 2001. **104**(4): p. 448-54.
62. Dalman, R.L., *Oxidative stress and abdominal aneurysms: how aortic hemodynamic conditions may influence AAA disease*. *Cardiovasc Surg*, 2003. **11**(5): p. 417-9.
63. Guzik, T.J., et al., *Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(9): p. 1614-20.
64. Guzik, T.J., et al., *Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis*. *Circulation*, 2000. **102**(15): p. 1744-7.
65. Guzik, T.J., *Badania produkcji anionu ponadtlenkowego oraz dysfunkcji śródbłonna w naczyniach krwionośnych u chorych z miażdżycą.*, in *Dep. of Farmacology*. 2003, Jagiellonian University: Kraków. p. 161.
66. Venugopal, S.K., et al., *Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells*. *Circulation*, 2002. **106**(12): p. 1439-41.
67. Channon, K.M. and T.J. Guzik, *Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors*. *J Physiol Pharmacol*, 2002. **53**(4 Pt 1): p. 515-24.
68. Provost, P. and Y. Merhi, *Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions*. *Thromb Haemost*, 1997. **78**(2): p. 939-46.
69. Yang, H., et al., *Attenuation of leukocyte-endothelium interaction by antioxidant enzymes*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **35**(3): p. 266-76.
70. Artigues, C., et al., *Increased endothelium--monocyte interactions in salt-sensitive hypertension: effect of L-arginine*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. **35**(3): p. 468-73.
71. Krettek, A., et al., *Enhanced expression of CD44 variants in human atheroma and abdominal aortic aneurysm: possible role for a feedback loop in endothelial cells*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(5): p. 1571-81.

72. De La Cruz, J.P., et al., *Antiplatelet effects of prostacyclin and nitric oxide in patients with type I diabetes and ischemic or edematous retinopathy*. *Platelets*, 2001. **12**(4): p. 210-7.
73. Bassenge, E., *Antiplatelet effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide donors*. *Eur Heart J*, 1991. **12 Suppl E**: p. 12-5.
74. Deng, G.G., et al., *Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm*. *Circ Res*, 2003. **92**(5): p. 510-7.
75. Wang, Y.X., et al., *Angiotensin II increases urokinase-type plasminogen activator expression and induces aneurysm in the abdominal aorta of apolipoprotein E-deficient mice*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(4): p. 1455-64.
76. Falkenberg, M., et al., *Abnormal levels of urokinase plasminogen activator protein and tissue plasminogen activator activity in human aortic aneurysms*. *Eur J Surg*, 2001. **167**(1): p. 10-4.
77. Miller, F.J., Jr., et al., *Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(4): p. 560-5.
78. Kadoglou, N.P. and C.D. Liapis, *Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms*. *Curr Med Res Opin*, 2004. **20**(4): p. 419-32.
79. Newman, K.M., et al., *Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall*. *J Vasc Surg*, 1994. **20**(5): p. 814-20.
80. Herrera, M.D., et al., *Endothelium-dependent vasorelaxation induced by L-carnitine in isolated aorta from normotensive and hypertensive rats*. *J Pharm Pharmacol*, 2002. **54**(10): p. 1423-7.
81. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(2): p. 257-65.
82. Schachinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. *Circulation*, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
83. Juvonen, J., et al., *Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 2843-7.
84. Treska, V., O. Topolcan, and L. Pecen, *Cytokines as plasma markers of abdominal aortic aneurysm*. *Clin Chem Lab Med*, 2000. **38**(11): p. 1161-4.
85. Szekanecz, Z., et al., *Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation*. *Agents Actions*, 1994. **42**(3-4): p. 159-62.
86. Jones, K.G., et al., *Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms*. *Circulation*, 2001. **103**(18): p. 2260-5.
87. Davies, M.J., *Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models*. *Circulation*, 1998. **98**(3): p. 193-5.
88. Palinski, W., *Aneurysms: leukotrienes weaken aorta from the outside*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 896-8.
89. Capella, J.F., et al., *Complement activation and subclassification of tissue immunoglobulin G in the abdominal aortic aneurysm*. *J Surg Res*, 1996. **65**(1): p. 31-3.

90. Lindholt, J.S. and G.P. Shi, *Chronic Inflammation, Immune Response, and Infection in Abdominal Aortic Aneurysms*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006.
91. Schirmer, M., et al., *Abdominal aortic aneurysms: an underestimated type of immune-mediated large vessel arteritis?* Curr Opin Rheumatol, 2006. **18**(1): p. 48-53.
92. Schillinger, M., et al., *Anti chlamydia antibodies in patients with thoracic and abdominal aortic aneurysms*. Wien Klin Wochenschr, 2002. **114**(23-24): p. 972-7.
93. Takemoto, M., et al., *Inflammatory abdominal aortic aneurysm and Chlamydia pneumoniae infection*. Int J Cardiol, 2005. **100**(3): p. 509-10.
94. Guzik, T.J., R. Korbut, and T. Adamek-Guzik, *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation*. J Physiol Pharmacol, 2003. **54**(4): p. 469-87.
95. Petersen, E., F. Wagberg, and K.A. Angquist, *Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2002. **23**(2): p. 153-7.
96. Tamarina, N.A., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta*. Surgery, 1997. **122**(2): p. 264-71; discussion 271-2.
97. Thompson, R.W. and W.C. Parks, *Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **800**: p. 157-74.
98. McMillan, W.D. and W.H. Pearce, *Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 1999. **29**(1): p. 122-7; discussion 127-9.
99. Wilson, W.R., et al., *Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm*. Br J Surg, 2005.
100. Longo, G.M., et al., *Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 625-32.
101. Lindholt, J.S., et al., *The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2000. **20**(3): p. 281-5.
102. Busuttill, R.W., A.M. Abou-Zamzam, and H.I. Machleder, *Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms*. Arch Surg, 1980. **115**(11): p. 1373-8.
103. Petersen, E., et al., *Activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in abdominal aortic aneurysms. Relation to size and rupture*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2000. **20**(5): p. 457-61.
104. Annabi, B., et al., *Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms*. J Vasc Surg, 2002. **35**(3): p. 539-46.
105. van Laake, L.W., et al., *Systemic dilation diathesis in patients with abdominal aortic aneurysms: a role for matrix metalloproteinase-9?* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2005. **29**(4): p. 371-7.
106. Eskandari, M.K., et al., *Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice*. J Surg Res, 2005. **123**(2): p. 289-93.
107. Liu, J., et al., *Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells*. J Vasc Surg, 2003. **38**(6): p. 1376-83.

108. Baxter, B.T., et al., *Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (Phase II) multicenter study*. J Vasc Surg, 2002. **36**(1): p. 1-12.
109. Kaito, K., H. Urayama, and G. Watanabe, *Doxycycline treatment in a model of early abdominal aortic aneurysm*. Surg Today, 2003. **33**(6): p. 426-33.
110. Prall, A.K., et al., *Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice*. J Vasc Surg, 2002. **35**(5): p. 923-9.
111. Shi, G.P., et al., *Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1191-7.
112. Sukhova, G.K., et al., *Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice*. Circ Res, 2005. **96**(3): p. 368-75.
113. Budwig, R., et al., *Steady flow in abdominal aortic aneurysm models*. J Biomech Eng, 1993. **115**(4A): p. 418-23.
114. Gayer, G. and A. Bass, *Delayed rupture of abdominal aortic false aneurysm following blunt trauma*. Emerg Radiol, 2003. **10**(1): p. 64-6.
115. Jones, P.G., et al., *Emergency ultrasound credentialing for focused assessment sonography in trauma and abdominal aortic aneurysm: A practical approach for Australasia*. Emerg Med (Fremantle), 2003. **15**(1): p. 54-62.
116. Antman, E.M., *Current diagnosis and prescription for Marfan syndrome: when to operate*. J Card Surg, 1994. **9**(2 Suppl): p. 174-6.
117. Elzouki, A.N. and S. Eriksson, *Abdominal aortic aneurysms and alpha 1-antitrypsin deficiency*. J Intern Med, 1994. **236**(5): p. 587-91.
118. St Jean, P., et al., *Alpha-1-antitrypsin deficiency in aneurysmal disease*. Hum Hered, 1996. **46**(2): p. 92-7.
119. Norrgard, O., et al., *Blood groups and HLA antigens in patients with abdominal aortic aneurysms*. Hum Hered, 1984. **34**(1): p. 9-13.
120. Dubick, M.A., et al., *Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurysmal and occlusive disease*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. **220**(1): p. 39-45.
121. Yajima, N., et al., *Oxidative stress is involved in the development of experimental abdominal aortic aneurysm: a study of the transcription profile with complementary DNA microarray*. J Vasc Surg, 2002. **36**(2): p. 379-85.
122. Zhang, J., et al., *Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury*. J Vasc Surg, 2003. **38**(2): p. 360-7.
123. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
124. Harrison, D.G., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2153-7.
125. Faxon, D.P., et al., *Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2617-25.
126. Carr, A.C., M.R. McCall, and B. Frei, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(7): p. 1716-23.
127. Kimura, H., et al., *Release of superoxide radicals by mouse macrophages stimulated by oxidative modification of glycated low density lipoproteins*. Atherosclerosis, 1995. **118**(1): p. 1-8.



128. Bergamini, C.M., et al., *Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(14): p. 1611-26.
129. Kalinowski, L. and T. Malinski, *Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction*. Acta Biochim Pol, 2004. **51**(2): p. 459-69.
130. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
131. Peppin, G.J. and S.J. Weiss, *Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4322-6.
132. Rajagopalan, S., et al., *Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability*. J Clin Invest, 1996. **98**(11): p. 2572-9.
133. Li, P.F., R. Dietz, and R. von Harsdorf, *Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell*. FEBS Lett, 1997. **404**(2-3): p. 249-52.
134. Daugherty, A. and L. Cassis, *Angiotensin II and abdominal aortic aneurysms*. Curr Hypertens Rep, 2004. **6**(6): p. 442-6.
135. Daugherty, A., M.W. Manning, and L.A. Cassis, *Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(11): p. 1605-12.
136. Tummala, P.E., et al., *Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis*. Circulation, 1999. **100**(11): p. 1223-9.
137. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
138. Griendling, K.K. and M. Ushio-Fukai, *Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 21-7.
139. Wang, Y.X., et al., *Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting apoptosis and proteolysis*. Circulation, 2005. **111**(17): p. 2219-26.
140. Sigala, F., et al., *Relationship between iNOS expression and aortic cell proliferation and apoptosis in an elastase-induced model of aorta aneurysm and the effect of 1400 W administration*. Surgery, 2005. **137**(4): p. 447-56.
141. Mateos, R., et al., *Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **827**(1): p. 76-82.
142. Lemiere, S., et al., *DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve Unio tumidus*. Biomarkers, 2005. **10**(1): p. 41-57.
143. Kadiiska, M.B., et al., *Biomarkers of oxidative stress study III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid*

- on measurements of oxidative products of lipids in CCl<sub>4</sub> poisoning. *Free Radic Biol Med*, 2005. **38**(6): p. 711-8.
144. DeChatelet, L.R., et al., *Oxidative metabolism of the human eosinophil*. *Blood*, 1977. **50**(3): p. 525-35.
  145. Zabucchi, G., et al., *Free radicals generation by the inflammatory cells*. *Agents Actions Suppl*, 1980. **7**: p. 159-66.
  146. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.
  147. Suh, Y.A., et al., *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1*. *Nature*, 1999. **401**(6748): p. 79-82.
  148. Kaminski, P.M. and M.S. Wolin, *Hypoxia increases superoxide anion production from bovine coronary microvessels, but not cardiac myocytes, via increased xanthin oxidase*. *Microcirculation*, 1994. **1**(4): p. 231-6.
  149. Ohara, Y., et al., *Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production*. *Circulation*, 1995. **92**(4): p. 898-903.
  150. Zuo, L., et al., *Sources for superoxide release: lessons from blockade of electron transport, NADPH oxidase, and anion channels in diaphragm*. *Antioxid Redox Signal*, 2003. **5**(5): p. 667-75.
  151. Kumar, V., A.K. Abbas, and N. Fausto, *Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. ed. 2005: Saunders.
  152. Nathan, C., *Inducible Nitric Oxide Synthase: What Difference Does It Make?* *J. Clin. Invest.*, 1997. **100**(10): p. 2417-2423.
  153. Buttery, L.D., et al., *Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite*. *Lab Invest*, 1996. **75**(1): p. 77-85.
  154. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
  155. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
  156. Santilli, J.D. and S.M. Santilli, *Diagnosis and treatment of abdominal aortic aneurysms*. *Am Fam Physician*, 1997. **56**(4): p. 1081-90.
  157. Sterpetti, A.V., et al., *Identification of abdominal aortic aneurysm patients with different clinical features and clinical outcomes*. *Am J Surg*, 1988. **156**(6): p. 466-9.
  158. Szostek, M., et al., *Surgical management of abdominal aortic aneurysms in Poland. A multi-centre study*. *Int Angiol*, 1993. **12**(4): p. 318-22.
  159. Creager, M. and J. Halperin. *Atlas of Heart Diseases Vascular Disease*. 2005 [cited].
  160. Vanzetto, G., et al., *Additive value of thallium single-photon emission computed tomography myocardial imaging for prediction of perioperative events in clinically selected high cardiac risk patients having abdominal aortic surgery*. *Am J Cardiol*, 1996. **77**(2): p. 143-8.
  161. Kertai, M.D., et al., *Association between long-term statin use and mortality after successful abdominal aortic aneurysm surgery*. *Am J Med*, 2004. **116**(2): p. 96-103.

162. Claridge, M.W., et al., *ACE inhibitors increase type III collagen synthesis: a potential explanation for reduction in acute vascular events by ACE inhibitors*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. **28**(1): p. 67-70.
163. Lloyd, G.M., et al., *Patients with abdominal aortic aneurysm: are we missing the opportunity for cardiovascular risk reduction?* J Vasc Surg, 2004. **40**(4): p. 691-7.
164. Thompson, M.M., *Infrarenal Abdominal Aortic Aneurysms*. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2003. **5**(2): p. 137-146.
165. Prinssen, M., et al., *A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms*. N Engl J Med, 2004. **351**(16): p. 1607-18.
166. Norman, P.E., et al., *Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm*. Bmj, 2004.
167. Kertai, M.D., et al., *Validation of two risk models for perioperative mortality in patients undergoing elective abdominal aortic aneurysm surgery*. Vasc Endovascular Surg, 2003. **37**(1): p. 13-21.
168. Sim, A., et al., *Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard*. J. Chromatogr 2003. **785**(2): p. 337-44.
169. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005. **15**(4): p. 316-28.
170. Hermans, N., et al., *Method development and validation for monitoring in vivo oxidative stress: evaluation of lipid peroxidation and fat-soluble vitamin status by HPLC in rat plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **822**(1-2): p. 33-9.
171. Li, Y., et al., *Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2015-23.
172. Ohara, Y., T.E. Peterson, and D.G. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2546-51.
173. Skatchkov, M.P., et al., *Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(2): p. 319-24.
174. Guzik, T.J., et al., *Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels*. Hypertension, 2002. **39**(6): p. 1088-94.
175. Nguyen, A.T., et al., *Modulation of human granulocyte and monocyte chemiluminescence responses: evidence for distinct free radical generating systems*. J Clin Lab Immunol, 1983. **12**(1): p. 47-55.
176. Devlin, R.G., et al., *Evaluation of free radical scavengers in studies of lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Immunopharmacology, 1981. **3**(2): p. 147-59.
177. Kashiwagi, A., et al., *Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E976-83.
178. Garvey, E.P., et al., *1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4959-63.

179. Thomsen, L.L., et al., *Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3300-4.
180. Armstead, W.M., *Protein kinase C activation generates superoxide and contributes to impairment of cerebrovasodilation induced by G protein activation after brain injury*. Brain Res, 2003. **971**(2): p. 153-60.
181. Cavas, L. and L. Tarhan, *Effects of vitamin-mineral supplementation on cardiac marker and radical scavenging enzymes, and MDA levels in young swimmers*. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2004. **14**(2): p. 133-46.
182. Treska, V., et al., *Inflammation in the wall of abdominal aortic aneurysm and its role in the symptomatology of aneurysm*. Cytokines Cell Mol Ther, 2002. **7**(3): p. 91-7.