

COLLEGIUM MEDICUM UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

Wydział Lekarski

Stefan Chłopicki

**BADANIA NAD MECHANIZMEM REAKTYWNEJ HYPEREMII
W PERFUNDOWANYM IZOLOWANYM SERCU ŚWINKI MORSKIEJ**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. Ryszard Gryglewski

Z Katedry Farmakologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik: Prof. dr hab. Ryszard Gryglewski

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095251

Kraków 1993

The heart, consequently, is the beginning of life; the sun of the microcosm, even as the sun in his turn might well be designed the heart of the world; for it is the heart by whose virtue and pulse the blood is moved, perfected, made apt to nourish, and is preserved from corruption and coagulation....

William Harvey (1628). Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus.

Moim rodzicom

Pragnę wyrazić moją głęboką wdzięczność panu profesorowi Ryszardowi Gryglewskiemu, który uczył mnie jak poruszać się po krętych ścieżkach badań naukowych. Tylko dzięki jego ogromnemu zainteresowaniu, cennym wskazówkom w trakcie prowadzenia badań i nieocenionej pomocy w redagowaniu tej pracy, moja rozprawa doktorska mogła powstać w niniejszej formie.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam pani docent Aldonie Dembińskiej-Kieć pod której opiekuńczymi skrzydłami stawiałem pierwsze kroki w badaniach na izolowanym sercu.

Dziękuję również dr Waldemarowi Radziszewskiemu za rady i cenną pomoc w trakcie wykonywania tej pracy, dr Ewie Marcinkiewicz za uwagi podczas redakcji tej pracy, mgr Katarzynie Cieślik za jej pomoc plastyczną oraz dr Pawłowi Niezabitowskiemu, bez którego pomocy używane przeze mnie komputery nie byłyby posłuszne moim rozkazom.

SPIS TREŚCI

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	3
I. WSTĘP	4
1.1 Reaktywna hyperemia	4
1.2 Postulowane mechanizmy reaktywnej hyperemii	5
1.3 Reaktywna hyperemia mięśnia sercowego	7
1.4 Postulowane mechanizmy reaktywnej hyperemii mięśnia sercowego	8
Adenozyna	9
Prostanoidy	10
1.5 Tlenek azotu	13
1.6 RH mięśnia sercowego wywołana bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego	16
II. CEL PRACY	18
III. MATERIAŁY I METODY	19
3.1 Materiały	19
3.2 Metody	20
Metoda izolacji serca	20
Opis aparatu Langendorffa	21
Rejestracja czynności izolowanego serca	22
Komputerowe zbieranie i opracowanie danych	24
Protokół doświadczeń	25
Metoda wywoływania reaktywnej hyperemii (RH) i jej pomiaru	26
Metody pomiaru efektu działania substancji naczyniorozszerzających	28
Oznaczanie uwalniania cyklicznych nukleotydów przez serce	28
Analiza statystyczna	28
Addendum	29
IV. WYNIKI	31
4.1 Pomiary wartości wyjściowych	31
Wieńcowe ciśnienie perfuzyjne (CCP)	31
Ciśnienie lewokomorowe (LVP)	32
Pierwsza pochodna ciśnienia lewokomorowego (dp/dt)	32
Elektrokardiogram	35
4.2 Rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez substancje naczyniorozszerzające o działaniu zależnym i niezależnym od obecności śródbłonna w naczyniach.	35

Porównanie skuteczności substancji naczyniorozszerzających o śródbłonkowo-zależnym i śródbłonkowo-niezależnym mechanizmie działania	37
Tachyfilaksja na nitroglicerynę	38
4.3 Badania nad udziałem prostanoidów i tlenku azotu w odczynach perfundowanego serca na Bk, SP, Ach.	38
Zahamowanie cyklooksygenazy	38
Zahamowanie NO syntazy	38
4.4 Charakterystyka reaktywnej hyperemii (RH) w izolowanym sercu	41
Zmiany kurczliwości mięśnia sercowego w czasie RH	44
Zmiany EKG w czasie RH	44
4.5 Mechanizm rozszerzenia naczyń wieńcowych w czasie RH	46
Udział NO w RH	46
Udział prostanoidów w RH	46
Udział adenozyiny w RH	50
4.6 Uwalnianie cyklicznych nukleotydów w czasie RH	50
Uwalnianie cGMP	50
Uwalnianie cAMP	51
V. DYSKUSJA	55
VI. WNIOSKI	77
VII. STRESZCZENIE	78
VIII. POSŁOWIE	81
8.1 Opis modelu izolowanego serca stworzonego przez Langendorffa	85
IX. PIŚMIENNICTWO	87

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ach	acetylocholina
Bk	bradykinina
bufor K-H	bufor Krebsa-Henseleita
cAMP	cykliczny 3', 5' - monofosforan adenozyne
cGMP	cykliczny 3', 5' - monofosforan guanozyne
cNOS	konstytutywna syntaza tlenu azotu
CPP	wieńcowe ciśnienie perfuzyjne
dp/dt	pierwsza pochodna ciśnienia lewokomorowego
EDRF	śródbłonkowy czynnik rozkurczający naczyne
GTN	triazotan glicerolu (nitrogliceryna)
HSE	Hugo Sachs Elektronik
IND	indometacyna
LVP	ciśnienie w lewej komorze
NaNP	nitroprusydek sodu
NO	tlenek azotu
NO ₂ Arg	N ^G -nitro-L-arginina
NOS	syntaza tlenu azotu
PGI ₂	prostacyklina
PO ₂	ciśnienie parcjalne tlenu
8-PT	8-fenylteofilina
pRH	powierzchnia reaktywnej hyperemii
RH	reaktywna hyperemia
SIN-1	3-morfolinosydnonimina
SOD	dysmutaza jonów ponadtlenkowych
SP	substancja P

I. WSTEP

1.1 Reaktywna hyperemia

Już ponad sto lat temu zauważono, że po krótkotrwałym zamknięciu, następowe otwarcie dopływu krwi do kończyny, wywołuje rozszerzenie naczyń i wzrost przepływu krwi ponad stan wyjściowy przez uprzednio niedokrwioną tkankę. Ten odczyn na niedokrwienie nazwano reaktywną hyperemią (RH, ¹) (Conheim, 1872). W kończynach reakcja ta dotyczy łożyska skórno-mięśniowego (Kroese, 1977), ale można ją badać tylko w łożysku skórnym (Fagrell, 1985), lub tylko w łożysku mięśni szkieletowych (Shustova i wsp., 1989), a nawet w pojedynczych arterioliach tych obszarów unaczynienia (Messina i wsp., 1977). RH badano również w łożysku naczyń tkanki tłuszczowej (Nielsen & Sejrsen, 1972), łożysku naczyń policzkowych (Lombard & Duling, 1981), gruczołów ślinowych (Todoki i wsp., 1989), łożysku nerkowym (Honda i wsp., 1968), mózgowym (Gourley & Heistad, 1984), rdzenia kręgowego (Hitchon i wsp., 1990), jądra (Thomas i wsp., 1981), siatkówki (Ernest, 1976) i łożysku trzewnym, jak na przykład w łożysku okrężnicy (Ahn i wsp., 1986), jelita cienkiego (Shepherd, 1982), trzustki (Kvietys i wsp., 1982), śledziony (Hamilton, 1976), żołądka (Kiel i wsp., 1985), a także w macicy (Garris i wsp., 1984). RH po raz pierwszy obserwowano u człowieka, ale występuje ona również u wielu gatunków zwierząt. Badano ją między innymi u żaby (Gentry & Johnson, 1972), szczura (Bos i wsp., 1987), kury (Klabunde & Mayer, 1979), królika (Higuchi, 1985), psa (Cevese & Cerutti, 1981), owcy (Fraenkel & Douglas, 1969), kota (Hamilton, 1976), i małpy (Sundt & Waltz, 1971). Ponad wszelką wątpliwość jest to więc zjawisko

¹ Właściwie należałoby zjawisko to nazywać "odczynowym przekrwieniem", przyjął się jednak w krajowym piśmieniu termin "reaktywna hyperemia" i jego będę używał.

uniwersalne zaliczające się zdaniem fizjologów, obok autoregulacji ciśnienie/przepływ oraz aktywnej (czynnościowej, funkcjonalnej) hyperemii, do podstawowych zjawisk autoregulacyjnych mikrokrazenia (Berne & Levy, 1990).

1.2 Postulowane mechanizmy reaktywnej hyperemii

Już w pierwszych pracach o RH wysunięto szereg hipotez próbujących wyjaśnić mechanizm tego zjawiska. Najważniejsze z nich to hipotezy; miogenna, metaboliczna i neurogenna, które pomimo podeszłego wieku są wciąż cytowane przez badaczy RH.

Autor hipotezy miogennej, Bayliss (1902) proponował, że bodźcem utrzymującym prawidłowe napięcie mięśni gładkich naczyń jest mechaniczne rozciąganie tych komórek (stretching) przez płynącą w naczyniach krew. Okluzja naczyń powoduje spadek ciśnienia perfuzyjnego, zmniejszenie ciśnienia transmuralnego i rozszerzenie naczyń krwionośnych. Wg teorii miogennej rozszerzenie naczyń w czasie RH miałyby być związane z czysto mechanicznymi właściwościami mięśniówki gładkiej. Pomimo tego, że dotychczas nie udało się odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób wzrost ciśnienia transmuralnego miałby prowadzić do skurczu komórki mięśniowej a spadek ciśnienia transmuralnego do jej rozkurczu, hipoteza miogenna ma nadal wielu swoich zwolenników (Johnson, 1964; Berne & Levy, 1990). Ostatnie odkrycie kanałów wapniowych wrażliwych na rozciąganie, znajdujących się w błonie komórek mięśniowych uzupełniło tą teorię o aspekt molekularny (Johnson, 1991).

Konkurencyjna hipoteza metaboliczna została zaproponowana w 1925 roku przez Lewisa i Granta. Według tej hipotezy za RH odpowiedzialna jest jakaś substancja naczyniorozszerzająca, która w warunkach podstawowego przepływu krwi jest wytwarzana przez tkankę w niewielkich ilościach, natomiast w czasie okluzji naczyń gromadzi się w tkance i jest z niej wypłukiwana w czasie RH. Podziw dla intuicji autorów hipotezy

metabolicznej budzi fakt, że zaproponowano ją na wiele lat przed odkryciem pierwszych przekaźników naczyniorozszerzających. Dzisiaj metaboliczna hipoteza RH i metaboliczna teoria autoregulacji przepływu tkankowego są uznawane przez wielu autorów (Johnson, 1964; Berne & Levy, 1990). Choć nie ma jeszcze zgody co do natury naczyniorozszerzającego przekaźnika to jednak uważa się, że przepływ krwi przez tkankę jest ściśle związany z jej zapotrzebowaniem na tlen. Dysproporcja pomiędzy aktualnym zapotrzebowaniem tkanki na tlen i jego zaopatrzeniem jaka pojawia się w czasie wysiłku (przekrwienie czynnościowe) lub po chwilowym niedokrwieniu (RH) pociągają za sobą wzrost przepływu krwi spowodowany uwolnieniem tego czy innego naczyniorozszerzającego przekaźnika.

Jeszcze w zeszłym stuleciu Roy i Brown (1872) wykazali, że RH jest miejscowym odczynem naczyniowym i nie zależy od ośrodkowego układu nerwowego. Nie ma jednak pewności co do udziału obwodowego układu nerwowego w regulacji RH (Johnson, 1964; Berne & Levy, 1990).

Reasumując, mechanizmy; miogenny, metaboliczny i neurogenny mogą mieć swój udział w powstaniu RH. Na podstawie dotychczasowego piśmiennictwa można sądzić, że udział tych mechanizmów w powstaniu RH zależy od rodzaju badanej tkanki lub narządu. Na przykład, w RH łożyska skórnoego dominujące znaczenie zdaje się mieć komponenta nerwowa i miogenna a niewielkie znaczenie przypisuje się komponente metabolicznej (Lembeck & Donnerer, 1981; Wilkin, 1987), natomiast w łożysku mięśni szkieletowych na plan pierwszy wysuwają się komponenta miogenna i metaboliczna (Meininger, 1987; Bjornberg i wsp., 1990).

1.3 Reaktywna hyperemia mięśnia sercowego

Po raz pierwszy zjawisko RH w łożysku wieńcowym opisali w 1939 roku Katz i Lindner. Bez wątplenia od tego czasu do dnia dzisiejszego najwięcej prac o RH dotyczy mięśnia sercowego. Ten fakt mógłby znaleźć swoje uzasadnienie w wyjątkowym charakterze krążenia wieńcowego. Krążenie wieńcowe jest bowiem jedynym krążeniem w ustroju, w którym ekstrakcja tlenu z krwi przez tkankę w warunkach podstawowych bliska jest wartości maksymalnej. Zwiększenie zużytkowania tlenu przez obszary tkankowe zaopatrywane przez krążenie wieńcowe może być więc uzyskane jedynie na drodze zwiększenia przepływu wieńcowego, w przeciwieństwie do innych narządów gdzie istnieje możliwość dostosowywania ekstrakcji tlenu z oksyhemoglobiny do aktualnego zapotrzebowania tkanki na tlen (Olsson & Bünger, 1987). Po krótkotrwałym zamknięciu przepływu wieńcowego jego otwarcie wywołuje reaktywne rozszerzenie naczyń i chwilowy wzrost przepływu krwi przez uprzednio niedokrwione serce, tak jakby chodziło o jak najszybsze przywrócenie zachwianej przez krótkie niedotlenienie równowagi między zapotrzebowaniem mięśnia sercowego w tlen a jego zaopatrzeniem. W tym kontekście możnaby zaryzykować stwierdzenie, że RH mięśnia sercowego ma znaczenie "fizjologiczne". Za tym poglądem dodatkowo przemawia większa intensywność sercowej RH w stosunku do RH w innych tkankach (Franco Cereceda & Lundberg, 1989).

Poznanie mechanizmu sercowej RH może mieć nie tylko wartość poznawczą ale również i zastosowanie kliniczne. Z teoretycznego bowiem punktu widzenia farmakologiczne środki potęgujące mechanizm RH mogłyby zapobiegać, czy też zmniejszać skutki krótkotrwałego niedotlenienia mięśnia sercowego wykorzystując w mechanizmie swojego działania "wymyślone przez Naturę" fizjologiczne zjawisko RH. Być może takie leki mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu niedokrwiennej choroby serca. Niestety mimo ponad 50-ciu lat badań nad RH mięśnia sercowego mechanizm tego zjawiska ciągle jeszcze nie został poznany do końca.

1.4 Postulowane mechanizmy reaktywnej hyperemii mięśnia sercowego

Już Katz i Lindner (1939) zaobserwowali, że wielkość sercowej RH rośnie wraz z wydłużeniem czasu okluzji i sugerowali, że za powstanie RH może być odpowiedzialna jakaś łatwo dyfundująca substancja naczyniorozszerzająca, która jest wytwarzana w niedokrwionym sercu, gromadzona w nim w okresie okluzji naczyń wieńcowych, a wypłukiwana z niego w okresie reperfuzji, w obecności tlenu. Kolejne lata badań nad RH przyniosły szereg pośrednich dowodów na istnienie metabolicznego mechanizmu reaktywnego rozszerzenia naczyń wieńcowych. Wykazano, że obniżenie metabolizmu mięśnia sercowego przez jego ochłodzenie zmniejsza RH (Badeer, 1965), a zwiększenie zapotrzebowania na tlen wywołane stymulacją elektryczną zwiększa RH (Bache i wsp., 1973). Sugerowano również, że kinetyka RH bardziej przemawia za metaboliczną niż miogenną hipotezą RH (Olsson, 1964). Od dawna wiadomo było, że niedotlenienie jest bardzo silnym bodźcem rozszerzającym naczynia wieńcowe (Hilton & Eichholtz, 1925). Wykazano również, że w RH mięśnia sercowego w przeciwieństwie do RH łożyska skórnego (Lembeck & Donnerer, 1981) czy jelitowego (Pawlik i wsp., 1991; Hottenstein i wsp., 1992) nie pośredniczą mechanizmy neurogenne (Bache i wsp., 1975a). Wyniki wyżej cytowanych prac były powodem że hipoteza metaboliczna RH zdominowała myślenie o mechanizmie tego zjawiska w łożysku wieńcowym (Olsson, 1975).

Przez wiele lat poszukiwano przekźników sercowej RH i oczywiście każda nowo odkryta endogenna substancja naczyniorozszerzająca wytwarzana przez serce lub przez naczynia wieńcowe budziła nadzieję i jej udział w sercowej RH był dokładnie analizowany.

Adenozyna

Pierwszym odkrytym naczyniorozszerzającym mediatorem uwalnianym z mięśnia sercowego była adenozyna. Już w 1929 po raz pierwszy obserwowano naczyniorozszerzające i hipotensyjne działanie adenozyny (Drudy & Shent-Gyorgyi, 1929). Natomiast adenozynową hipotezę RH sformuowano w latach sześćdziesiątych, gdy okazało się, że adenozyna uwalniana jest w sposób ciągły z mięśnia sercowego (Berne, 1963), a hypoksja (Berne i wsp., 1970) lub nawet krótkie niedokrwienie mięśnia sercowego (Rubio i wsp., 1969) znacznie zwiększają jej uwalnianie. Podejrzewano, że adenozyna uwalniana jest z mięśnia sercowego w odpowiedzi na niewystarczające w stosunku do aktualnych potrzeb zaopatrzenie mięśnia sercowego w tlen. Uwolnienie adenozyny prowadzi do zwiększenia przepływu wieńcowego i przywraca zaburzoną równowagę pomiędzy zaopatrzeniem i zapotrzebowaniem serca na tlen (Berne, 1980; Bardenheuer & Schrader, 1986).

Znane są już biochemiczne podstawy adenozynowej hipotezy regulacji przepływu wieńcowego. Niedokrwienie serca prowadzi do niedoboru związków wysokoenergetycznych syntetyzowanych w toku procesów tlenowych, czego konsekwencją jest zwiększona hydroliza wysokoenergetycznego ATP. Gromadzący się w komórkach mięśnia sercowego ADP uaktywnia 5' nukleotydazę, która rozkłada AMP do adenozyny. Tak powstała adenozyna przedostaje się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej gdzie działa naczyniorozszerzająco, oraz chronotropowo, batmotropowo i inotropowo ujemne, odpowiednio za pośrednictwem receptorów A_2 i A_1 (Feigl, 1983; Olsson & Pearson, 1990). Zakończenie działania adenozyny następuje w wyniku jej rozkładu przez błonową deaminazę adenozyny, lub na drodze jej wychwytu przez komórki śródbłonka naczyń (Feigl, 1983).

Przez wiele lat uważano, że wzrost stężenia adenozyny i jej metabolitów w efluencie z mięśnia sercowego w czasie RH (Rubio i wsp., 1969), oraz korelacja pomiędzy

aktywnością metaboliczną serca a uwalnianiem adenozyiny (Bardenheuer & Schrader, 1983) i pomiędzy ilością uwolnionej adenozyiny a wielkością RH (Schrader i wsp., 1977; Onwochei & Mustafa, 1985) to wystarczająco mocne dowody dla poparcia adenozyinowej hipotezy RH. Dopiero zastosowanie farmakologicznych środków ingerencji w metabolizm i działanie receptorowe adenozyiny, jak na przykład inhibitorów wychwyty adenozyiny (dipirydamol, lidoflazyna, dilazep) lub antagonistów receptorowych adenozyiny (aminofilina, teofilina i ich pochodne), pozwoliło zweryfikować adenozyinową hipotezę RH. Istnieje wiele prac, w których przy użyciu aminofiliny (Bittar & Pauly, 1971; Curnish i wsp., 1972), teofiliny i jej pochodnych (Scott i wsp., 1979; Merrill & Young, 1981; Kanatsuka i wsp., 1992), deaminazy adenozyinowej (Saito i wsp., 1981) lub jej inhibitorów (Saito i wsp., 1985), dipirydamolu (Degenring i wsp., 1976; Juhran i wsp., 1971), lidoflazyny (Jageneau i wsp., 1969; Bittar & Pauly, 1971) i dilazepu (Saito i wsp., 1982) potwierdzono udział adenozyiny w RH.

Równocześnie wykazano jednak, że aminofilina lub teofilina znacznie hamują rozszerzenie naczyń wywołane egzogenną adenozyiną, natomiast rozszerzenie naczyń w toku RH jest przez te leki hamowane w mniejszym stopniu (Juhran i wsp., 1971; Giles & Wilcken, 1977a). W przeciwieństwie do RH wywołanej dłuższą niż 30 sekund okluzją naczyń wieńcowych (Degenring i wsp., 1976; Juhran i wsp., 1971), dipirydamol lub aminofilina nie wpływają na RH wywołaną krótkim (< 10 sekund) zamknięciem przepływu wieńcowego (Eikens & Wilcken, 1973; Juhran i wsp., 1971; Schutz i wsp., 1977).

Wydaje się więc że adenozyina jest, aczkolwiek na pewno nie jedynym, przekaźnikiem RH.

Prostanoidy

W roku 1935 wyizolowano z wydzieliny gruczołu krokowego i z pęcherzyków nasiennych prostaglandyny, które silnie rozszerzały naczynia krwionośne (von Euler, 1935). Najsilniej rozszerzały naczynia krwionośne prostaglandyny serii E (Nakano &

McCurdy, 1967), i to w stężeniach 20-to krotnie niższych od adenozyiny (Schrör & Krebs, 1976). PGE₂ jest w sposób ciągle uwalniana przez serce (Minkes i wsp., 1973) i jej uwalnianie wzrasta w czasie niedotlenienia serca (Block i wsp., 1974; Wennmalm, 1975). Równocześnie okazało się, że uwalnianie PGE₂ w sercu może być sprzężone z działaniem adenozyiny, gdyż nukleotydy adenozyinowe uwalniają PGE₂ z serca (Minkes i wsp., 1973). Podejrzewano więc, że PGE₂ obok adenozyiny może mieć swój udział w metabolicznej regulacji przepływu wieńcowego, tym bardziej, że wcześniej udowodniono już rolę prostaglandyny E₂ w autoregulacji przepływu nerkowego (Herbaczyńska Cedro & Vane, 1974).

W roku 1976 odkryto pierwszy przekąźnik śródbłonkowy, prostacyklinę (PGI₂) (Gryglewski i wsp., 1976), a niedługo potem wykazano, że jest ona głównym metabolitem kwasu arachidonowego w łożysku wieńcowym (de Deckere i wsp., 1977, Schrör i wsp., 1978). Gdy okazało się, że ilości uwalnianej przez serce prostacykliny zawierają się w granicach stężeń wykazujących działanie naczyniorozszerzające (Schrör i wsp., 1978), prostacyklina stała się kolejnym przekąźnikiem podejrzewanym o udział w regulacji przepływu wieńcowego. Prostacyklina jest bardzo silnym związkiem rozszerzającym naczynia krwionośne (w krążeniu wieńcowym dwa rzędy wielkości silniejszym od adenozyiny, (Schrör i wsp., 1980)), a ponadto hamuje agregację płytek krwi, wykazuje działanie fibrynolityczne, cytoprotekcyjne i przeciwmiażdżycowe. Mechanizm farmakologicznego działania prostacykliny związany jest ze stymulacją cykazy adenylowej i wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP (Gryglewski i wsp., 1991). Nietrwałość prostacykliny (t_{1/2} ok. 3 min) oraz niewielkie stężenie we krwi produktu jej hydrolizy (6-keto-PGF_{1α}) wskazuje raczej na miejscowe działanie PGI₂ *in statu nascendi*, a nie na jej rolę jako krążącego hormonu (Schrör, 1985). Gdy wykazano, że hypoksja stymuluje uwalnianie PGI₂ w sercu, i to właśnie PGI₂, a nie inne metabolity kwasu arachidonowego, jest odpowiedzialna za rozszerzenie naczyń wieńcowych wywołane niedotlenieniem serca (Roberts i wsp., 1981; Busse i wsp., 1984), hipoteza udziału PGI₂

w regulacji krążenia wieńcowego znalazła wielu zwolenników. Hipoteza ta wydawała się szczególnie atrakcyjna jeszcze z tego powodu, że wykazano działanie kardioprotekcyjne prostacykliny na niedotlenione serce (Lefer i wsp., 1978). PGI₂ miała by być więc nie tylko mediatorem (obok adenozyliny) adaptującym łożysko wieńcowe do aktualnego zapotrzebowania na tlen, ale również przekaźnikiem chroniącym serce przed jego uszkodzeniem w obliczu niedoboru tlenu (Schrör, 1981).

Odkrycie prostacykliny (PGI₂) i jej niezwykle własności biologiczne usunęły w cień prostaglandynę E₂ - inny prostanoid o działaniu naczyniorozszerzającym. Tymczasem Gerritsen i Cheli (1983) wykazali, że w izolowanych komórkach śródbłonna mikrokrażenia wieńcowego kwas arachidonowy jest przekształcany przede wszystkim do PGE₂, a dopiero w drugim rzędzie do PGI₂. Na podstawie tych badań i własnych obserwacji Kaley i wsp. (1985) zaproponowali, że synteza PGI₂ przewyższa tworzenie PGE₂ tylko w śródbłonku dużych naczyń (aorta, tętnica wieńcowa), natomiast w mikrokrażeniu ma tworzyć się głównie PGE₂. Ciągłe niewyjaśnionym pozostaje pytanie, jaką rolę w krążeniu wieńcowym odgrywa PGE₂, a jaką PGI₂. W każdym razie PGI₂ i wcześniej odkrytą PGE₂ uznano za kolejnych kandydatów na przekaźniki RH.

Rolę PGI₂ i PGE₂ w RH badano stosując inhibitory cyklooksygenazy kwasu arachidonowego, którymi są niesterydowe leki przeciwzapalne (Vane, 1973). Wyniki tych prac nie są jednoznaczne. Opisywane przez wielu autorów wzrost uwalniania prostaglandyn i prostacykliny w czasie RH oraz hamowanie RH przez inhibitory cyklooksygenazy (Alexander i wsp., 1975; Kraemer i wsp., 1976; Miyajima i wsp., 1989) nie zostały potwierdzone przez innych badaczy (Hintze & Kaley, 1977; Sunahara & Talesnik, 1979; Hintze & Vatner, 1984; Kimura & Satoh, 1985).

Wydaje się więc, że dotychczasowe badania nad rolą prostanoidów w RH nie przyniosły jeszcze ostatecznego rozstrzygnięcia.

Hayashi i wsp (1988) po raz pierwszy wykazali, że uszkodzenie śródbłonna naczyń wieńcowych hamuje RH mięśnia sercowego w ponad 90%. Nasuwa się więc pytanie czy

przebiegiem RH mógłby być jakiś inny, nie-prostanoidowy czynnik śródbłonkowy o działaniu naczyniorozszerzającym.

1.5 Tlenek azotu

Furchgott i Zawadzki (1980) wykazali, że warunkiem rozszerzającego działania acetylocholino na naczynia jest obecność śródbłonka naczyniowego, który wytwarza nowy, nieznany i nietrwały przekaznik nazwany "Endothelium Derived Relaxing Factor" czyli "śródbłonkowy czynnik rozkurczający naczynia", w skrócie EDRF. EDRF jest uwalniany przez komórki śródbłonka również przez bradykininę, substancję P, ADP, trombinę (Furchgott, 1984), jonofor wapniowy A 23186, jonomycynę, estry forbolu, fosfolipazę C (De Nucci, 1988) i przez tzw. shear stress będący konsekwencją pulsującego przepływu krwi przez naczynia (Pohl i wsp., 1986; Rubanyi i wsp., 1986). EDRF o $t_{1/2} \approx 6$ sekund nie tylko rozszerza naczynia lecz również hamuje adhezję (Radomski i wsp., 1987a) i agregację płytek (Azuma i wsp., 1986; Radomski i wsp., 1987b) na drodze aktywacji rozpuszczalnej cyklazy guanylowej i wzrostu wewnątrzkomórkowego c-GMP (Rapoport & Murad, 1983; Radomski i wsp., 1987b). Zagadka chemicznej struktury EDRF została wyjaśniona przez Ignarro i wsp. (1987), którzy jako pierwsi zauważyli farmakologiczne i biochemiczne podobieństwo pomiędzy EDRF i tlenkiem azotu. Palmer i wsp. (1987) wykazali, że BK uwalnia NO z hodowanych komórek śródbłonka w ilościach wystarczających, by wytłumaczyć rozkurczowe działanie EDRF. EDRF został więc zidentyfikowany jako endogennie wytwarzany NO lub substancja blisko z nim spokrewniona jak np S-nitrozocysteina (Myers i wsp., 1990). Marletta i wsp. (1988) odkryli, że makrofagi syntetyzują azotyny (produkt utleniania NO) z L-argininy a niedługo potem wykazano, że w komórkach śródbłonka EDRF/NO jest syntetyzowany z L-argininy przez syntazę tlenku azotu - NOS, (Palmer i wsp., 1988a) oraz, że szlak przemian L-arginina/tlenek azotu występuje również w wielu innych komórkach (Ignarro, 1990).

Istnieją jednak różnice pomiędzy enzymami syntetyzującymi NO w różnych komórkach. W komórkach śródbłonkowych oraz w komórkach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, EDRF/NO syntetyzowany jest przez Ca^{++} /kalmodulino zależną NOS (tzw. konstytutywną NO syntazę, cNOS). W makrofagach, hepatocytach, fibroblastach, a także w innych typach komórek aktywność NOS można wyindukować (iNOS) przy pomocy cytokin lub lipopolisacharydów i aktywność ta nie zależy od obecności Ca^{++} (Forstermann i wsp., 1991).

Ważnym etapem w historii badań nad rolą biologiczną NO było odkrycie inhibitorów NOS (Palmer i wsp., 1988b). Zastosowanie tych związków, będących analogami L-argininy, jak np. N^{G} -monometylo-L-arginina (Palmer i wsp., 1988b) N^{G} -nitro-L-arginina (Mulsch & Busse, 1990; Ishii i wsp., 1990; Moore i wsp., 1990) czy N-iminoetylo-L-ornityna (Rees i wsp., 1990) przyniosło wiele dowodów na to, że NO odgrywa istotną rolę w układzie sercowo-naczyniowym. Podanie inhibitorów NOS powodowało zależny od śródbłonka skurcz naczyń w izolowanych układach naczyniowych (Palmer i wsp., 1988b; Rees i wsp., 1989a), a *in vivo* wywoływało znaczny wzrost ciśnienia tętniczego krwi (Rees i wsp., 1989b; Aisaka i wsp., 1989; Gardiner i wsp., 1990), i wzrost oporu naczyniowego w wielu badanych łóżyskach naczyniowych, jak np w łóżysku trzewnym, nerkowym, mózgowym i łóżysku kończyn (Gardiner i wsp., 1990), wskazując na istotną rolę fizjologiczną podstawowego, "nie stymulowanego" wydzielania NO ze śródbłonka.

Inhibitory NOS hamowały również stymulowane uwalnianie NO. Wykazano, że rozkurcze naczyń wywołane przez substancje naczyniorozszerzające o zależnym od śródbłonka mechanizmie działania jaką jest np. acetylocholina, bradykina lub substancja P są hamowane przez N^{G} -monometylo-L-argininę zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (Whittle i wsp., 1989; Rees i wsp., 1990). Vallance i wsp. jako pierwsi pokazali podstawowe i stymulowane uwalnianie NO u człowieka (Vallance i wsp., 1989a; Vallance i wsp., 1989b). W przeprowadzonych przez tych autorów pionierskich doświadczeniach u ludzi,

wlewka N^G-nitro-L-argininy do tętnicy ramiennej powodowała skurcz tej tętnicy i hamowała jej rozkurcz wywołany dotętnicznym podaniem acetylocholino.

Wyniki wyżej cytowanych prac jednoznacznie wskazują, że NO utrzymuje obniżone napięcie ścian naczyń krwionośnych i jego tworzenie przez komórki śródbłonka naczyń jest warunkiem *sine qua non* utrzymywania się prawidłowego ciśnienia krwi i prawidłowego przepływu tkankowego. Natomiast niedobór NO może leżeć u podstaw nadciśnienia (Vallance i wsp., 1992) i mieć istotne znaczenie w patofizjologii miażdżycy (Gryglewski, 1990).

Kelm i Schrader (1988) wykazali, że NO jest uwalniany przez serce świnki morskiej, a niedługo potem wielu autorów wykazało, że podstawowe, spontaniczne uwalnianie NO jest ważnym czynnikiem regulującym przepływ wieńcowy (Amezcuia i wsp., 1989; Kelm & Schrader, 1990; Pohl & Lamontagne, 1991; Lamontagne i wsp., 1992a). Ostatnio wykazano, że tylko NO, lecz nie adenozyne i nie prostanoide, bierze udział w autoregulacji ciśnienie/przepływ (Ueeda i wsp., 1992). Wciąż jeszcze nie znana jest rola tego niedawno odkrytego przekaźnika naczyniorozszerzającego w innym zjawisku autoregulacyjnym krążenia wieńcowego - reaktywnej hyperemii.

W czasie przygotowywania tej pracy doktorskiej ukazała się pierwsza publikacja w której wykazano uczestnictwo NO w reaktywnej hyperemii mięśnia sercowego wywołanej 30 i 60 sekundową okluzją przepływu wieńcowego (Kostic & Schrader, 1992). Praca ta jednak nie wyjaśniła jak istotnym jest udział NO w reaktywnym rozszerzeniu naczyń w stosunku do adenozyne lub prostanoidów, oraz czy NO bierze również udział w RH wywołanej krótszym niż 30 sekund okresem okluzji naczyń wieńcowych.

1.6 RH mięśnia sercowego wywołana bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego

Od chwili odkrycia RH w łożysku wieńcowym (Katz & Lindner, 1939) w większości badań nad sercową RH stosowano okluzję 15 sekundową i dłuższą pomimo tego, że 1-3 sekundowa (Bache i wsp., 1973; Eikens & Wilcken, 1974; Marcus i wsp., 1981; & Hess, 1986), a nawet 200-400 milisekundowa okluzja (Schwartz i wsp., 1982; Sadick i wsp., 1987; Sadick i wsp., 1989) jest wystarczająca do wywołania RH w sercu. Taka RH wywołana krótkotrwałą okluzją zasługuje na szczególną uwagę i osobny podrozdział gdyż dotychczas uważano, że bardzo krótkie niedokrwienie mięśnia sercowego nie zaburza metabolizmu tlenowego serca i jest niewystarczającym bodźcem do uwolnienia jakiegokolwiek substancji naczyniorozszerzającej. RH wywołana bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego, twierdzono, miałaby mieć podłoże miogenne a nie metaboliczne (Eikens & Wilcken, 1974; Giles & Wilcken, 1977b; Marcus i wsp., 1981). Istotnie, potwierdzono udział adenozyiny w RH wywołanej dłuższym niż 30 sekund zamknięciem przepływu wieńcowego, a udział adenozyiny w krótkotrwałej RH wydawał się mało prawdopodobny, jak to opisano w podrozdziale o adenozyinie. W ostatnich badaniach wykazano jednak, że RH wywołana zaledwie 400 milisekundową okluzją naczyń wieńcowych jest ściśle związana z aktywnością metaboliczną serca (Sadick i wsp., 1987; Sadick i wsp., 1989). W tym świetle nie można wykluczyć, że rozszerzenie naczyń występujące w RH wywołanej nawet bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego jest również związane z uwolnieniem jakiejś substancji naczyniorozszerzającej. Niestety ciągle jeszcze nie wykryto tego przekaznika.

Tlenek azotu (NO) jest małą lipofilną drobiną, która, uwalniana z komórek śródbłonkowych, z łatwością dyfunduje przez błony biologiczne i natychmiast wywiera swoje działanie naczyniorozszerzające, oraz szybko nieenzymatycznie jest unieczynniana (Ignarro, 1990). Intrygujące jest więc pytanie, czy NO odgrywa rolę w reaktywnej

hyperemii wywołanej bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego?

II. CEL PRACY

W pierwszej części pracy ześrodkowano uwagę na odczynowości naczyń wieńcowych perfundowanego serca świnki morskiej na różne substancje naczyniorozszerzające o działaniu zależnym i niezależnym od obecności śródbłonna naczyniowego oraz badano rolę tlenu azotu i prostanoidów w rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanym podaniem acetylocholino, substancji P i bradykininy. Te badania były punktem wyjścia do drugiej, zasadniczej części doświadczeń, których celem było znalezienie odpowiedzi na pytanie: czy tlenek azotu bierze udział w RH mięśnia sercowego świnki morskiej i jaki jest udział adenozyliny i prostanoidów w tym zjawisku w zależności od czasu trwania zamknięcia przepływu przez naczynia wieńcowe.

III. MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiały

W niniejszej pracy stosowano następujące odczynniki chemiczne : acetylcholina (Ach), bradykinina (Bk), substancja P (SP), adenozyzna (Ad), nitroprusydek sodu (NaNP), N^G-nitro-L-arginina (NO₂Arg), L-arginina (L-Arg), indometacyna (IND), i 8-fenyloteofilina (8-PT)- zakupione w Sigma Chemical Company (St. Luis, USA). 3 - morfolinosydnonimina (SIN-1) była syntetyzowana w GEA Ltd (Kopenhaga, Dania), iloprost w firmie Schering A.G (Berlin, Niemcy). Oba leki były darami tych firm. Nitroglicerynę (GTN, Nitronal) zakupiono w Lipha Pharmaceuticals (West Drayton, Anglia) a 11,9 metylenoksy analog PGH₂ (U 46619) w Upjohn Co. (Kalamazoo, USA). Zestawy do oznaczania stężenia cyklicznego AMP i cyklicznego GMP pochodziły z Amersham International Plc. (Buckinghamshire, U.K.)

IND rozpuszczano w 5% roztworze NaHCO₃ , NO₂Arg rozpuszczano w soli fizjologicznej w temperaturze 40°C z energicznym mieszaniem, 8-PT rozpuszczano w kilku kroplach 1N NaOH a następnie w odpowiedniej ilości soli fizjologicznej. Pozostałe odczynniki rozpuszczano w soli fizjologicznej. Roztwory wszystkich substancji przygotowywano ex tempore. W czasie doświadczeń roztwory NaNP i SIN-1 pozostawały na lodzie w ciemnych pojemnikach.

Zmodyfikowany bufor Krebsa-Henseleita (bufor K-H) miał następujący skład w mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.52, MgSO₄ 1.64, NaHCO₃ 24.88, KH₂PO₄ 1.18, glukoza 10, pirogronian sodu 2.0., i był natlenowany gazem zawierającym 5% CO₂ i 95% O₂ (karbogen) w temperaturze 37°C za pomocą wirującego dysku w aparacie Langendorffa. (Hugo Sachs Elektronik-HSE).

3.2 Metody

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono przy użyciu modelu wyosobnionego serca świnki morskiej, które perfundowano buforem Krebsa-Henseleita przy jego stałym przepływie.

Metoda izolacji serca

Świnki morskie (200-300 g) usypiano przez dootrzewnowe wstrzyknięcie soli sodowej pentobarbitalu (3-4 mg/100g wagi świnki), a następnie zabijano je przez uderzenie w głowę. Początkowo świnki przed uspieniem otrzymywały dootrzewnowo heparynę, ale gdy stwierdzono, że nie jest to konieczne (czas protrombinowy krwi świnki morskiej wynosi około 30 sekund i jest ok. trzy razy dłuższy niż u innych zwierząt laboratoryjnych), zaniechano tego postępowania. Natychmiast po zabiciu świnki otwierano jamę brzuszną i klatkę piersiową, odsłaniano serce i wycinano je. Następnie serce umieszczano w zimnej soli fizjologicznej (4°C), wypreparowywano aortę wstępującą i zawieszano je w aparacie Langendorffa (HSE). Po 60 sekundach od chwili otwarcia klatki piersiowej serce było perfundowane zmodyfikowanym płynem Krebsa-Henseleita wstecznie przez aortę (metoda Langendorffa). Perfundowane serce dokładnie oczyszczano z przylegających tkanek, delikatnie, tak by nie uszkodzić mięśnia sercowego, nacinano i usuwano osierdzie, a następnie przecinano opuszkę tętnicy płucnej w celu ułatwienia odpływu z zatoki wieńcowej serca. Ujście żył płucnych do lewego przedsionka poszerzano i przez ten otwór, niszcząc zastawkę mitralną, w lewej komorze umieszczano lateksowy balon. Pozycję balonu w lewej komorze utrwalano przez założenie odpowiedniego szwu chirurgicznego. Następnie wypełniano balon tak by ciśnienie płynu w balonie (tym samym ciśnienie rozkurczowe lewej komory) nie przekraczało 10 mmHg. Serce stymulowano z częstotliwością 273/min (4 Hz) za pomocą połączonej ze stymulatorem P (HSE)

współśrodkowej elektrody. Elektrode umieszczano na powierzchni prawego przedsionka serca w pobliżu węzła zatokowego. Do stymulacji serca stosowano falę prostokątną o amplitudzie bodźca około 10V (była to minimalna wartość potrzebna do przytłumienia rytmu własnego serca) i czasie trwania pojedynczego impulsu 5 milisekund.

Opis aparatu Langendorffa

Aparat Langendorffa służący do perfuzji izolowanego serca (Hugo Sachs Elektronik, HSE) przedstawiono na rycinie 1.

Mikropompa (precision micro gear pump MP-11) wtaczała bufor K-H do oksygenatora na wirujący dysk, który rozpryskiwał go na ścianki oksygenatora. Wnętrze szczelnie zamkniętego oksygenatora wypełniał karbogen, którego ujście z komory oksygenatora było możliwe tylko po pokonaniu słupa cieczy o zadanej wysokości (zastawka Gotlieba). Ten prosty układ zapewniał stałe ciśnienie gazu wewnątrz oksygenatora i jednolite natlenowanie buforu K-H. Rozpryskiwany przez wirujący dysk bufor K-H tworzył cienką, warstwę płynu która wolno splaywała po ściankach oksygenatora. W ten sposób w buforze, który perfundował serce panowało parcjalne ciśnienie tlenu rzędu 600 - 700 mmHg, podczas gdy w nienatlenowanym buforze wynosi ono około 150 mmHg (Döring & Dehnert, 1988). Pompa perystaltyczna tłoczyła natlenowany bufor K-H z dna oksygenatora do aorty skąd przy zamkniętych zastawkach półksiężycowatych płyn dostawał się do naczyń wieńcowych. Stały poziom płynu w oksygenatorze zapewniał układ elektroniczny (LLC, HSE), który uruchamiał mikropompę i wirujący dysk, gdy poziom buforu w oksygenatorze spadał poniżej krytycznej wartości. Izolowane serce za pomocą tego aparatu może być perfundowane pod stałym ciśnieniem (na które składa się stałe ciśnienie gazu w oksygenatorze i stałe ciśnienie hydrostatyczne cieczy nad aortą), lub też przy stałym przepływie utrzymywanym przy pomocy pompy perystaltycznej (MS-4 Reglo). Perfuzję pod stałym ciśnieniem wykorzystywano tylko do początkowej stabilizacji izolowanego

serca (patrz protokół doświadczeń), a poza tym w doświadczeniach stosowano perfuzję przy stałym przepływie. Stała temperatura (37°C) w komorze, która mieściła izolowane serce była utrzymywana przez termostat.

Rejestracja czynności izolowanego serca

Wieńcowe ciśnienie perfuzyjne (CPP)

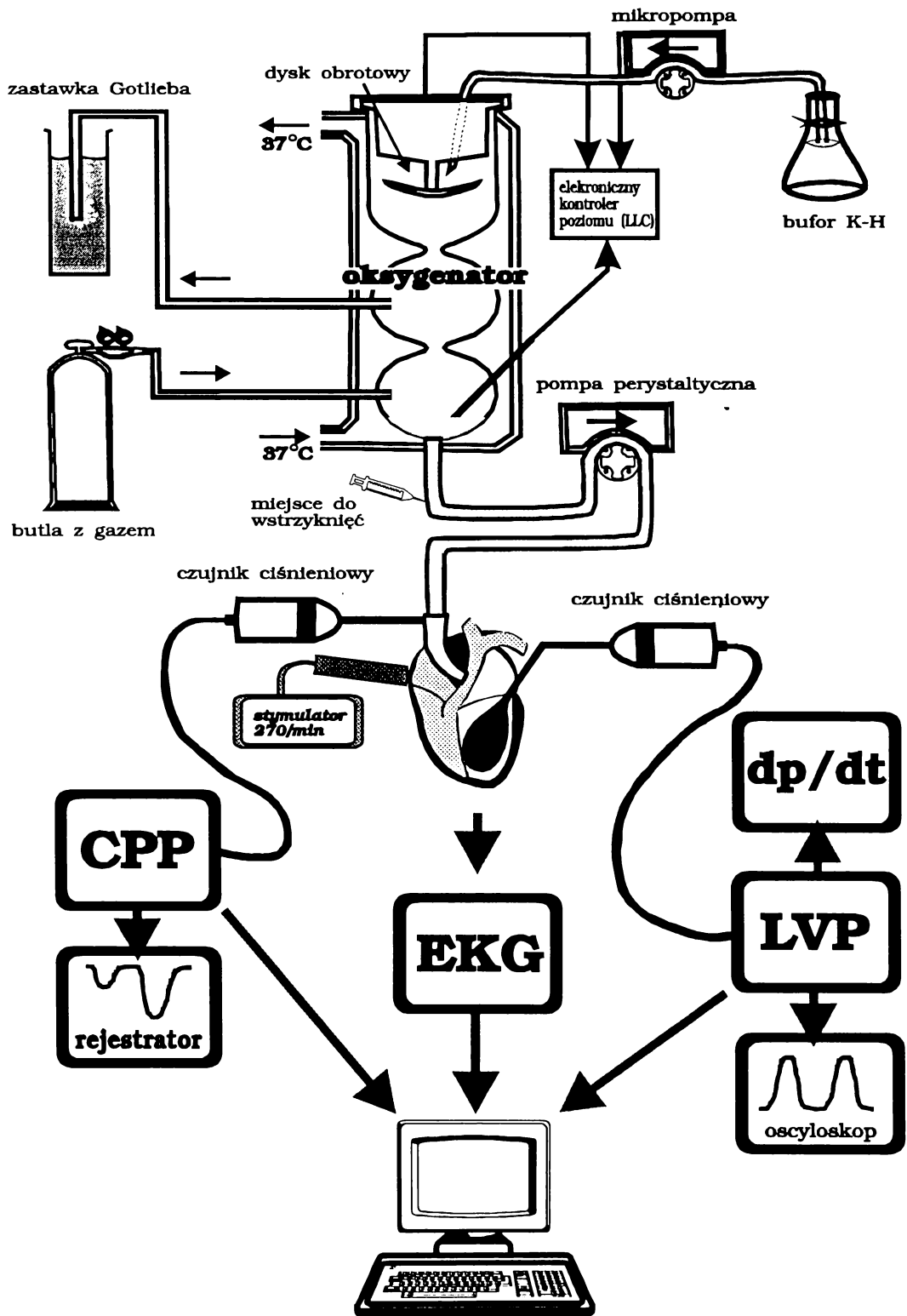
CPP było mierzone za pomocą czujnika ciśnieniowego (Izotec HSE) połączonego z układem perfuzyjnym tuż nad kaniulą aortalną. Zmiany wieńcowego ciśnienia perfuzyjnego (CPP) odzwierciedlały zmiany napięcia naczyniowego w krążeniu wieńcowym i były rejestrowane w sposób ciągły przy użyciu rejestratora (TZ 4620).

Ciśnienie w lewej komorze (LVP)

Umieszczony w lewej komorze balon (o pojemności 0.06 ml) połączony był z drugim czujnikiem ciśnieniowym (Izotec HSE), dzięki któremu rejestrowano pracę lewej komory. Zapis ciśnienia wewnątrzkomorowego (LVP) był w sposób ciągły wyświetlany na ekranie oscyloskopu. Za pomocą specjalnego przetwornika (DIF module for PLUGSYS, HSE) monitorowano parametry kurczliwości mięśnia sercowego takie jak: dp/dt , dp/dt_{max} , dp/dt_{min} i w razie potrzeby zapisywano je równoległe do zapisu CPP przy użyciu rejestratora (TZ 4620).

Elektrokardiogram

Minielektrody połączone ze wzmacniaczem (Cardiotachometr, TEMED) były używane do rejestrowania elektrokardiogramu serca świnki morskiej. Elektrody umieszczano na powierzchni mięśnia sercowego; jedna w okolicy koniuszka serca, druga na powierzchni lewej komory poniżej uszka prawego. Sygnał EKG był wyświetlany na



Ryc.1 Schemat aparatu Langendorffa.

Wyosobnione serce świnki morskiej perfundowane było wstecznie przez aortę buforem K-H (37°C) przy stałym jego przepływie. Za pomocą czujników ciśnieniowych rejestrowane były : wieńcowe ciśnienie perfuzyjne (CPP) i ciśnienie w lewej komorze (LVP), a EKG rejestrowane było bezpośrednio z powierzchni mięśnia sercowego. Zbierane w czasie doświadczenia dane (CPP, LVP, dp/dt, EKG) zapisywane były na twardym dysku komputera. Dokładny opis aparatu Langendorffa znajduje się w tekście.

ekranu oscyloskopu i w razie potrzeby zapisywany przy użyciu rejestratora o szybkim przesuwie papieru.

Początkowo stosowano minielektrody przyssawkowe połączone z minipompą próżniową (HSE). Uniesiony odcinek ST wynikający z miejscowego niedotlenienia mięśnia sercowego w miejscu przyssania elektrod, elektrokardiogram odbiegający od prawidłowego obrazu EKG i utrudniona interpretacja zmian EKG w czasie niedotlenienia sprawiły, że ostatecznie do rejestracji EKG stosowano delikatnie wbijane w mięsień sercowy, elektrody igłowe.

Komputerowe zbieranie i opracowanie danych

W końcowej fazie doświadczeń korzystano z programu komputerowego służącego do gromadzenia, opracowywania, przechowywania i prezentacji wyników doświadczeń przeprowadzanych na izolowanym sercu (program PSC wykonany przez Z.Martyniuka z Przedsiębiorstwa Elektroniki Profesjonalnej - IGEL, Zabrze). Dane z doświadczeń za pomocą karty sprzęgu, umieszczonej w panelu PLUGSYS (zestaw wzmacniaczy aparatu Langendorffa, HSE), przekazywane były przez przetwornik analogowo-cyfrowy do komputera. Zbierane w czasie doświadczeń dane dotyczące CPP, LVP, dp/dt max, dp/dt min, oraz w razie potrzeby EKG, były równocześnie wyświetlane na ekranie komputera i zapisywane na twardym dysku. Po zakończeniu eksperymentu dane te były przeglądane na ekranie komputera w postaci krzywych. Zaobserwowane w czasie doświadczenia zmiany CPP (zarówno spadek CPP jak i powierzchnia zapisu rozkurczu naczyń wieńcowych, patrz niżej) oraz pożądane wartości charakteryzujące czynność serca były obliczane przy użyciu programu PSC w dowolnych odcinkach czasowych. Odpowiednie fragmenty oryginalnych zapisów któregośkolwiek z wyżej wymienionych parametrów drukowano za pomocą programu graficznego.

Protokół doświadczeń

Po umieszczeniu serca w aparacie Langendorffa perfundowano je przez 15 minut pod stałym ciśnieniem (ok 55 mmHg). W czasie tego okresu stabilizacyjnego kilkakrotnie mierzono przepływ wieńcowy za pomocą kalibrowanych cylinerków. Następnie perfundowano serce przy stałym przepływie przy użyciu pompy perystaltycznej o niepulsującym przepływie (MS-4 Reglo, rys.1). Początkowo pompę ustawiano na taki przepływ jaki zaobserwowano w warunkach stałego ciśnienia (zwykle w granicach 4-8 ml/min), a następnie stopniowo go powiększano tak, by otrzymać początkowe CPP w granicach 60-70 mmHg. Doświadczenia przeprowadzano tylko na sercach spełniających niżej przedstawione warunki:

- 1/ początkowe wieńcowe ciśnienie perfuzyjne było wyższe niż 55 mmHg
- 2/ jednorazowe wstrzyknięcie NaNP (3 nmole) powodowało spadek CPP większy niż 20 mmHg
- 3/ zamknięcie przepływu wieńcowego na 3 sekundy wywoływało reaktywne rozszerzenie naczyń

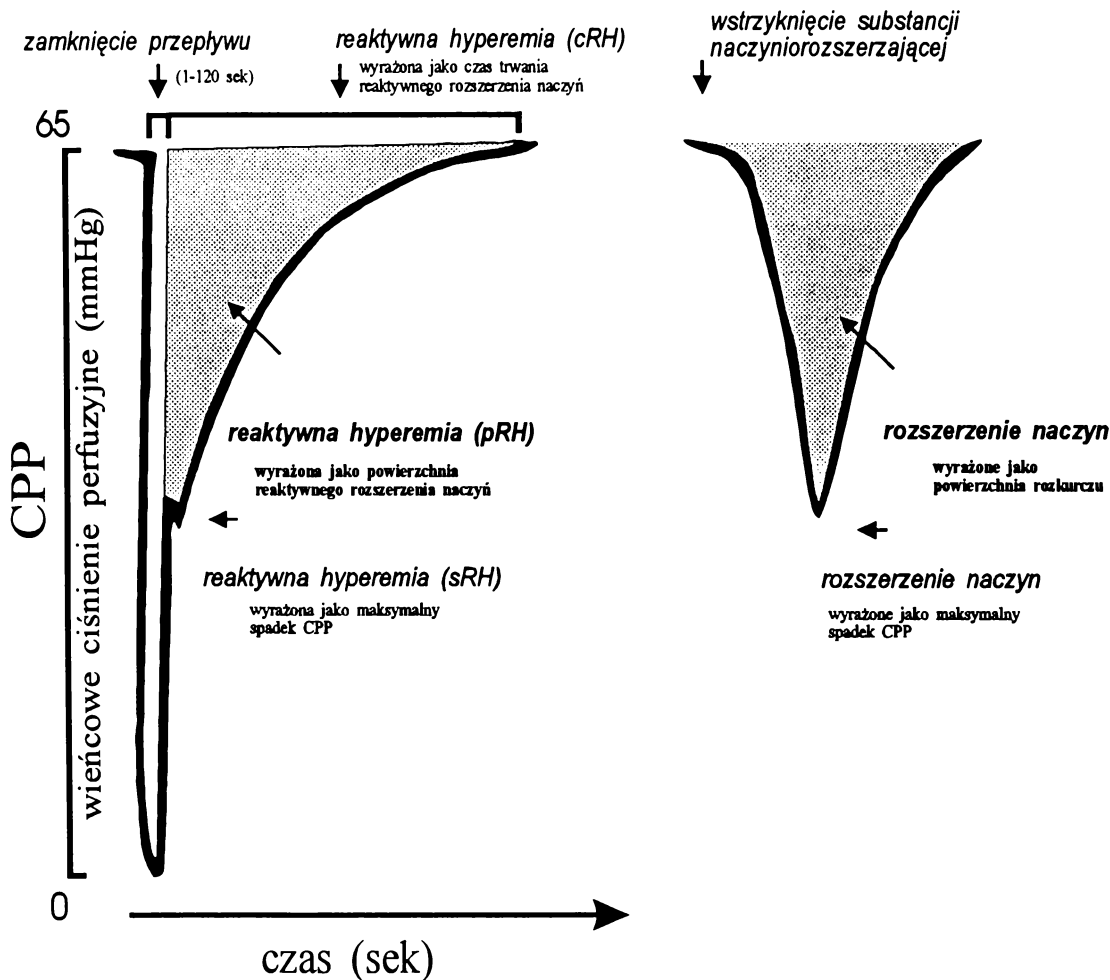
Te same testy badające odczynowość mięśniówki (pkt. 2) i odczynowość śródbłonka naczyń (pkt. 3) wykonywano pod koniec doświadczenia. Stwierdzono, że reaktywność naczyń wieńcowych w izolowanym sercu utrzymuje się niezmienną przez 3 godziny od rozpoczęcia eksperymentu. Żadne doświadczenie nie trwało dłużej niż 3 godziny.

Jednorazowe wstrzyknięcia badanych związków podawano do płynu perfundującego powyżej kaniuli aortalnej (patrz rys 1). Czas dotarcia wstrzykniętej substancji do krążenia wieńcowego był zmienny ze względu na różny przepływ wieńcowy w kolejnych doświadczeniach, ale nigdy nie był dłuższy niż 30 sekund. Inhibitory używane w doświadczeniach były dodawane do butli zawierającej bufor H-K (np. indometacyna), albo też podawane we wlewie (0.1 ml/min) do płynu perfuzyjnego za pomocą pompy MEDIPAN (np. N^G-nitro-L-arginina, 8-fenylteofilina). Wszystkie stosowane w

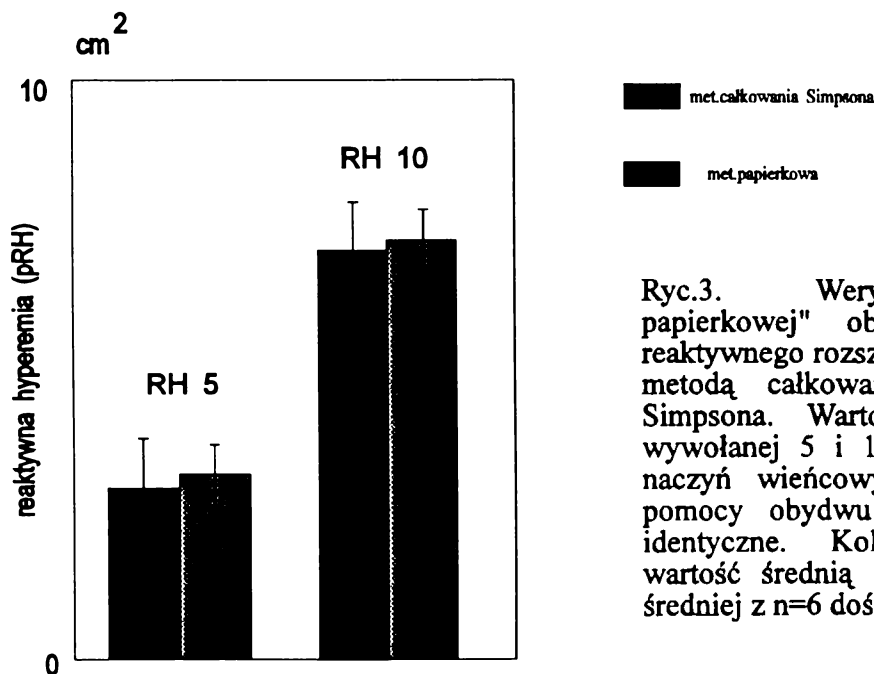
doświadczeniach inhibitory perfundowano przez serce co najmniej przez 10 minut zanim badano ich wpływ na odpowiedzi naczyniorozszerzające.

Metoda wywoływania reaktywnej hyperemii (RH) i jej pomiaru

Reaktywną hyperemię wywoływano przez zamknięcie przepływu wieńcowego na okres od 1 sekundy do 2 minut. Natychmiast po zamknięciu przepływu CPP gwałtownie obniżało się, a po powtórny otwarciu przepływu CPP, powoli wracało do wartości kontrolnych. Ten powolny powrót CPP jest spowodowany reaktywnym rozszerzeniem naczyń wieńcowych czyli reaktywną hyperemią (ryc.2). Mierzono maksymalny spadek CPP w czasie RH (sRH), czas trwania RH (cRH), ale przede wszystkim powierzchnię reaktywnej hyperemii (pRH), która okazała się najlepiej odzwierciedlać wielkość rozkurczu naczyń wieńcowych w czasie RH (ryc.2). Powierzchnię pRH mierzono metodą "papierkową". Wycinano w kalce kształt powierzchni rozkurczu i ważono ją za pomocą precyzyjnej wagi (Sartorius), poczym nasilenie rozkurczu wyrażano w cm^2 (waga 1 cm^2 kalki była znana). W celu sprawdzenia dokładności metody "papierkowej" powierzchnię tę obliczano również metodą całkowania numerycznego Simpsona stosując program komputerowy "Całka" (wykonany przez panią Z.Stanuch z Instytutu Informatyki A.M.). Wyniki otrzymane przez obie metody były niemal identyczne (ryc 3.). Większość obliczeń wykonywano więc prostszą metodę "papierkową". W końcowej fazie doświadczeń obliczeń powierzchni dokonywano przy użyciu programu komputerowego PSC (patrz wyżej), a wyniki uzyskane tą metodą nie różniły się od wyników uzyskanych przy użyciu wcześniej stosowanych metod.



Ryc.2 Schemat pomiaru rozkurczu naczyń wieńcowych. Reaktywną hyperemię (RH) mierzono jako powierzchnię reaktywnego rozszerzenia naczyń (pRH), która lepiej odzwierciedlała nasilenie RH niż czas trwania RH (cRH) czy maksymalny spadek CPP w czasie RH (sRH). Podobnie rozszerzenie naczyń wieńcowych wywołane wstrzyknięciem substancji naczyniorozszerzającej mierzono jako powierzchnię rozkurczu, a nie tylko jako spadek CPP.



Ryc.3. Weryfikacja "metody papierkowej" obliczania powierzchni reaktywnego rozszerzenia naczyń (pRH) metodą całkowania numerycznego wg Simpsona. Wartości pRH (dla RH wywołanej 5 i 10 sekundową okluzją naczyń wieńcowych) otrzymane przy pomocy obydwu metod były niemal identyczne. Kolumny przedstawiają wartość średnią \pm błąd standardowy średniej z n=6 doświadczeń.

Metody pomiaru efektu działania substancji naczyniorozszerzających

Efekt naczyniorozszerzający wszystkich badanych substancji mierzono jako wywołany przez nie spadek ciśnienia perfuzyjnego (w mmHg), lub wyrażano jako powierzchnię wywołanego rozkurczu przy użyciu metody opisanej powyżej (ryc.2)

Oznaczanie uwalniania cyklicznych nukleotydów przez serce

Fracje buforu K-H wypływającego z serca zbierano w warunkach kontrolnych i w 1,2,3,5,10,15 i 20-tej minucie (przez 30 sekund) po stymulacji iloprostem lub bradykininą oraz w 1,2,3,5 i 10-tej minucie trwania reaktywnej hiperemii. Procedurę taką ustalono na podstawie zaobserwowanej we wstępnych oznaczeniach kinetyki uwalniania cyklicznych nukleotydów przez serce. Próbkę przechowywano w temperaturze -20 °C aż do oznaczeń metodą radioimmunologiczną. Stężenia cyklicznego AMP i cyklicznego GMP oznaczano za pomocą gotowych zestawów zawierających znakowany ^{125}I -cGMP lub ^{125}I -cAMP według metody opisanej przez Steinera i wsp. (1972). Poziom podstawowy cGMP uwalnianego przez serce był około 10 razy niższy, niż poziom podstawowy cAMP. Dlatego, by zwiększyć czułość oznaczeń cGMP, te próbki były acetylowane przez dodanie mieszaniny bezwodnika kwasu octowego i trójetanolaminy (w stosunku objętościowym 1:2). Dla oznaczeń cAMP acetylacji nie wykonywano. Ilość cAMP i cGMP mierzono bezpośrednio, w próbkach nierozcieńczonych i wyrażano je w pmołach/min. Radioaktywność związaną w osadzie mierzono za pomocą licznika promieni gamma (Beckman). Wszystkie oznaczenia wykonywano w duplikatach.

Analiza statystyczna

Dane z doświadczeń przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm błąd

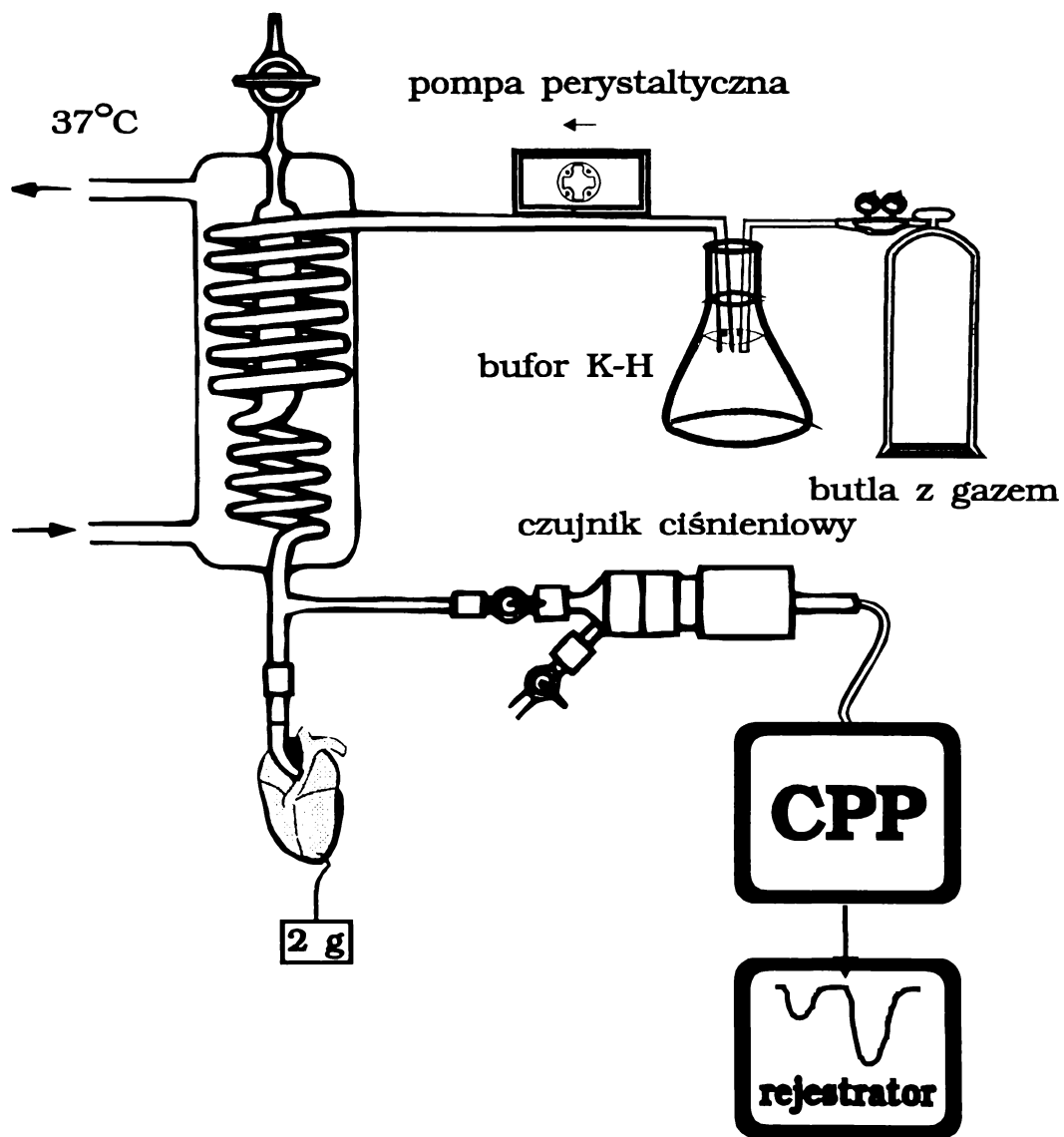
standardowy średniej. Znamienność różnic statystycznych wykazywano za pomocą testu t-Studenta dla zmiennych niesparowanych przyjmując za różnice znamienne statystycznie te dla których $p < 0.05$.

Addendum

Na rys 4 schematycznie przedstawiono układ przy pomocy którego przeprowadzono pierwsze doświadczenia na izolowanych sercach. Wyników tych doświadczeń nie włączono do pracy. Ograniczę się tutaj tylko do kilku uwag o niedoskonałościach tego pierwotnego układu, aby dodatkowo naświetlić zalety aparatu Langendorffa/HSE.

Zamiast wirującego dysku, który zapewnia stosunkowo wysoki stopień natlenowania buforu K-H w aparacie Langendorffa HSE, stosowano tradycyjną metodę "bąblowania" buforu gazem. Lewa komora pracowała w warunkach dalekich od fizjologicznych. By uzyskać napięcie wstępne mięśnia sercowego obciążano je 2 gramowym ciężarkiem zawieszonym na wbitym w okolicę koniuszka serca haczyku. Lewa komora była pusta, nie zawierała balonu, i w czasie doświadczenia stopniowo (przez żyły Thebesiusza) wypełniała się płynem perfuzyjnym co znacznie utrudniało pracę serca i uniemożliwiało przeprowadzenie eksperymentu przez dłuższy okres czasu. Aby temu zapobiec, konieczne było nacięcie lewej komory. Ponadto serce nie było stymulowane i biło własnym rytmem, zdarzały się więc niemiarowości utrudniające przeprowadzenie doświadczenia.

Najważniejszym jest jednak fakt, że w pierwotnym układzie wrażliwość naczyń wieńcowych na substancje naczyniorozszerzające była wielokrotnie niższa niż w aparacie Langendorffa/HSE, w związku z czym nie było technicznie możliwym oznaczenie reaktywnej hyperemii wykrywalnej w aparacie Langendorffa/HSE nawet po sekundowych okresach okluzji przepływu wieńcowego.



Ryc.4. Schemat układu izolowanego serca, który stosowano w pierwszych doświadczeniach. Opis znajduje się w tekście (Addendum).

IV. WYNIKI

4.1 Pomiary wartości wyjściowych

Wieńcowe ciśnienie perfuzyjne (CCP)

Znane jest zjawisko zmiennej odczynowości naczyń krwionośnych w zależności od ich wyjściowego napięcia. Dlatego przeprowadzono wstępne doświadczenia, które miały na celu ustalenie wysokości wyjściowego CPP, optymalnego dla przeprowadzenia planowanych badań na izolowanym sercu świnki morskiej, perfundowanym płynem odżywczym o stałym przepływie. Przy niskim wyjściowym CPP (55 mmHg) odczynowość naczyń była słaba i maksymalny spadek CPP wywołany pojedynczym wstrzyknięciem NaNP (10 nmol) wynosił tylko 40 % wyjściowego CPP (ryc.1, tabela I). Przy wysokim wyjściowym CPP (75 mmHg) odczynowość naczyń w stosunku do wzrastających dawek NaNP była znakomita (ryc.1, tabela I), jednakże w miarę trwania doświadczenia pojawiał się obrzęk serca, i następowało upośledzenie odpowiedzi rozkurczowych na NaNP związane również z ryzykiem uszkodzenia zastawek półksiężycowatych aorty (Döring & Dehnert, 1988). Dlatego wybrano pośrednią wartość wyjściowego CPP (ryc.1, tabela I) i we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach (n=120) wyjściowe CPP zawierało się w granicach 60-70 mmHg (patrz rozdział Materiały i Metody), tj wynosiło 65.2 ± 0.5 mmHg (n=45).

Tabela I. Porównanie odpowiedzi na nitroprusydek sodu (NaNP) przy różnych wyjściowych wartościach CPP

wyjściowe CPP (mmHg)	dawka NaNP (nmol)	spadek CPP (mmHg)	spadek CPP (% wyjściowego CPP)
55	10	22.4 ± 0.8	40 ± 1.4
68	10	37.8 ± 0.9	55 ± 1.3
75	10	47.0 ± 1.6	62 ± 2.1

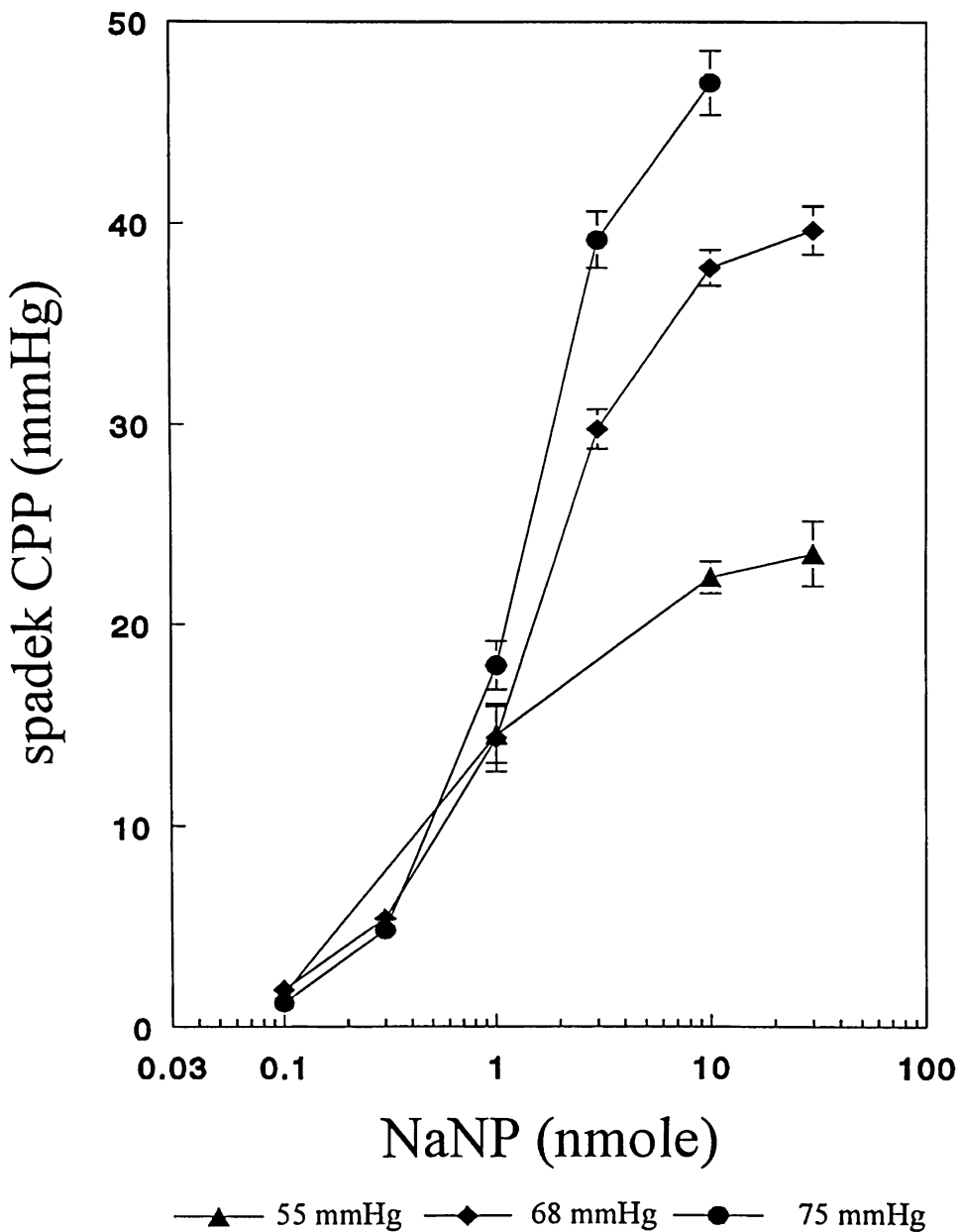
W tabeli I przedstawiono wartości średnie i błąd standardowy średniej z n=3 doświadczeń

Ciśnienie lewokomorowe (LVP)

Wyjściowe ciśnienie późnorozkurczowe lewej komory nie przekraczało 10 mmHg (patrz rozdz. Materiały i Metody) a ciśnienie skurczowe lewej komory wynosiło 102 ± 4 mmHg (n=42). Na ryc.2 przedstawiono typowy zapis ciśnienia lewokomorowego izolowanego serca świnki morskiej.

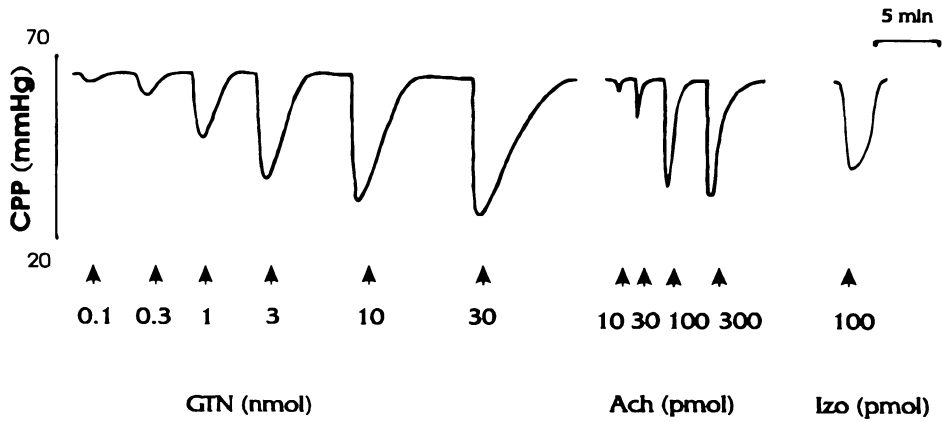
Pierwsza pochodna ciśnienia lewokomorowego (dp/dt)

Kurczliwość mięśnia sercowego wyrażano za pomocą pierwszej pochodnej ciśnienia w lewej komorze dp/dt, której wartość maksymalna wynosiła 924 ± 53 mmHg/sek (n=25). Na ryc.2 przedstawiono typowy zapis dp/dt rejestrowany równolegle do zmian CPP.

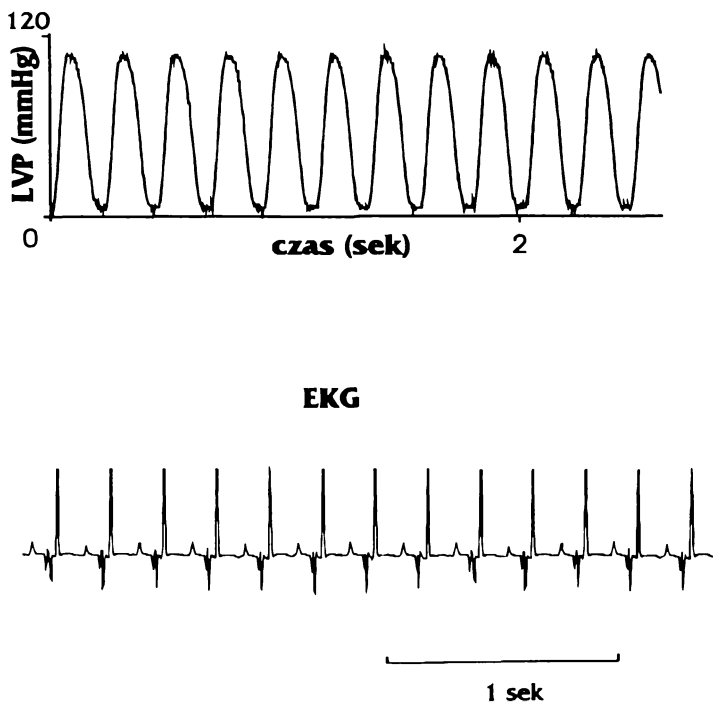


Ryc.1 Wpływ wyjściowego ciśnienia wieńcowego na naczyniorozszerzające działanie NaNP (0.1-30 nmoli). Reaktywność naczyń wieńcowych w stosunku do wzrastających dawek NaNP rosła wraz ze wzrostem CPP. Do dalszych doświadczeń wybrano pośrednią wartość wyjściowego CPP (objaśnienie znajduje się w tekście). Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=3 doświadczenia.

Ryc.2A



Ryc.2B



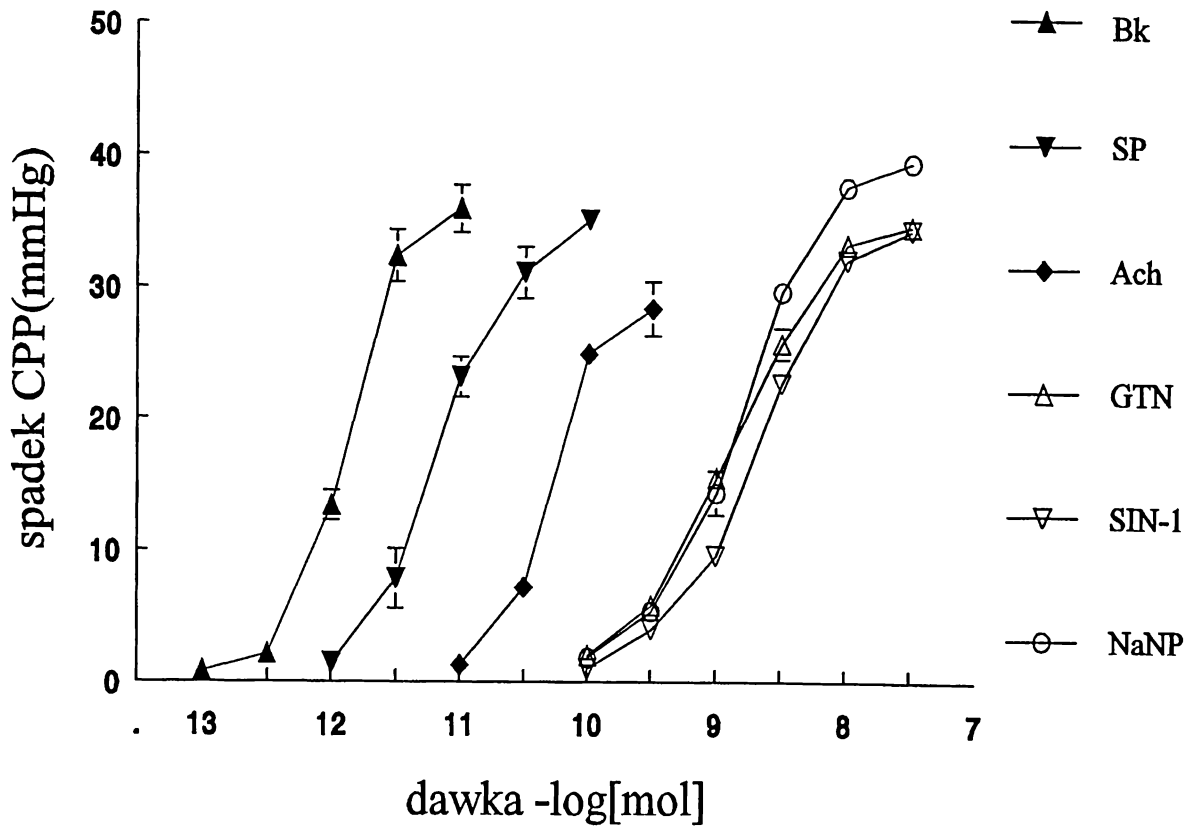
Ryc.2 Zapisy CPP, dp/dt, LVP i EKG izolowanego serca świnki morskiej. 2A\ Zapisy CPP przedstawiają rozkurcze naczyń wieńcowych wywołane przez nitroglicerynę (GTN, 0.1-30 nmoli) acetylocholinę (Ach, 10-300 pmoli) i izoprenalinę (Izo, 100pmoli). GTN i Ach nie wpływały na dp/dt w przeciwieństwie do izoprenaliny, która działała naczyniorozszerzająco i inotropowo dodatnio. 2B\ Typowe zapisy LVP i EKG.

Elektrokardiogram

Zapis elektrokardiogramu rejestrowanego bezpośrednio z powierzchni mięśnia sercowego bijącego z częstością 273/min (patrz rozdz. Materiały i Metody) umieszczono na ryc.2. Widoczny w zapisie odwrócony, szpiczasty załamek znajdujący się przed zespołem QRS pochodził od impulsu stymulacji przedsionka. Załamek P, w stymulowanym elektrycznie sercu, zwykle był niewidoczny co najprawdopodobniej wynikało z niewielkiej jego amplitudy i z wysokiego prądu stymulacji przedsionka (10-20V). W niektórych doświadczeniach, przy korzystnym ustawieniu elektrody stymulującej, obserwowano jednak niewielki załamek P. Natomiast czytelny był zawsze jednokierunkowy z załamkiem R załamek T, i poziomy odcinek S-T.

4.2 Rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany przez substancje naczyniorozszerzające o działaniu zależnym i niezależnym od obecności śródbłonna w naczyniach.

Leki działające bezpośrednio na mięśnie gładkie naczyń takie jak nitrogliceryna (GTN), 3-morfolinosydnonimina (SIN-1), nitroprusydek sodu (NaNP) wszystkie w dawkach 0.1-30 nmoli oraz leki naczyniorozszerzające, które uwalniają EDRF(NO) ze śródbłonna, jak np. acetylocholina (Ach, 10-300 pmoli), bradykinina (Bk, 0.1-10 pmoli) i substancja P (SP, 1-100 pmoli), podawane jako pojedyncze wstrzyknięcia, wywoływały dawko-zależny rozkurcz naczyń wieńcowych wyrażający się spadkiem CPP (ryc.2, ryc.3). W przeciwieństwie do izoprenaliny (100 pmoli), działającej naczyniorozszerzająco oraz inotropowo dodatnio, żadna z powyższych substancji naczyniorozszerzających nie wpływała ani na ciśnienie lewokomorowe (LVP) ani na kurczliwość mięśnia sercowego (dp/dt). Jedynie acetylocholina w dawkach ≥ 600 pmoli, czyli w dawkach wyższych niż maksymalna dawka naczyniorozszerzająca, działała inotropowo i chronotropowo ujemne.



Ryc.3 Krzywe przedstawiające dawko-zależny spadek CPP wywołany przez substancje naczyniorozszerzające o działaniu zależnym (Ach, SP, Bk) i niezależnym od obecności śródbłonna w naczyniach (GTN, SIN-1, NaNP). Siła działania badanych substancji naczyniorozszerzających była zróżnicowana $Bk > SP > Ach > NaNP > GTN = SIN-1$. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla $n=3-5$ doświadczeń.

Porównanie skuteczności substancji naczyniorozszerzających o śródbłonkowo-zależnym i śródbłonkowo-niezależnym mechanizmie działania

Z ryciny 3 można odczytać, że substancje naczyniorozszerzające o mechanizmie działania zależnym od śródbłonka (Ach, Bk, SP) wywoływały rozkurcz naczyń wieńcowych w dawkach o jeden do trzech rzędów wielkości niższych niż substancje naczyniorozszerzające, działające bezpośrednio na mięśnie gładkie naczyń wieńcowych (GTN, SIN-1, NaNP). Siła działania naczyniorozkurczowego substancji o mechanizmie działania zależnym od śródbłonka była zróżnicowana (Bk > SP > Ach). Bk wykazywała aktywność już w progowej dawce 100 fmoli. Maksymalny spadek CPP dla większości badanych substancji wynosił około 35 mmHg. Jedynie w przypadku Ach był nieco niższy (28.48 ± 2 mmHg, n=5), a w przypadku NaNP wyższy (38.7 ± 0.3 mmHg, n=5) (tabela II). Natomiast siła działania substancji naczyniorozszerzających o mechanizmie działania niezależnym od śródbłonka była zbliżona (GTN = SIN-1 < NaNP) (tabela II)

Tabela II. Maksymalny spadek wieńcowego ciśnienia perfuzyjnego (CPP) wywołany przez zależne i niezależne od śródbłonka substancje naczyniorozszerzające.

substancja naczyniorozszerzająca	dawka	maksymalny spadek CPP (mmHg)
acetylocholina	300 pmol	28.5 ± 2.0
substancja P	100 pmol	35.2 ± 0.7
bradykinina	10 pmol	36.0 ± 1.8
nitrogliceryna	30 nmol	34.8 ± 0.8
3-morfolinosydonimina	30 nmol	34.5 ± 0.3
nitroprusydek sodu	30 nmol	38.7 ± 0.3

W tabeli II przedstawiono wartości średnie i błąd standardowy średniej dla n=4-5 doświadczeń

Tachyfilaksja na nitroglicerynę

Podając w krótkich odstępach czasu GTN zaobserwowano zjawisko tachyfilaksji w odpowiedziach CPP (ryc 4). Zjawisko to dotyczyło wyłącznie GTN spośród przebadanych sześciu leków naczyniorozszerzających (tabela II).

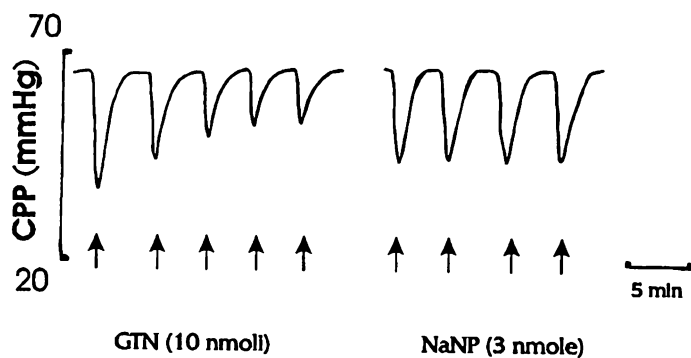
4.3 Badania nad udziałem prostanoidów i tlenku azotu w odczynach perfundowanego serca na Bk, SP, Ach

Zahamowanie cyklooksygenazy

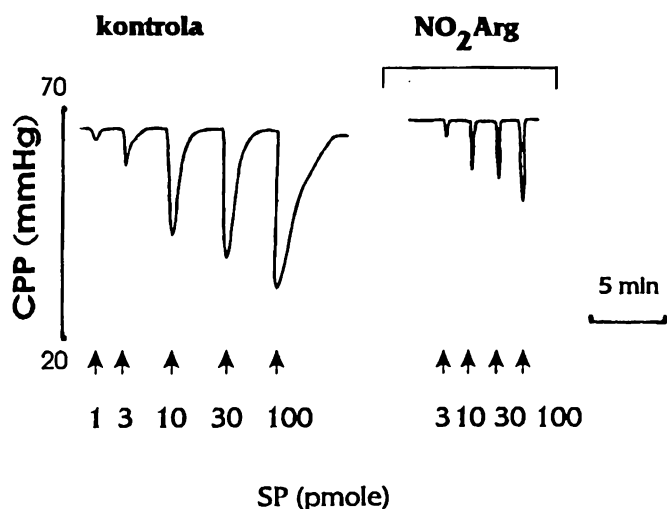
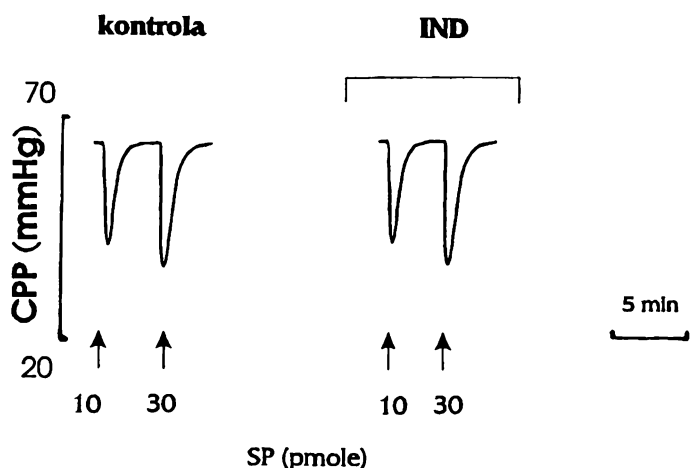
Obecność w buforze K-H inhibitora cyklooksygenazy, indometacyny ($5 \mu\text{M}$) powodowała nieznaczny wzrost CPP o $3.7 \pm 0.36 \text{ mmHg}$, $n=7$, pozostając bez wpływu na ciśnienie lewokomorowe (LVP), i na kurczliwość mięśnia sercowego (dp/dt). W obecności indometacyny odpowiedzi naczyniorozszerzające na Ach, SP i Bk były niezmiennione (ryc.5).

Zahamowanie NO syntazy

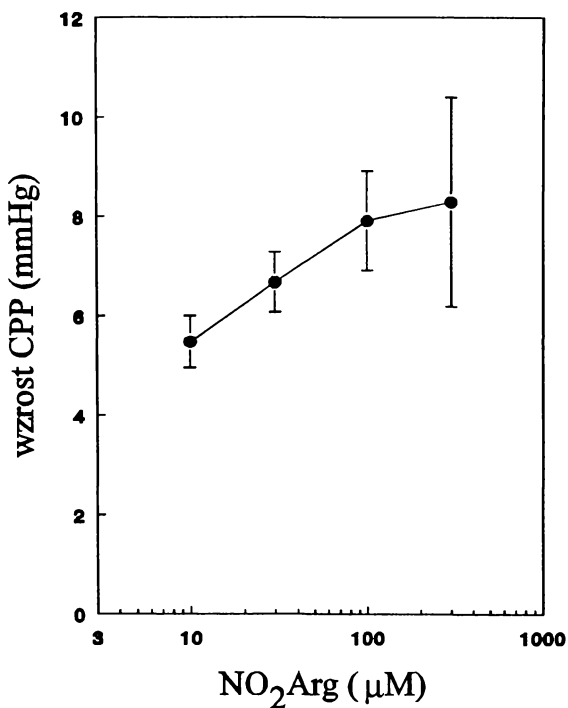
Wlew inhibitora NO syntazy, N^G-nitro-L-argininy (NO_2Arg) w stężeniu $10\text{-}300 \mu\text{M}$ wywoływał zależny od stężenia wzrost CPP, przy czym przy stężeniu $300 \mu\text{M}$ wzrost ten (o $8.1 \pm 0.5 \text{ mmHg}$, $n=4$) nie był znamienne większy od tego, który występował przy stężeniu $100 \mu\text{M}$ (o $7.9 \pm 1 \text{ mmHg}$, $n=8$) (ryc.6). W niektórych doświadczeniach NO_2Arg w stężeniu $300 \mu\text{M}$ powodowała początkowy rozkurcz naczyń, zanim nastąpił wzrost CPP oraz wywoływała oscylacyjny, niestabilny zapis CPP. Dlatego w dalszych badaniach stosowano NO_2Arg w stężeniu $100 \mu\text{M}$. Wydaje się, że takie stężenie NO_2Arg maksymalnie hamuje produkcję tlenku azotu w sercu, a przy tym nie wpływa na dp/dt i



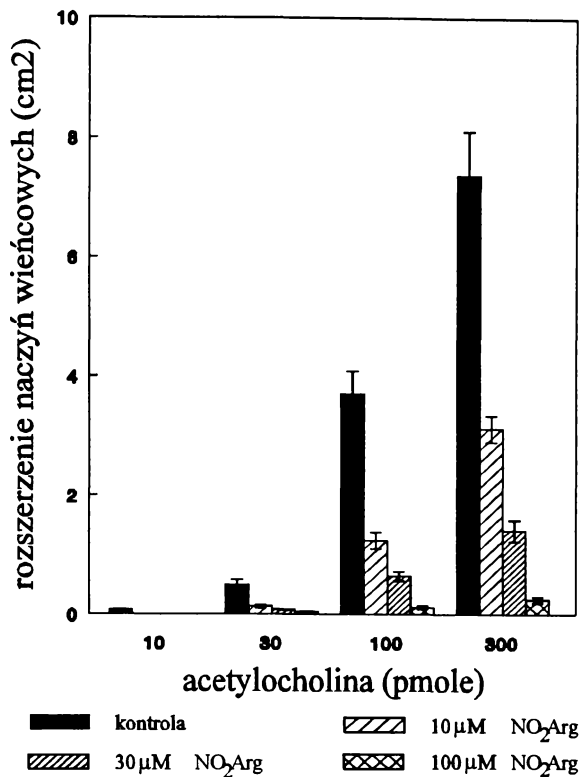
Ryc.4 Zapis przedstawiający tachyfilaksję na naczyniorozszerzające działanie nitrogliceryny (GTN). W przeciwieństwie do GTN, przy podawaniu kolejnych pojedynczych wstrzyknięć nitroprusydku sodu (NaNP) zjawiska tachyfilaksji nie obserwowano.



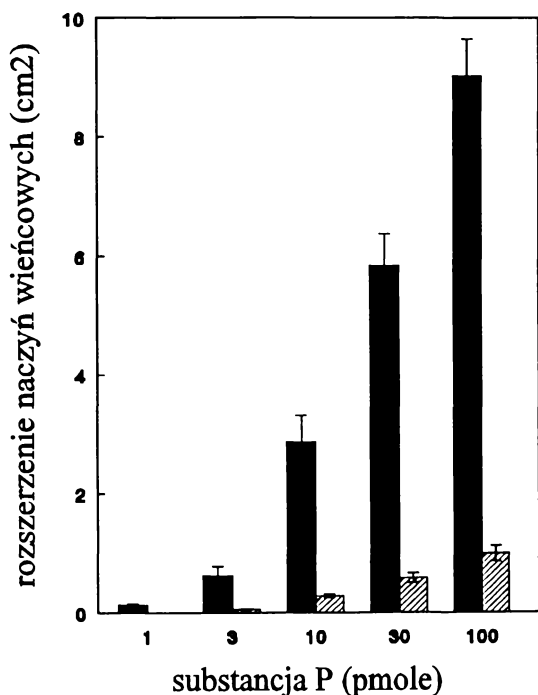
Ryc.5 Typowe zapisy CPP przedstawiające udział NO i prostanoidów w rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanym przez substancje naczyniorozszerzające o działaniu zależnym od obecności śródbłonna naczyń. NO_2Arg ($100\mu\text{M}$) hamowała rozkurcze naczyń wywołane przez SP, podczas gdy indometacyna ($5\mu\text{M}$) pozostawała bez wpływu na te odpowiedzi. Identyczne wyniki uzyskano w 4-5 doświadczeniach. Rozkurcze naczyń wieńcowych wywołane przez Ach czy Bk podobnie nie były hamowane przez indometacynę ($n=4$), natomiast były hamowane przez NO_2Arg .



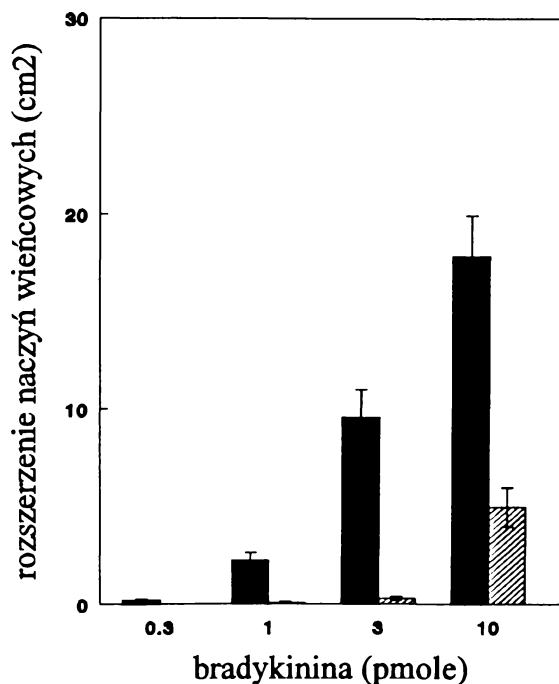
Ryc.6 Zahamowanie podstawowego uwalniania NO przez NO₂Arg wyrażające się zależnym od stężenia NO₂Arg (10-300 μM) wzrostem CPP. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=4-8 doświadczeń.



Ryc.7. Udział NO w rozszerzeniu naczyń wieńcowych wywołanych acetylocholiną (Ach). NO₂Arg (10-100 μM) w sposób zależny od stężenia hamowała rozkurcze naczyń wieńcowych wywołane przez acetylocholinę. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej (powierzchni rozkurczu) dla n=8-18 doświadczeń.



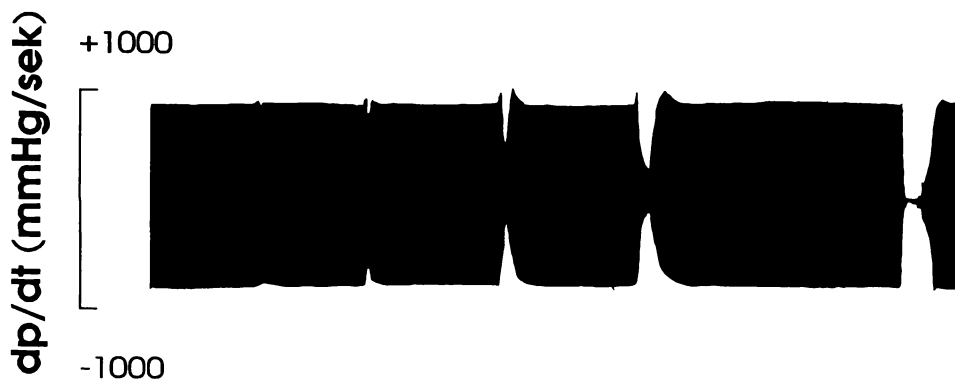
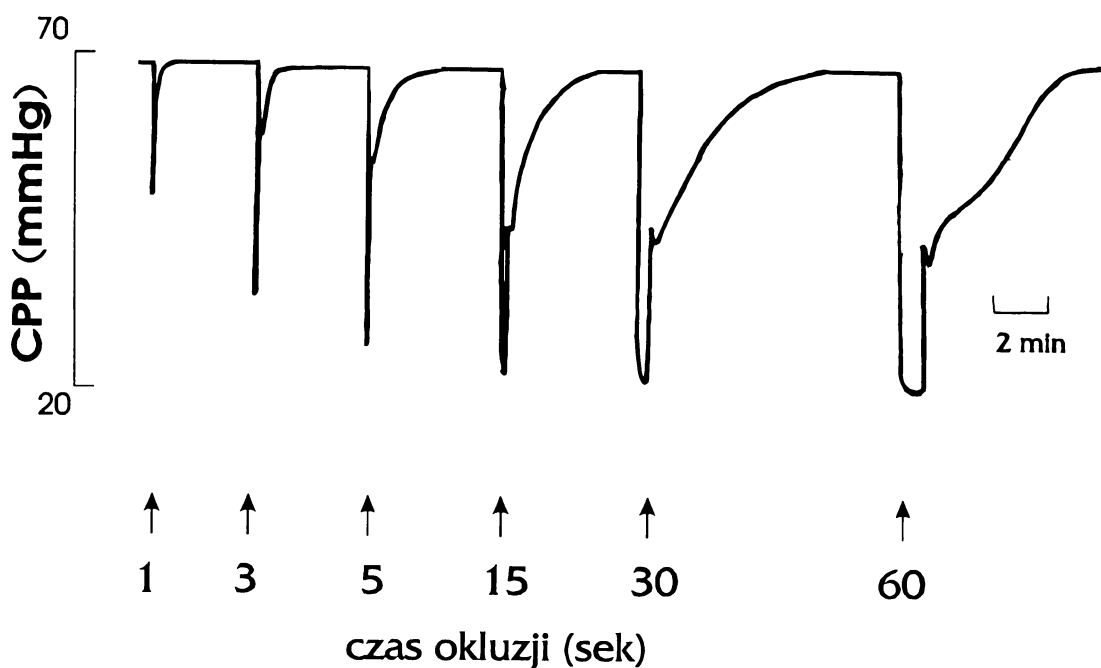
Ryc.8. Hamowanie pozostałych, zależnych od śródbłonna odpowiedzi naczyniorozszerzających (SP, Bk) przez NO₂Arg (100 μM). Powierzchnia rozkurczów kontrolnych naczyń przedstawiona jest jako kolumny czarne, a rozkurczów po podaniu NO₂Arg jako kolumny zakreskowane. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=8-18 doświadczeń.



nie wykazuje wykrywalnych działań nieswoistych. W serii wstępnych doświadczeń okazało się, że NO₂Arg w stężeniu 10 - 100 μM w sposób zależny od stężenia hamuje odpowiedzi naczyniorozszerzające na acetylocholinę (30 - 300 pmoli) w 61 % - 95 % (ryc.7). NO₂Arg w stężeniu 100 μM hamowała również w 90-100 % naczyniorozkurczowe odpowiedzi na substancję P (1-100 pmoli) i bradykininę (0.1-3 pmoli) (ryc.5,8). Odpowiedź na bradykininę w maksymalnej dawce naczyniorozszerzającej (10 pmoli) była hamowana przez NO₂Arg (100 μM) nieco słabiej, w 74 % ± 3, n=4. W niektórych doświadczeniach w obecności NO₂Arg obserwowano odpowiedź skurczową na acetylocholinę, czego nie obserwowano w przypadku bradykininy lub substancji P. L-Arg w stężeniu 1 mM częściowo odwracała hamujący efekt NO₂Arg. Rozkurcze wywołane przez SP odwracane były przez L-Arg (1 mM) w 71 %, n=6. W obecności NO₂Arg (100 μM) niezależne od śródbłonna rozkurcze naczyń wieńcowych były niezmienione.

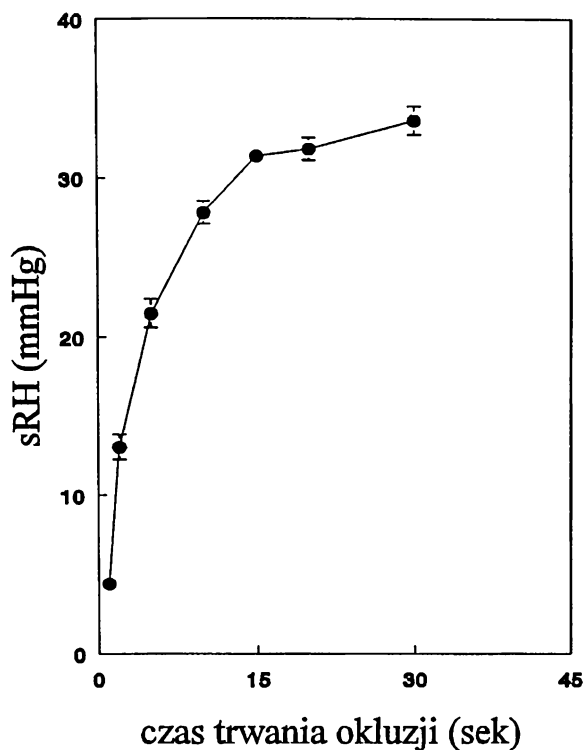
4.4 Charakterystyka reaktywnej hyperemii (RH) w izolowanym sercu

Zatrzymanie przepływu wieńcowego na okres tak krótki jak 1 sekunda już wywoływało reaktywne rozszerzenie łożyska naczyń wieńcowych. Im dłużej trwało zatrzymanie przepływu wieńcowego, tym większa była reaktywna hyperemia (ryc.9). Stwierdzono, że bliski maksymalnemu spadek CPP podczas RH (sRH patrz rozdz. Materiały i Metody) wywołanej 1-60 sekundową okluzją występował w RH wywołanej 15 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego (32 ± 0.5 mmHg, n=18). Był on zbliżony do maksymalnych spadków CPP wywołanych przez substancje naczyniorozszerzające, których mechanizm wazodilatacyjny wiąże się z endogennym lub egzogennym tlenkiem azotu (tabela II). W RH wywołanej 30 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego spadek CPP (sRH) niewiele wzrastał (34.6 ± 0.9 mmHg, n=12) w stosunku do odpowiedzi na 15 sekundową okluzję (ryc.10A). Czas trwania RH (cRH patrz rozdz. Materiały i Metody) osiągał bliską maksymalnej wartość przy RH wywołanej

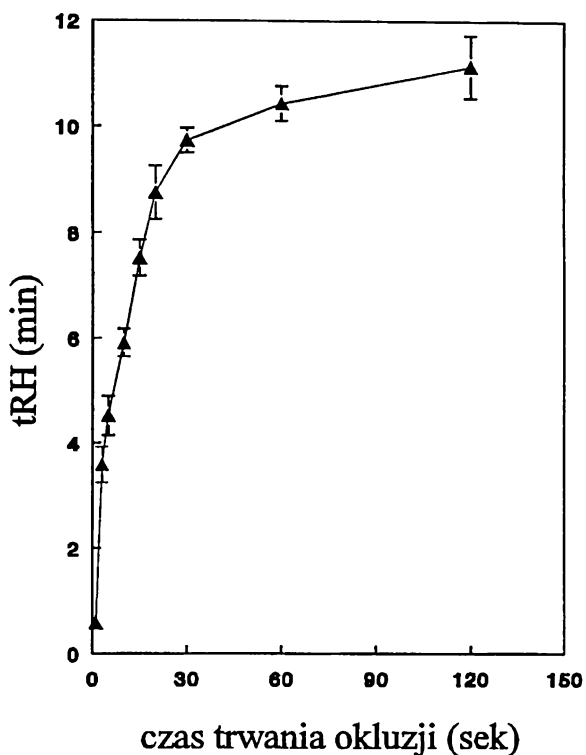


Ryc.9 Typowy zapis reaktywnej hyperemii. Już jednosekundowa okluzja wywoływała RH. Wielkość RH rosła wraz z wydłużeniem czasu okluzji naczyń wieńcowych. Równoległy do zapisu CPP zapis dp/dt przedstawia zmiany kurczliwości mięśnia sercowego w czasie okluzji i w czasie RH. Zamknięcie przepływu wieńcowego na 1-5 sekund pozostawało bez istotnego wpływu na dp/dt. Znamienny spadek kurczliwości mięśnia sercowego występował przy okluzji ≥ 15 sekund.

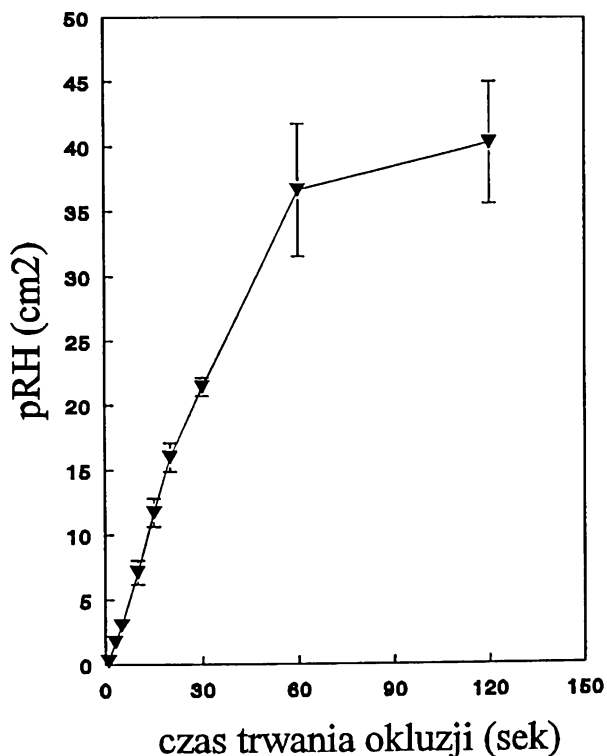
Ryc.10A



Ryc.10B



Ryc.10C



Ryc.10 Charakterystyka reaktywnej hyperemii. Maksymalny spadek CPP w czasie RH (sRH), czas trwania RH (cRH) i powierzchnia reaktywnego rozszerzenia naczyń (pRH) rosły wraz z wydłużeniem czasu okluzji naczyń wieńcowych (odpowiednio 10A, 10B, 10C). Intensywność reaktywnego rozszerzenia naczyń najlepiej oddaje pRH (objaśnienie w tekście). Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=8-18 doświadczeń.

30 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego i wynosił 9.7 ± 0.2 min, $n=10$. Dla RH występującej po 60 sekundowej okluzji czas ten wynosił 10.4 ± 0.3 min, $n=9$ (ryc.10B). Natomiast wielkość RH (mierzona jako powierzchnia pod krzywą odpowiedzi, pRH, patrz rozdz. Materiały i Metody) rosła niemal liniowo wraz z wydłużeniem czasu zamknięcia przepływu wieńcowego w okresach od 1 - 60 sekund (ryc.10C). Powyższe wyniki świadczą o tym, że pRH najlepiej oddaje nasilenie RH i dlatego farmakologiczną ingerencję w RH badano dokonując pomiaru pRH.

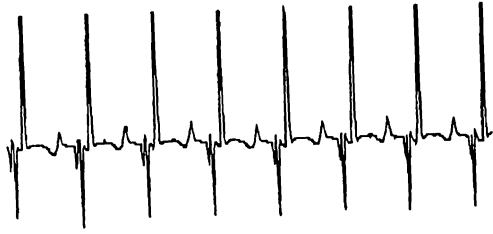
Zmiany kurczliwości mięśnia sercowego w czasie RH

Krótkie zamknięcie przepływu wieńcowego (1-3 sekund) pozostawało bez wpływu na dp/dt, a zamknięcie przepływu wieńcowego na 5 sekund wywoływało nieznaczny spadek kurczliwości (ryc.9). Natomiast przy 15 sekundowym zamknięciu perfuzji spadek kurczliwości był już wyraźny, i przy zamknięciu 60 sekundowym wartość dp/dt (max i min) spadała prawie do zera. Natychmiast po powtórny otwarciu przepływu wieńcowego wartość dp/dt wracała do wartości kontrolnych.

Zmiany EKG w czasie RH

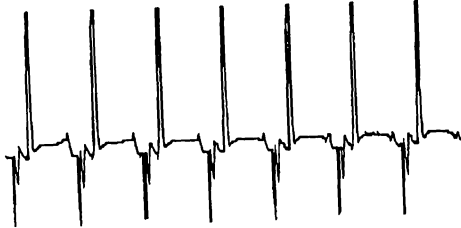
Przeprowadzono serię doświadczeń w których badano ewolucję zmian EKG w czasie RH wywołanej 15 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego (ryc.11). Już w około 5-7 sekund od zamknięcia przepływu wieńcowego obserwowano uniesienie odcinka ST, a w około 10-15 sekund wyraźne odwrócenie załamka T. Zmiany te obserwowano jeszcze w 5-10 sekund po ponownym otwarciu przepływu wieńcowego, tj. w pierwszych sekundach RH. W dalszym przebiegu RH załamek T stopniowo się odwracał i był już dodatni w 30 sekundzie RH, a odcinek ST stopniowo się obniżał i był już prawidłowy w 45-60 sekundzie RH.

EKG przed RH

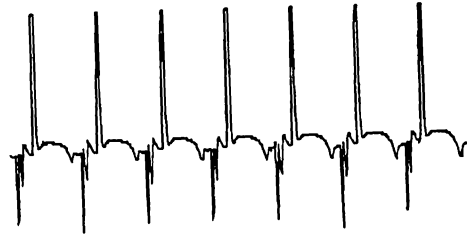


EKG w czasie okluzji.

po 7 sek



po 10 sek

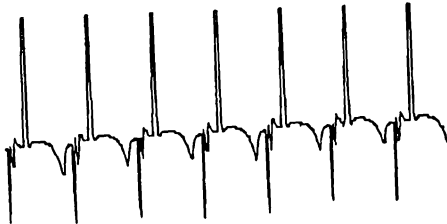


po 15 sek

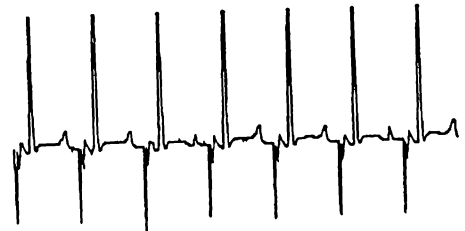


EKG w czasie RH

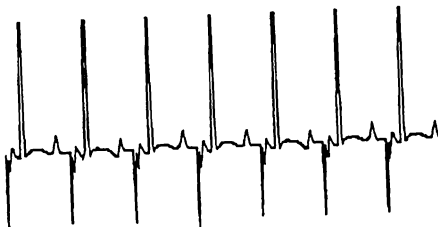
w 5 sek RH



w 30 sek RH



w 60 sek RH



Ryc.11 Ewolucja zmian EKG w czasie 15 sekundowej okluzji naczyń wieńcowych i w czasie RH. Występujące w czasie zamknięcia przepływu wieńcowego uniesienie odcinka ST i odwrócenie załamka T szybko wracało do normy po powtórny otwarciu przepływu, tj. w czasie RH.

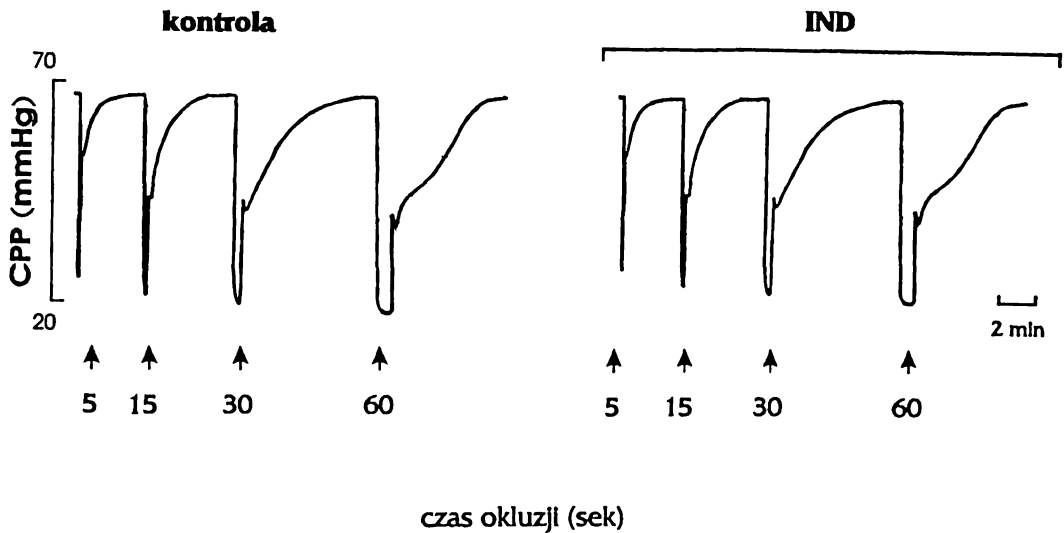
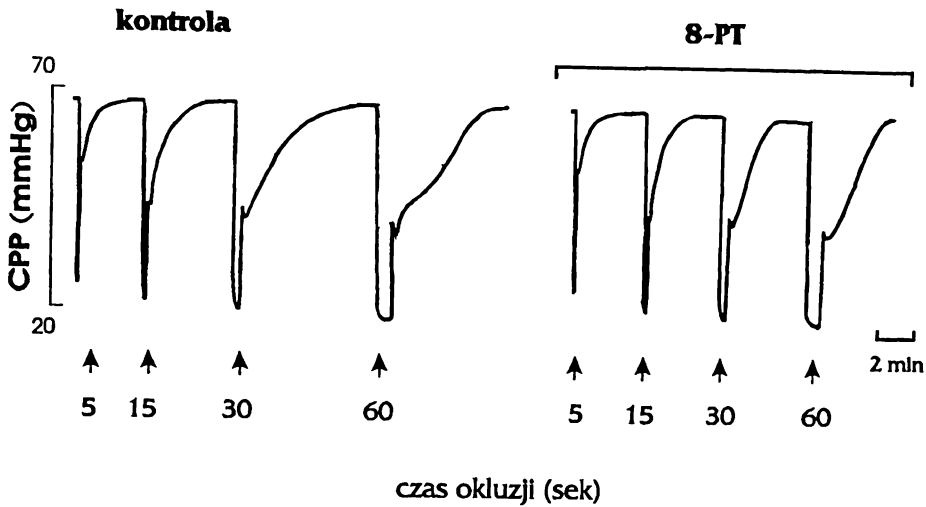
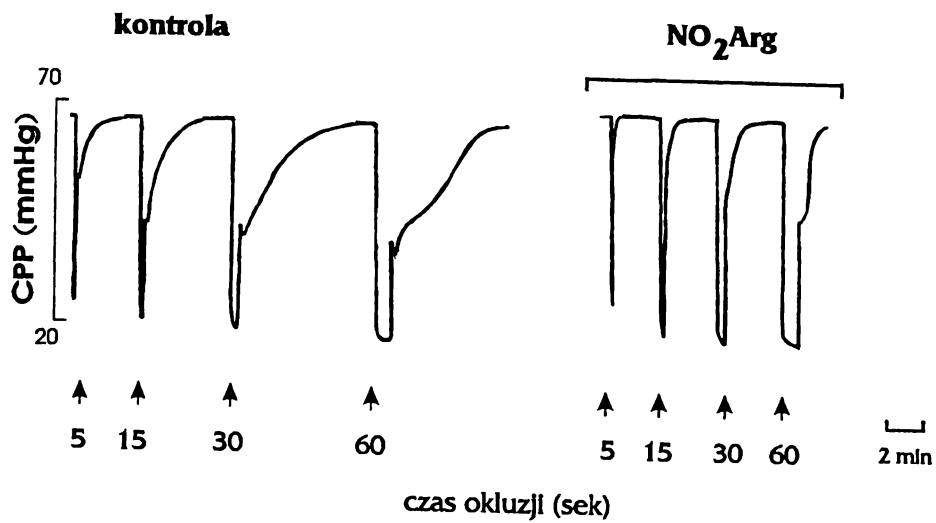
4.5 Mechanizm rozszerzenia naczyń wieńcowych w czasie RH

Udział NO w RH

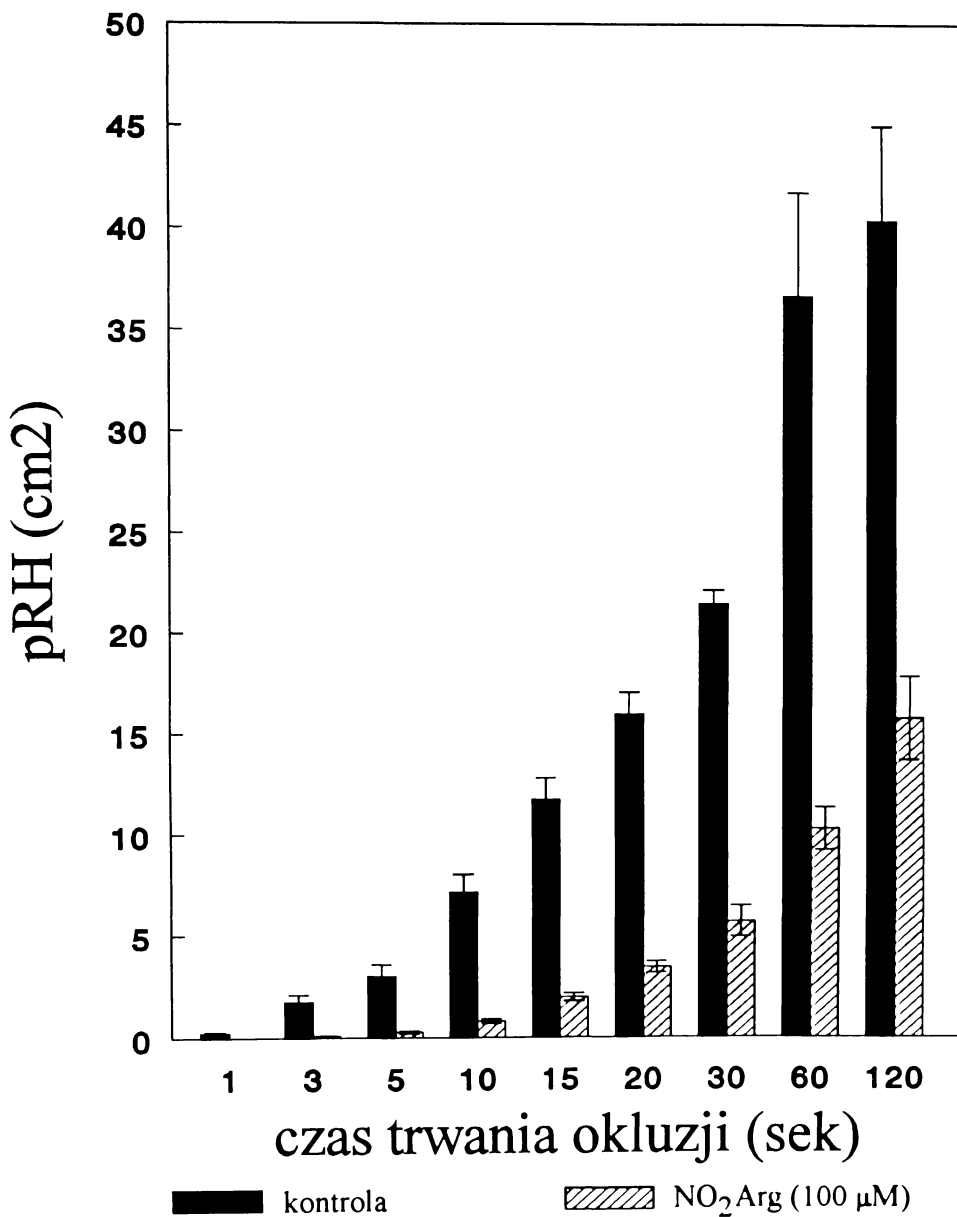
W obecności selektywnego inhibitora NOS, NO₂Arg (100 μM) pRH wywołana 1 sekundowym zamknięciem przepływu była zniesiona, pRH wywołana 3-5 sekundowym zamknięciem przepływu była zahamowana w ponad 90% (odpowiednio 95 ± 1.8 % i 91 ± 1.1 % n=6-8) a pRH wywołana 10-15 sekundowym zamknięciem przepływu w ponad 80% (odpowiednio 89 ± 1.5 %, 84 ± 1%, n=8). Natomiast pRH wywołana dłuższym zamknięciem przepływu wieńcowego (20-120 sekund) była hamowana przez NO₂Arg w mniejszym stopniu tj. 60-80% (ryc.12,13). Zahamowanie pRH przez NO₂Arg (100 μM) nie wynikało z wywołanego przez ten związek wzrostu CPP. W doświadczeniach kontrolnych wywołano podobny wzrost CPP przez wlew trwałego analogu TXA₂ (U46619, 30 pM), lecz w tych warunkach w przeciwieństwie do serc traktowanych NO₂Arg nie występowało hamowanie pRH. Ponadto wlew L-Arg (1 mM) częściowo odwracał hamujący efekt NO₂Arg (100 μM). pRH wywołana 5 i 15 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego przywrócona była przez L-Arg w 66.5 ± 6.2 % (n=5). pRH występująca po 1-5 sekundowym zamknięciu przepływu wieńcowego była zbliżona do powierzchni wyrażającej rozkurcz naczyń wieńcowych wywołany podaniem Ach (30-100 pmol). NO₂Arg hamowała taką krótką pRH w podobnym stopniu jak naczyniorozszerzające odpowiedzi na Ach (ryc 7,13).

Udział prostanoidów w RH

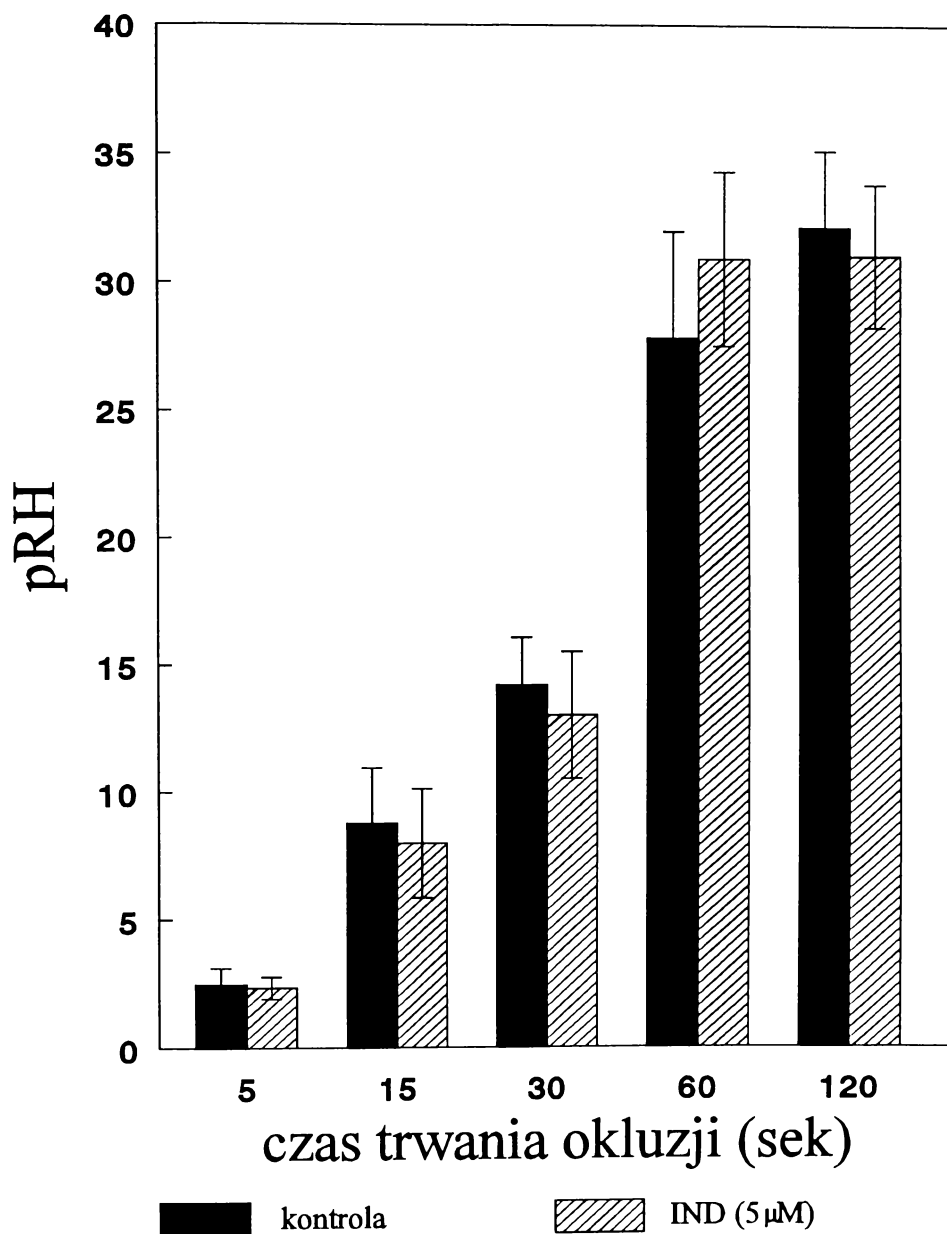
Obecności inhibitora cyklooksygenazy, indometacyny w stężeniu 5 μM (Stewart & Piper, 1988), nie wpływała na wielkość pRH bez względu na to, jak długi był czas zamknięcia przepływu wieńcowego (ryc.12,14).



Ryc.12 Typowe zapisy RH z serc traktowanych NO₂Arginą (100 μM), 8-fenylteofiliną (8-PT, 10 μM) i indometacyną (IND, 5 μM) przedstawiające hamowanie RH przez NO₂Arg i 8-PT oraz brak wpływu IND na RH. NO₂Arg niemal znosiła RH wywołana krótką okluzją naczyń wieńcowych (5 sek) podczas gdy wlew 8-PT jej nie zmniejszał. Natomiast RH wywołana dłuższą okluzją była hamowana przez NO₂Arg i przez 8-PT. IND nie hamowała RH bez względu na czas trwania okluzji.



Ryc.13 Hamowanie pRH przez NO₂ Arg (100 μM). pRH wywołana 1-5 sekundową okluzją była hamowana przez NO₂Arg w większym stopniu niż pRH wywołana dłuższym zamknięciem przepływu wieńcowego. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=6-8 doświadczeń.



Ryc.14 Brak hamowania pRH przez indometacynę (5 μM) bez względu na czas trwania okluzji naczyń wieńcowych. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=5 doświadczeń.

Udział adenozyiny w RH

Udział adenozyiny w RH badano stosując nieselektywnego antagonistę receptorów adenozyinowych, 8-fenylteofilinę (8-PT). 8-PT w stężeniu $10 \mu\text{M}$ znacznie hamowała odpowiedzi naczyniorozszerzające na podawaną w pojedynczych wstrzyknięciach egzogenną adenozyinę ($0.1 - 30 \text{ nmol}$) (ryc.15) oraz znamienne hamowała pRH wywołaną dłuższym niż 10 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego (ryc.12,16). Hamowanie pRH wywołanej 15 i 60 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego wynosiło odpowiednio $20.2 \pm 7 \%$ i $35.3 \pm 2 \%$, $n=5-6$. W czasie 60 sekundowej okluzji przepływu wieńcowego obserwowano bradykardię, która nie występowała jednak w obecności 8-PT ($10 \mu\text{M}$). Pomimo, że maksymalne hamowanie rozkurczów na egzogenną adenozyinę występowało już po 5 minutowej wlewce 8-PT, dopiero 20 minutowa wlewka tego inhibitora hamowała pRH. Hamujący efekt 8-PT na pRH wywołaną 30 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego odwracany był w $91.4 \pm 5 \%$, $n=5$, po 30 minutowym wypłukiwaniu antagonisty.

4.6 Uwalnianie cyklicznych nukleotydów w czasie RH

Uwalnianie cGMP

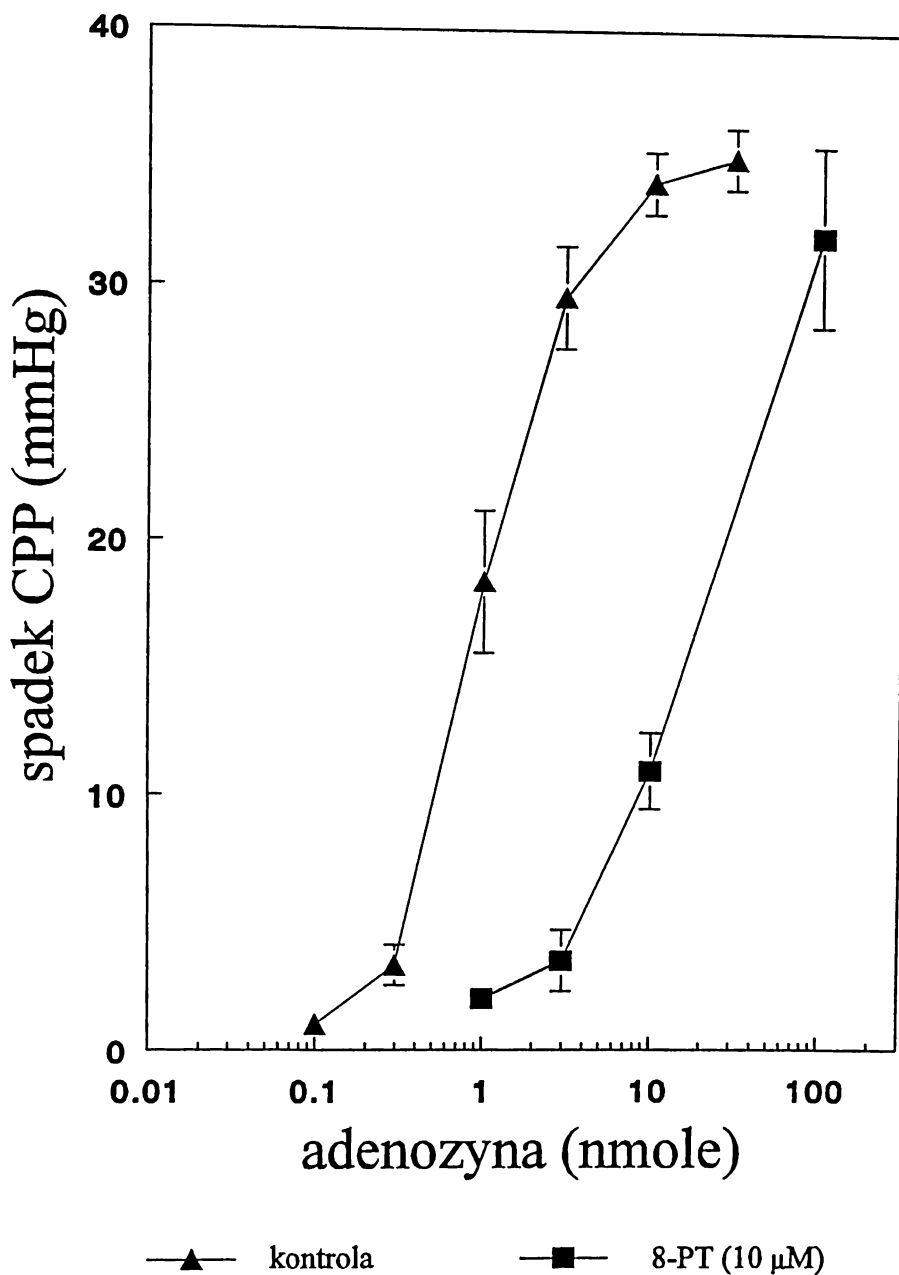
Wyjściowy poziom cGMP w efluencie wypływającym z izolowanego serca wynosił $760 \pm 100 \text{ fmoli/min}$ ($n=15$). W czasie RH występował wzrost uwalniania cGMP do płynu perfundującego serce (ryc 17A). Maksymalny poziom cGMP w efluencie z mięśnia sercowego obserwowano w 1-2 minucie RH, ale już w 5 minucie poziom ten powracał do wartości kontrolnych (ryc.17A). Maksymalny wzrost poziomu cGMP w płynie perfundującym w czasie RH wywołanej 15 sekundowym zamknięciem przepływu wynosił $207,4 \pm 30 \%$, $n=4$, poziomu kontrolnego.

Równocześnie stwierdzono, że stymulacja cyklazy guanylowej przez Bk (10 pmoli) również związana była z uwolnieniem cGMP do płynu perfuzyjnego (ryc.17B).

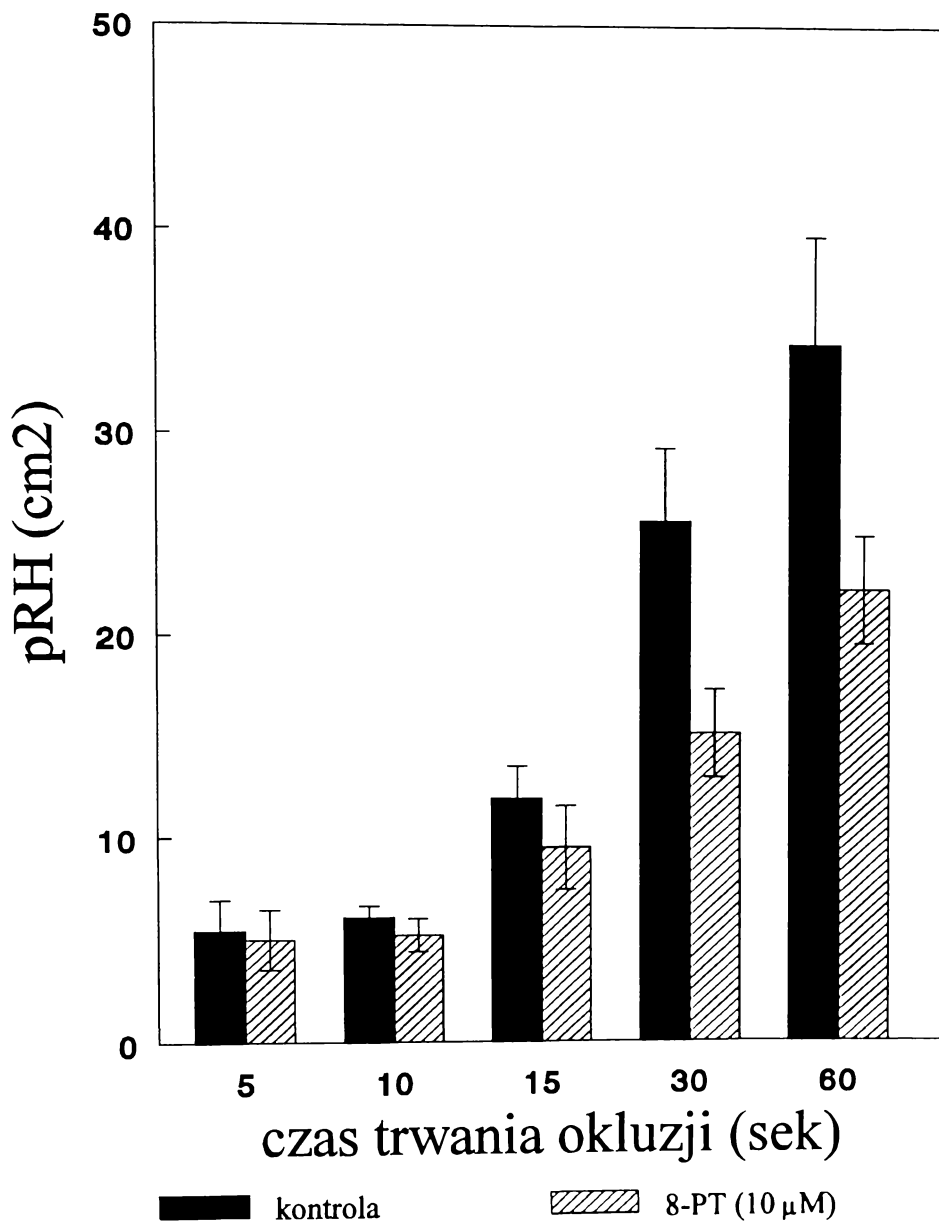
Uwalnianie cAMP

Wyjściowy poziom cAMP w efluencie z izolowanego serca wynosił 7.84 ± 1.7 pmoli/min, n=18. W czasie RH nie zaobserwowano znamiennego wzrostu uwalniania cAMP do płynu perfuzyjnego (104 ± 8 % poziomu wyjściowego, n=6).

Jednorazowe wstrzyknięcia trwałego analogu PGI₂, iloprostu (0.1-1 nmol) wywoływało dawkozależne rozkurcze naczyń wieńcowych (ryc.18A) i uwalnianie cAMP do płynu perfundującego serce (ryc.18B). Największy wzrost poziomu cAMP występował w 2-3 minucie i maksymalnie, dla iloprostu w dawce 1 nmol, wynosił 438 ± 37 % (n=4) poziomu wyjściowego.

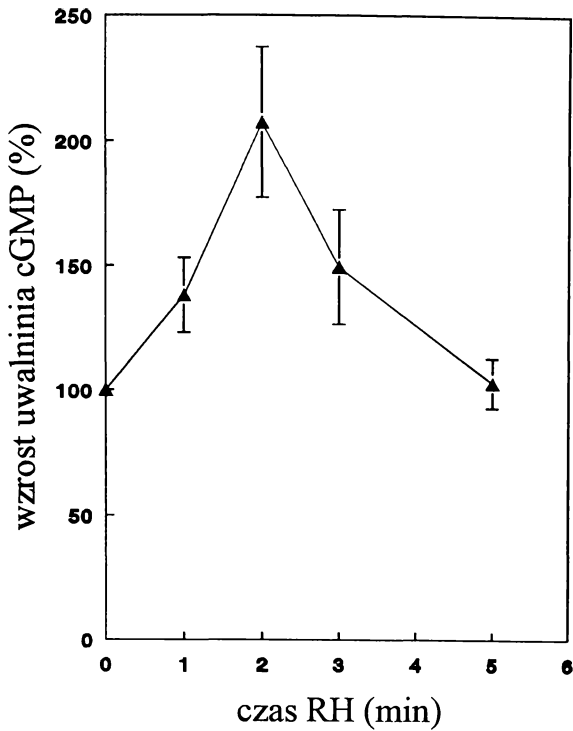


Ryc.15 Hamowanie naczyniorozszerzającego działania egzogennej adenyzy (0.1-10 nmoli) przez 8-fenylteofilinę (10 μM) wyrażające się przesunięciem krzywej w prawo. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=3-5 doświadczeń.

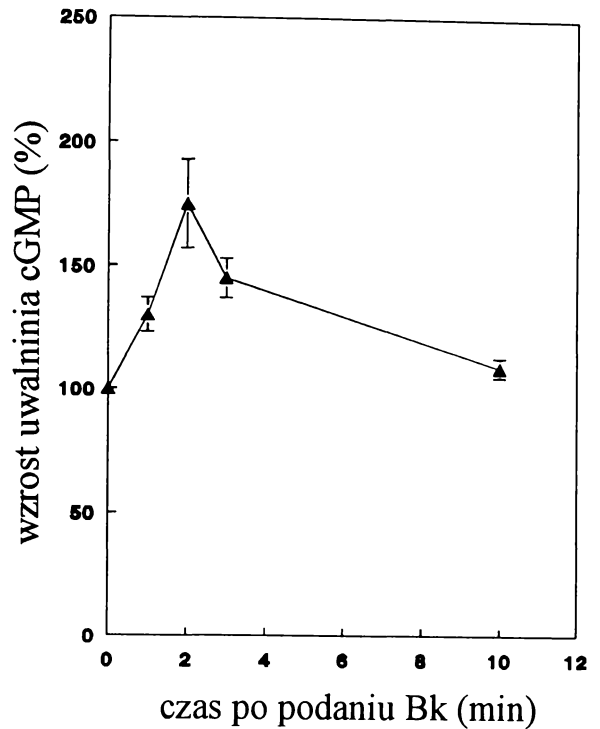


Ryc.16 Udział adenozy w RH. 8-fenyloteofilina ($10\ \mu\text{M}$) hamowała pRH, gdy okluzja naczyń wieńcowych była ≥ 15 sekund, pozostając bez wpływu na pRH wywołaną krótszym zamknięciem przepływu wieńcowego. Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla $n=3-6$ doświadczeń.

Ryc. 17A

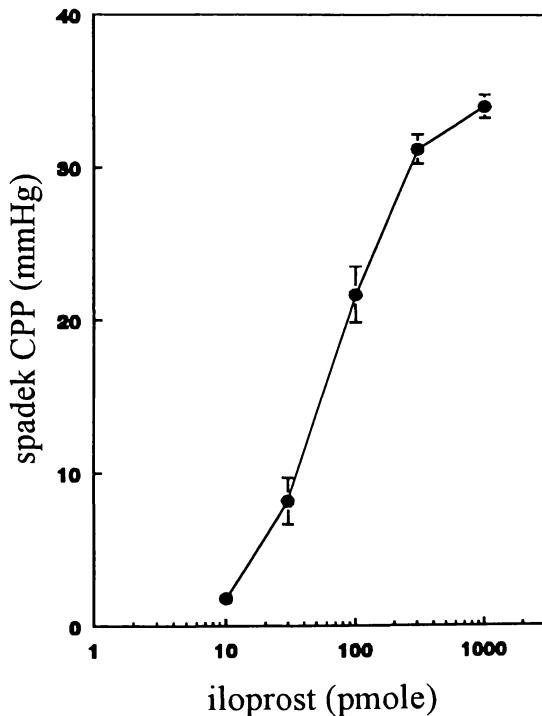


Ryc. 17B

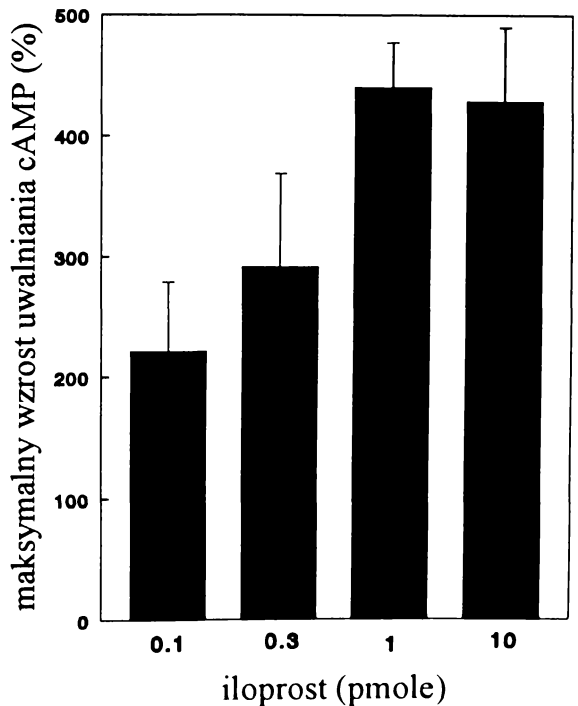


Ryc.17 Uwalnianie cGMP do płynu perfundującego serce w czasie RH. Wzrost uwalniania cGMP w czasie RH wywołanej 15 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego (17A) był zbliżony do tego jaki występował po jednorazowym wstrzyknięciu 10 pmoli bradykininy (17B). Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=3-5 doświadczeń.

Ryc. 18A



Ryc. 18B



Ryc.18 Uwalnianie cAMP przez iloprost. Pojedyncze wstrzyknięcia iloprostu wywoływały dawkozależny spadek CPP (18A) i wzrost uwalniania cAMP do płynu perfundującego serce (18B). Dane przedstawiają średnią i błąd standardowy średniej dla n=4 doświadczenia.

V. DYSKUSJA

Ponad pół wieku badań nad przekąźnikami odpowiedzialnymi za reaktywną hyperemię nie przyniosło rozstrzygnięcia. Zdając sobie w pełni sprawę, że perfundowane płynem odżywczym serce świnki morskiej pozostaje daleko od serca zdrowego, a tym bardziej chorego człowieka i uzyskane wyniki mogą, lecz nie muszą odnosić się do serca człowieka, podjąłem się próby wyjaśnienia roli adenozy, prostanoidów i tlenu azotu w reaktywnej hyperemii krążenia wieńcowego świnki morskiej. Moim sprzymierzeńcem była udoskonalona metoda Langendorffa.

Zacząłem od zbadania odczynowości naczyń wieńcowych izolowanego serca świnki morskiej na substancje naczyniorozszerzające o mechanizmie działania niezależnym i zależnym od obecności śródbłonka, z nadzieją, że charakterystyka rozkurczu naczyń wieńcowych wywołanego przez te związki będzie pomocna przy analizie reaktywnej hyperemii.

Acetylocholina, bradykinina i substancja P powodują zależny od śródbłonka rozkurcz izolowanych naczyń krwionośnych. W różnych łożyskach naczyniowych, u wielu gatunków zwierząt, rozkurcz ten zależy od uwolnienia EDRF (Furchgott, 1984), który został zidentyfikowany jako tlenek azotu (Palmer i wsp., 1987). Początkowo wydawało się, że krążenie wieńcowe nie różni się w tym względzie od innych łożysk naczyniowych wykazano bowiem, że acetylocholina i bradykinina uwalniają NO w sercu świnki morskiej (Kelm & Schrader, 1988; Kelm & Schrader, 1990), w sercu królika (Amezcuca i wsp., 1988; Amezcuca i wsp., 1989; Lamontagne i wsp., 1992b) i w sercu psa (Pelc i wsp., 1991). Równocześnie jednak inhibitory NOS w izolowanych naczyniach wieńcowych świni (Richard i wsp., 1990; Tschudi i wsp., 1991) pozostają bez wpływu, lub słabo hamują rozkurcze tych naczyń wywołane przez bradykininę, hamując jedynie śródbłonkowo-zależne rozkurcze wywołane klonidyną. Podobnie, w krążeniu wieńcowym szczura

zaobserwowano, że zahamowanie syntazy NO skraca jedynie czas działania naczyniorozkurczowego bradykininy, a nie wpływa na jego wielkość. Ponadto ani hemoglobina ani dyzmutaza jonów nadadtlenkowych (zmiatacze NO) nie wpływają na działanie rozkurczowe bradykininy w łożysku naczyń wieńcowych szczura (Baydoun & Woodward, 1991). Wydaje się więc, że rola NO jako przekaźnika rozszerzającego naczynia wieńcowe w mechanizmie zależnym od śródbłonna nie jest do końca wyjaśniona.

Stymulowane komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, obok EDRF/NO, uwalniają również prostacyklinę (Gryglewski i wsp., 1991), a w hodowanych komórkach śródbłonna aorty bydlęcej uwalnianie obydwu mediatorów jest sprzężone (de Nucci i wsp., 1988). Można by się więc spodziewać, że PGI₂, która jest związkami silnie rozszerzającym naczynia wieńcowe (Schrör i wsp., 1980), uczestniczy wspólnie z NO w zależnym od śródbłonna rozkurczu naczyń wieńcowych. Istnieją jednak istotne rozbieżności w ocenie tego zjawiska.

Na przykład wykazano, że PGI₂ bierze udział w rozkurczu naczyń wywołanym przez bradykininę, ale nie przez acetylocholinę lub substancję P (Furchgott, 1984). Z kolei rozkurcze bradykininowe, badane w różnych izolowanych naczyniach królika lub kota, są hamowane przez indometacynę, podczas gdy w analogicznych naczyniach pochodzących od psa, świni i człowieka zahamowanie cyklooksygenazy pozostaje bez wpływu na wielkość naczyniowych odpowiedzi na bradykininę (Cherry i wsp., 1982). W krążeniu wieńcowym królika (Lamontagne i wsp., 1992b), ale nie świni (Richard i wsp., 1990) psa (Pelc i wsp., 1991) lub szczura (Baydoun & Woodward, 1991) prostacyklina jest istotnym przekaźnikiem rozkurczu wywołanego bradykininą i acetylocholiną.

W tym świetle interesujące wydają się wyniki moich doświadczeń przeprowadzonych na naczyniach wieńcowych serca świnki morskiej. W tych doświadczeniach NO₂Arg hamowała spadki ciśnienia perfuzyjnego wywołane przez acetylocholinę, substancję P i bradykininę (z wyjątkiem jej najwyższej dawki) w ponad 90%, podczas gdy indometacyna pozostawała bez wpływu na te odpowiedzi. Tak więc,

w sercu świnki morskiej w śródbłonkowo-zależnym rozkurczu naczyń wieńcowych uczestniczy prawdopodobnie wyłącznie NO. Prostacyklina natomiast w tych odpowiedziach łożyska wieńcowego nie bierze udziału, co potwierdza wyniki badań Stewarta i Pipera (1988), ale pozostaje w sprzeczności z wynikami badań Lee i wsp (1990). Obie grupy badaczy przeprowadziły doświadczenia przy zastosowaniu modelu Langendorffa. Trudno więc znaleźć przekonujące wytłumaczenie dla tych przeciwstawnych wyników poza kilkoma nasuwającymi się przypuszczeniami. Po pierwsze, Lee i wsp (1990) używali w swoich doświadczeniach indometacynę w stężeniu $14 \mu\text{M}$, czyli prawie trzykrotnie wyższym od stężenia używanego w naszych doświadczeniach. Wiadomo, że indometacyna w stężeniu $2.8 \mu\text{M}$ hamuje całkowicie czynność cyklooksygenazy kwasu arachidonowego w sercu świnki morskiej (Stewart & Piper, 1988), a wyższe jej stężenia mogą wykazywać inne poza spodziewanym działanie farmakologiczne. Po drugie, doświadczenia Lee i wsp. (1990) przeprowadzono na izolowanych sercach, które perfundowano płynem o wysokim, zatrzymującym czynność serca, stężeniu jonów potasu. Takie wysokie, нефизjologiczne stężenie chlorku potasu w płynie perfundującym serce mogło zmieniać odczynowość mięśni gładkich i śródbłonka naczyń wieńcowych (Noll i wsp., 1991).

Wyniki świadczące o tym, że prostacyklina nie bierze udziału w śródbłonkowo zależnym rozkurczu naczyń wieńcowych serca świnki morskiej nie są jednak jednoznaczne ze stwierdzeniem, że prostacyklina nie jest uwalniana z komórek śródbłonka pod wpływem ich stymulacji przez acetylocholinę, bradykininę lub substancję P. Wiadomo że te substancje uwalniają PGI_2 z komórek śródbłonka (Gryglewski, 1991). Nie jest więc zaskoczeniem, że Stewart i Piper (1988) obserwowali znamienny wzrost uwalniania PGI_2 przez serce świnki morskiej pod wpływem acetylocholiny czy bradykininy. Równocześnie wyżej cytowani autorzy wykazali, że indometacyna znamienne hamuje stymulowane przez acetylocholinę czy bradykininę uwalnianie PGI_2 , a pozostaje bez wpływu na zmiany w przepływie wieńcowym wywołane przez te związki. Najprawdopodobniej zatem stymulacja receptorów muskarynowych, bradykininowych czy tachykininowych w sercu świnki

morskiej prowadzi do sprzężonego uwalniania NO i PGI₂, ale za działanie naczyniorozszerzające odpowiedzialny jest jedynie NO, podczas gdy PGI₂ widocznie pełni inną rolę. Badania przeprowadzone w naszej Katedrze przez dr Józefa Święsą przy użyciu unikalnego modelu, pozwalającego na równoczesną rejestrację naczyniorozszerzającego i trombolitycznego działania endogennych przekazników, sugerują jaka mogłaby być fizjologiczna rola *in vivo* uwolnionej w sprzężeniu z NO endogennej prostacykliny. W badaniach tych, przeprowadzonych na kotach wykazano, że inhibitory NOS selektywnie hamują spadek ciśnienia tętniczego krwi wywołany dożylnym podaniem metacholiny lub kalikreiny, podczas gdy inhibitory cyklooksygenazy wybiórczo znoszą ich działanie trombolityczne. Interpretacja tych wyników jest taka, że endogenne NO i PGI₂ pełnią odmienne funkcje. *In vivo* u kotów, NO uwalniany w kierunku mięśni gładkich naczyń jest przekaznikiem naczyniorozszerzającym, a PGI₂ uwalniana w kierunku światła naczyń jest czynnikiem przeciwzkrzepowym. Trudno oprzeć się hipotezie że taka sytuacja ma miejsce również w krążeniu wieńcowym, przynajmniej u świnki morskiej.

Rozszerzenie naczyń wieńcowych świnki morskiej wywołane maksymalną naczyniorozszerzającą dawką bradykininy (10 pmoli) było hamowane przez NO₂Arg w mniejszym stopniu niż rozkurcze naczyń wywołane mniejszymi dawkami bradykininy lub pełnym zakresem dawek acetylocholino lub substancji P. Tak więc w rozkurczu wywołanym przez maksymalną dawkę bradykininy (10 pmoli) zdaje się brać udział również komponenta niezależna od NO. Nie jest nią PGI₂, ponieważ indometacyna nie wpływała na działanie bradykininy bez względu na jej dawkę. W innych łożyskach naczyniowych wykazano, że obok NO i PGI₂ bradykinina może uwalniać ze śródbłonna inne przekazniki o działaniu rozszerzającym na naczynia. W nerce szczura (Fulton i wsp., 1992) i w sercu psa (Pinto i wsp., 1987) rozkurcz naczyń wywołany przez bradykininę jest częściowo związany z uwolnieniem metabolitów kwasu arachidonowego wytworzonych przez enzymy zależne od cytochromu P₄₅₀. W krążeniu mózgowym psa naczyniorozszerzające działanie bradykininy jest hamowane przez SOD i katalazę

(Rosenblum, 1987), co mogłoby sugerować udział wolnych rodników w tym działaniu bradykininy, lecz nie w działaniu acetylocholin, która podobnie jak w innych łożyskach naczyniowych rozszerza naczynia mózgowe za pośrednictwem NO (Kontos i wsp., 1990). Ciekawe, że w krążeniu wieńcowym świnki morskiej SOD nie hamuje rozkurczów naczyń wywołanych bradykininą (Kelm & Schrader, 1990). Tak więc "pośredni" rozkurcz naczyń pod wpływem bradykininy może być związany z uwolnieniem NO, prostacykliny, produktów utleniania kwasu arachidonowego przez zależne od cytochromu P₄₅₀ monooksygenazy lub wreszcie z uwolnieniem wolnych rodników tlenowych. W tych odczynach naczyniowych biorą udział receptory B₂ umieszczone w komórkach śródbłonka. Natomiast aktywacja receptorów B₁ obecnych na błonie komórek mięśni gładkich naczyń wywołuje niezależny od śródbłonka rozkurcz naczyń (Regoli & Barabe, 1980; Regoli i wsp., 1990; Schini i wsp., 1990; Cowan & Cohen, 1991). Mechanizm rozkurczowego działania wysokich dawek bradykininy w krążeniu świnki morskiej może być związany z bezpośrednim wpływem na gładkomięśniowe receptory B₁, co możnaby sprawdzić przez zastosowanie selektywnych antagonistów receptorów bradykininowych (Regoli i wsp., 1990), lub z aktywacją monooksygenaz zależnych od cytochromu P₄₅₀, co możnaby wyjaśnić stosując inhibitory tych enzymów (Fulton i wsp., 1992). Pośrednictwo wolnych rodników wydaje się być wykluczone (Kelm & Schrader, 1990).

Wyniki moich doświadczeń wraz z danymi z piśmiennictwa wykazują, że substancje o zależnym od śródbłonka mechanizmie działania wywołują swój efekt naczyniorozszerzający za pośrednictwem różnych mediatorów w zależności od gatunku zwierzęcia i łożyska naczyniowego, a ponadto w tym samym łożysku naczyniowym mechanizm rozkurczu naczyń może być różny dla różnych wazodilatorów. W sercu świnki morskiej, w przeciwieństwie do serca szczura (Baydoun & Woodward, 1991), świni (Tschudi i wsp., 1991) i królika (Lamontagne i wsp., 1992b), acetylocholina, substancja P i bradykinina (ale w dawkach 0.1-3 pmoli) wywołują swoje działanie naczyniorozszerzające najprawdopodobniej wyłącznie za pośrednictwem NO. Bradykinina

w dawkach wyższych niż 3 pmole wykazuje odmienny mechanizm działania naczyniorozszerzającego, którego natura nie została przeze mnie wyjaśniona.

Interesująca wydaje się różna siła działania badanych związków o zależnym od śródbłonka mechanizmie działania. W moich doświadczeniach w sercu świnki morskiej Bk była silniejszym uwalniaczem NO niż substancja P lub acetylocholina i wywoływała rozkurcz naczyń wieńcowych już w progowej dawce 100 fmoli. W innych łożyskach naczyniowych lub u innych gatunków zwierząt zależność ta kształtuje się odmiennie. Na przykład w komórkach śródbłonka aorty królika SP jest najsilniejszym uwalniaczem NO (Zembowicz i wsp., 1990) podczas gdy w hodowanych komórkach śródbłonka, gdzie brak jest receptorów muskarynowych, bradykinina najsilniej stymuluje uwalnianie NO (de Nucci i wsp., 1988). W sercu świnki morskiej Ach jest słabym czynnikiem rozkurczającym naczynia wieńcowe, zarówno w wymiarze stężeń Ach potrzebnych do wywołania odczynu, jak również w wymiarze maksymalnej odpowiedzi, która nie dorównuje tym wywołanym przez BK czy SP. W przeciwieństwie do łożyska wieńcowego świnki morskiej i królika (Schror i wsp., 1991), w sercu świni SP jest silniejszym wazodilatorem niż Bk (Christie & Lewis, 1991). Również u ludzi najsilniejszą naczyniorozszerzającą substancją o mechanizmie działania zależnym od śródbłonka wydaje się być SP (Crossman i wsp., 1989). Taka różnorodność może wynikać z różnych populacji receptorów obecnych na komórkach śródbłonka, z odmiennej transmisji sygnału receptorowego prowadzącej do aktywacji NOS, lub z różnej kompozycji endogennych wazodilatatorów uwalnianych pod wpływem stymulacji receptorowej.

Substancje naczyniorozszerzające o mechanizmie działania niezależnym od śródbłonka (GTN, NaNP, SIN-1) wykazywały działanie farmakologiczne w stężeniach o 1-3 rzędów wielkości wyższych od Bk, SP i Ach pomimo tego, że obie grupy związków działają przez aktywację rozpuszczalnej cyklazy guanylowej i wzrost wewnątrzkomórkowego cGMP. Przyczyna tego zjawiska może być tylko przedmiotem poniżej przedstawionych spekulacji. cNOS obecna w śródbłonku naczyń po aktywacji

odpowiednich receptorów uwalnia NO, który szybko dyfunduje do sąsiadujących komórek mięśni gładkich i wywołuje ich rozkurcz, natomiast egzogenne donory NO muszą pokonać barierę komórek śródbłonkowych od światła naczynia by przejść do mięśni gładkich. Hipotezę tę mogłaby potwierdzać zbliżona, pomimo odmiennych mechanizmów uwalniania NO, siła naczyniorozszerzającego działania GTN, NaNP, SIN-1. GTN uwalnia NO w komórkach mięśni gładkich w procesie wymagającym obecności grup SH (Noack & Feelisch, 1991), SIN-1 w roztworze wodnym uwalnia NO spontanicznie (Schorr i wsp., 1989), a NaNP wydaje się bezpośrednio oddziaływać na cyklazę guanylową komórek mięśni gładkich (Gryglewski i wsp., 1992a), a pomimo tego wszystkie trzy donory NO prawie z jednakową siłą rozszerzają łożysko wieńcowe świnki morskiej.

Interesujące wydaje się zaobserwowane w łożysku wieńcowym świnki morskiej zjawisko tachyfilaksji w stosunku do wywołanych przez GTN odpowiedzi naczyniorozkurczowych. Nitrogliceryna jest stosowana w leczeniu choroby niedokrwiennej serca od ponad 100 lat (Murrell, 1879), ale dopiero ostatnie lata badań przyniosły biochemiczne podstawy dla zrozumienia mechanizmu działania tego leku i mechanizmu odpowiedzialnego za pojawiającą się w czasie leczenia tolerancję. W procesie wymagającym obecności wolnych grup SH, trójazotan glicerolu w komórkach mięśni gładkich naczyń, komórkach śródbłonka, a być może w pewnych komórkach krwi ulega redukcji do NO, który stymuluje cyklazę guanylową i w ten sposób jest odpowiedzialny za efekt farmakologiczny nitrogliceryny (Ignarro i wsp., 1981; Feelisch & Kelm, 1991; Noack & Feelisch, 1991). Według klasycznej hipotezy, po raz pierwszy zaproponowanej przez Needlemana i wsp (1973), za zjawisko tolerancji na nitroglicerynę odpowiedzialne są niedobór lub niedostępność wolnych grup SH w komórkach metabolizujących nitroglicerynę i upośledzenie biotransformacji GTN do NO (Forster i wsp., 1991). Niestety próby zapobiegania zjawisku tolerancji przez podawanie egzogennych tioli, jak np. N-acetylo-cysteiny, są rzadko skuteczne (Parker i wsp., 1987; Munzel i wsp., 1989; Dupuis i wsp., 1990). Dlatego też niektórzy autorzy przypuszczają, że tolerancja na GTN polega

na zmniejszeniu wrażliwości samej cyklicznej guanylowej na stymulację (Axelsson & Karlsson, 1984). Moje doświadczenia nie potwierdzają tej koncepcji, bowiem tachyfilaksja występowała jedynie w przypadku GTN, a nie w przypadku innych związków naczyniorozszerzających działających za pośrednictwem cGMP. Zaskakująco szybka tolerancja na GTN w łożysku wieńcowym świnki morskiej (być może z powodu ubogich zapasów wolnych wewnątrzkomórkowych grup SH) czyni ten model wygodnym do badania zjawiska tolerancji na GTN. Tolerancję w tym łożysku naczyniowym można wywołać stosując niewielkie dawki nitrogliceryny przez bardzo krótki okres czasu w przeciwieństwie do bardzo wysokich dawek stosowanych przez niektórych autorów (Boesgaard i wsp., 1991). Ponadto w tym modelu zjawisko tolerancji na GTN nie jest maskowane przez neurohormonalne odczyny adaptacyjne układu krążenia, które pojawiają się *in vivo* po podaniu GTN (Dupuis i wsp., 1990).

Drugą, główną część mojej rozprawy doktorskiej poświęciłem zjawisku reaktywnej hyperemii. Z piśmienictwa wynika, że RH wywoływano okluzją naczyń wieńcowych na przeciąg kilkuset milisekund (Sadick i wsp., 1987), kilku sekund (Bache i wsp., 1973) lub kilkudziesięciu sekund (Olsson, 1975). Do tej pory nie wyjaśniono, czy te same mechanizmy uczestniczą w RH wywołanej bardzo krótkim (np. jednosekundowym) lub dłuższym (np. jednodominutowym) zamknięciem przepływu wieńcowego. Dla krótkotrwałej RH nie udało się dostarczyć bezpośrednich dowodów uczestnictwa mediatorów naczyniorozszerzających, co skłoniło do wysunięcia koncepcji uczestnictwa mechanizmów miogennych w tej formie RH (Giles & Wilcken, 1977b). Jako mediatorzy RH występującej po dłuższym zamknięciu przepływu wieńcowego proponowano natomiast adenozyne i prostanoidy (Olsson, 1975).

Już pierwsze wyniki moich doświadczeń wykazały, że inhibitor NOS, NO_2Arg , oraz nieselektywny antagonist receptorów adenozynowych A_1 i A_2 , 8-PT hamowały RH, podczas gdy inhibitor cyklooksygenazy, indometacyna pozostawała na RH bez wpływu,

co sugeruje, że NO i adenozyne a nie prostanoidy są przekaźnikami RH. Warto w tym miejscu wspomnieć, że stosowana w moich doświadczeniach 8-fenylteofilina (8-PT) jest 30 razy silniejszym antagonistą receptorów adenozynowych niż teofilina, a ponadto w przeciwieństwie do teofiliny lub aminofiliny jest pozbawiona działania na fosfodiesterazę (Griffith i wsp., 1981; Bowmer & Yates, 1989).

Potwierdzenia tych wstępnych wówczas wyników badań farmakologicznych postanowiłem szukać w badaniach biochemicznych. Wiadomym jest, że NO swoje działanie farmakologiczne realizuje przez wzrost cGMP (Rapoport & Murad, 1983), a prostacyklina lub prostaglandyna E₂ przez wzrost cAMP wewnątrz komórek (Gryglewski i wsp., 1991). Jednym ze sposobów zakończenia aktywności cyklicznych nukleotydów wewnątrz komórek jest usuwanie cAMP i cGMP do przestrzeni pozakomórkowej (Radziszewski, 1992). Dlatego poziom cyklicznych nukleotydów w płynie pozakomórkowym może być miarą aktywacji cyklaz guanylowej i adenylowej.

Postanowiłem więc zbadać uwalnianie cAMP przez serce po stymulacji cyklazy adenylowej przez iloprost, uwalnianie cGMP po stymulacji cyklazy guanylowej przez bradykininę oraz uwalnianie obydwu cyklicznych nukleotydów w czasie RH. Stwierdziłem, że podczas RH w efluencie z naczyń wieńcowych następował wzrost stężenia cGMP, a jego maksymalne uwalnianie i kinetyka tego uwalniania była podobna jak w przypadku uwalniania endogennego NO pod wpływem bradykininy. RH natomiast nie była związana ze wzrostem cAMP w efluencie, pomimo tego, że iloprost w swojej maksymalnej dawce naczyniorozszerzającej wywoływał ponad czterokrotny wzrost poziomu cAMP w efluencie. Tak więc pomiary poziomów cyklicznych nukleotydów w efluencie z naczyń wieńcowych potwierdziły udział NO w reaktywnym rozszerzeniu naczyń, a wykluczyły udział prostacykliny lub PGE₂ w tym zjawisku.

Mechanizm rozszerzenia łożyska wieńcowego przez adenozyne wydaje się być bardziej złożony, nie jest to tylko bezpośrednia aktywacja cyklazy adenylowej za pośrednictwem receptorów A₂ znajdujących się w mięśniach gładkich naczyń (Kurtz, 1987;

Cushing i wsp., 1991; Balwierczak i wsp., 1991; Orito i wsp., 1993). Adenozyina działa również na receptory A_1 obniżając wewnątrzkomórkowy poziom cAMP w mięśniu sercowym (Olsson & Pearson, 1990). cAMP pojawiający się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej po uwolnieniu adenozyiny jest wypadkową jej działania na receptory A_2 i A_1 . Tym samym uwolnienie adenozyiny w sercu nie zawsze musi być związane ze wzrostem zewnątrzkomórkowego cAMP. Brak wzrostu stężenia cAMP w efluencie z naczyń wieńcowych w czasie RH nie wyklucza więc udziału adenozyiny w tym zjawisku.

W dalszych badaniach pragnąłem wyjaśnić jaka jest rola NO, a jaka adenozyiny w RH oraz czy jednakowy jest udział tych przekazników w RH wywołanej krótko- i długotrwałym zamknięciem przepływu wieńcowego. Okazało się, że RH wywołana 1-5 sekundową okluzją była hamowana przez NO_2Arg w ponad 90%, podczas gdy 8-PT pozostawała na nią bez wpływu. Natomiast RH wywołana dłuższą okluzją była częściowo hamowana przez NO_2Arg , a częściowo przez 8-PT. Istotnym czynnikiem decydującym jaki jest udział NO, a jaki adenozyiny w RH, jest więc czas trwania okluzji. Przeanalizujmy zatem dokładniej udział tych przekazników w RH wywołanej 1-5 sekundową okluzją przepływu wieńcowego (nazywaną dalej *krótką* RH) i wywołaną 15-60 okluzją przepływu wieńcowego (nazywaną dalej *długą* RH). Za ten skrót myślowy w nazewnictwie przepraszam, ale czynię to dla wygody czytelnika.

Stopień rozkurczu naczyń wieńcowych zaobserwany podczas krótkiej RH był zbliżony do rozkurczów wywołanych przez acetylocholinę czy substancję P. Ponadto NO_2Arg hamowała krótką RH w podobnym stopniu (>90%) jak hamowała rozszerzenia naczyń wieńcowych wywołane podaniem acetylocholinę lub substancji P, a ponadto krótka RH nie była hamowana przez 8-PT. Należy więc przypuszczać że w sercu świnki morskiej endogenne NO jest jedynym mediatorem krótkiej RH tak, jak jest jedynym przekaznikiem naczyniorozszerzającego działania małych dawek bradykininy oraz substancji P i acetylocholinę. Dotychczas panował pogląd, że krótką RH należy tłumaczyć mechanizmami miogennymi, gdyż nie udało się uzyskać bezpośredniego dowodu na udział

jakiegokolwiek substancji naczyniorozszerzającej w takiej RH. Obecnie udało się po raz pierwszy wykazać, że uwolnienie endogennego NO przez komórki śródbłonka wieńcowego w odpowiedzi nawet na jednosekundowe zatrzymanie przepływu wieńcowego tłumaczy niejasny do tej pory mechanizm krótkiej RH.

Możnaby sądzić, że powodem tak dużej wrażliwości naczyń izolowanego serca na krótkotrwałe zamknięcie przepływu jest zastosowanie do perfuzji izolowanego serca płynu elektrolitowego o mniejszej od krwi zdolności przenoszenia tlenu (Döring & Dehnert, 1988). Nie jest tak jednak, opisano bowiem RH wywołaną nawet krótszym zamknięciem przepływu (400 milisekund) w mięśniu sercowym *in vivo* (Schwartz i wsp., 1982; Sadick i wsp., 1989). Krążenie wieńcowe, bez względu na stosowany do badań model doświadczalny, wykazuje ogromną odczynowość na przerwę w jego perfuzji. Sekundowe, a być może jeszcze krótsze zamknięcie przepływu wieńcowego uruchamia mechanizmy prowadzące do uwolnienia tlenu azotu i do reaktywnego rozszerzenia naczyń. Pozostaje jednak ciągle w sferze spekulacji jaki jest mechanizm tego procesu .

W moich doświadczeniach, zgodnie z metaboliczną koncepcją RH (Olsson, 1975), wraz z wydłużeniem okresu zamknięcia przepływu wieńcowego zwiększała się RH. Stopień rozkurczu naczyń wieńcowych zaobserwowany podczas RH wywołanej 15 sekundową okluzją był już większy od stopnia rozkurczów wywołanych podaniem acetylocholiny lub substancji P. W przeciwieństwie do krótkiej RH , długa RH była hamowana przez NO₂Arg w mniejszym stopniu niż naczyniorozszerzające działanie acetylocholiny lub substancji P, a ponadto była hamowana przez 8-PT. Tak więc w długiej RH tlenek azotu nie jest już jedynym mediatorem reaktywnego rozszerzenia naczyń tak, jak w krótkiej RH. W długiej RH działanie naczyniorozszerzające NO wspomagane jest przez adenozyne.

W kontekście powyższych wniosków ważną jest charakterystyka rozkurczu naczyń wieńcowych podczas RH. Bliski maksymalnemu spadek CPP podczas RH występował w RH wywołanej już 15 sekundową okluzją przepływu wieńcowego, a w RH wywołanej

dłuższym zamknięciem przepływu spadek CPP niewiele wzrastał przy ciągle wydłużającym się czasie trwania RH. Znamienne hamowanie RH przez 8-PT zaznaczało się w RH wywołanej 15 sekundową, ale nie krótszą okluzją naczyń wieńcowych. Taka charakterystyka RH pozwala przypuszczać, że za szybki maksymalny rozkurcz (maksymalny spadek CPP) naczyń wieńcowych odpowiada NO, natomiast uwolnienie adenozyiny wydłuża czas trwania rozkurczu naczyń wieńcowych podczas RH. Nasuwa się więc hipoteza, że NO i adenozyina współdziałają ze sobą wywołując potężny rozkurcz naczyń wieńcowych. Tlenek azotu pogłębia rozkurcz naczyń wieńcowych, a adenozyina go stabilizuje. RH wywołana 60 sekundową okluzją naczyń wieńcowych dwukrotnie przewyższała maksymalne rozszerzenie naczyń wywołane bradykininą i około czterokrotnie wywołane acetylocholiną lub substancją P.

Dotychczasowe badania nad współdziałaniem śródbłonkowych przekazników naczyniorozszerzających wykazały synergizm pomiędzy NO i PGI₂ w ich działaniu przeciwplytkowym, ale nie w ich działaniu naczyniorozszerzającym (Radomski i wsp., 1987b; Gryglewski i wsp., 1989). Interesujące staje się pytanie czy potężny rozkurcz naczyń wieńcowych w czasie fizjologicznego zjawiska jakim jest RH nie znajdzie swojego uzasadnienia w synergistycznym działaniu NO i adenozyiny. Na to pytanie mogą odpowiedzieć tylko dalsze badania, ale ewentualne znalezienie biochemicznych podstaw dla współdziałania NO i adenozyiny nie zmienia faktu, że na podstawie obecnie przeprowadzonych badań tlenek azotu jako "wywoływacz", a adenozyina jako "utrwalacz" RH zaistniały w kinetycznym wymiarze objaśnienia odczynowego rozszerzenia naczyń wieńcowych po okresie ich zamknięcia.

Powróćmy na chwilę do niektórych aspektów działania adenozyiny na serce. Adenozyina poprzez receptory A₁ zmniejsza aktywność układu przewodzącego i jego węzłów (Schrader i wsp., 1987; Evoniuk i wsp., 1987; Williams, 1987; Feigl, 1983), oraz hamuje uwalnianie i działanie amin katecholowych na serce (Dobson, 1983a; Brown i wsp., 1990), dzięki czemu pojawia się ujemny efekt chronotropowy. Ze względu jednak

na predylekcję adenozyiny w stosunku do receptorów A_2 (Feigl, 1983) wszystkie wyżej wymienione efekty działania adenozyiny na serce wywołane za pośrednictwem receptorów A_1 objawiają się wyraźniej dopiero w wyższych jej stężeniach. Istotnie, również w moich doświadczeniach adenozyina w szerokim zakresie dawek naczyniorozszerzających pozostawała bez wpływu na pracę serca, podana natomiast w wysokiej dawce 100 nmoli adenozyina wywoływała bradykardię i działała chronotropowo ujemnie. Bradykardię, jaką obserwowano dopiero po okresie okluzji naczyń dłuższym niż 30 sekund, możnaby wiązać z wysokim stężeniem uwolnionej adenozyiny, gdyż była ona znoszona przez 8-PT. Zatem przy dłuższej okluzji przepływu wieńcowego ilość uwolnionej adenozyiny przekracza zakres stężeń wykazujących jedynie działanie naczyniorozszerzające (Belardinelli i wsp., 1980; Belardinelli i wsp., 1981; Dobson, 1983b). Taki profil działania czyni adenozyinę przekąźnikiem ochraniającym serce przed skutkami niedotlenienia i pomaga zrozumieć dlaczego właśnie adenozyina jest partnerem NO w RH.

Zamknięcie przepływu wieńcowego na 1 sekundę doprowadza do wzrostu uwalniania NO który rozszerzając naczynia wieńcowe zwiększa przepływ przez chwilowo niedotlenione serce. NO staje się więc mediatorem natychmiastowego reagowania, dostosowującym przepływ do nawet najmniejszych zmian zapotrzebowania serca na tlen. NO, łatwo dyfundujący przez błony biologiczne i nietrwały chemicznie, doskonale nadaje się do takiej roli. Zamknięcie przepływu wieńcowego na 15 sekund jest wystarczającym bodźcem do uwolnienia małej ilości adenozyiny, która wspomaga naczyniorozszerzające działanie NO. Gdy niedotlenienie przedłuża się uwolnionej adenozyiny uwalnia się wystarczająco dużo, aby przez receptory A_1 mogła ona w pełni rozwinąć swoje kardioprotekcyjne działanie. Działanie chronotropowo ujemne adenozyiny oraz jej bezpośrednie i pośrednie działanie inotropowo ujemne zmniejsza bowiem obciążenie mechaniczne serca i zużycie tlenu. Adenozyina staje się więc mediatorem z opóźnionym zapłonem przychodzącym w sukurs NO, gdy jego naczyniowe działanie już nie wystarcza, a istnieje realne niebezpieczeństwo niedoboru tlenu, które jest przecież śmiertelnym

zagrożeniem dla serca.

Prostanoidy nie biorą udziału w reaktywnym rozszerzeniu naczyń wieńcowych. Nie znaczy to jednak, że nie odgrywają żadnej roli w reaktywnej hyperemii, skoro wiele do tej pory opublikowanych prac wykazuje wzrost ich uwalniania w czasie RH (Wennmalm, 1975; Alexander i wsp., 1975; Kraemer i wsp., 1976). Uwalnianie prostanoidów w czasie RH nie jest jednoznaczne, czego nie brano pod uwagę w dotychczasowych pracach (Wennmalm, 1975), z ich udziałem w reaktywnym rozszerzeniu naczyń. Być może prostacyklina jest uwalniana przez komórki śródbłonna naczyń wieńcowych świnki morskiej w czasie RH, tak, jak jest uwalniana przez substancje o zaleźnym do śródbłonna mechanizmie działania. Uwolniona w czasie RH prostacyklina mogłaby wówczas odgrywać inną rolę, a mianowicie, rolę przekaźnika przeciwpłytkowego (patrz wcześniej cytowane badania dr Święsa). Od dawna wiadomo, że spowolnienie przepływu w naczyniach kwionośnych jest czynnikiem trombogennym, może bowiem ułatwiać osiadanie płytek na komórkach śródbłonna i powstawanie zakrzepów wewnątrznaczyniowych. Temu niebezpieczeństwu, nieodłącznie związanemu z zatrzymaniem przepływu wieńcowego, może przeciwdziałać PGI₂, która synergistycznie z uwolnionym NO (Radomski i wsp., 1987b; Gryglewski i wsp., 1989), przeciwdziała aktywacji płytek krwi. Ponadto wykazano, że PGI₂ wraz z NO synergistycznie zmniejszają uszkodzenie mięśnia sercowego w czasie jego reperfuzji (Gryglewski & Swies, 1992b). Tak więc pozostając w kręgu hipotez, wydaje się że PGI₂ może odgrywać *in vivo* rolę w RH pomimo braku jej udziału w reaktywnym rozszerzeniu naczyń.

Konkludując, w sercu świnki morskiej NO i adenozyne pełnią ważne, ale odmienne role w zjawisku RH przyczyniając się w różnym stopniu w zależności od czasu trwania okluzji, do reaktywnego rozszerzenia naczyń. Ujemne inotropowe i chronotropowe działanie adenozyne wraz z kardioprotekcyjnym działaniem NO, obok ich działań naczyniorozszerzających, sugerują, że RH to nie tylko reaktywne rozszerzenie naczyń wieńcowych, lecz mechanizm nakierowany na przywrócenie zachwianej równowagi

między zapotrzebowaniem serca na tlen a jego zaopatrzeniem, oraz na ochronę serca przed groźnymi skutkami jego niedotlenienia.

Wydaje się, że przedstawione w tej rozprawie wyniki badań można uznać za uzupełniające i porządkujące dane znajdujące się w dotychczasowym piśmiennictwie. Po pierwsze, pozwalają na wyjaśnienie dlaczego antagoniści adenozyliny lub inhibitory jej metabolizmu pozostawały bez wpływu na RH wywołaną bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego (Eikens & Wilcken, 1973; Juhran i wsp., 1971; Schutz i wsp., 1977). Po drugie, tłumaczą, dlaczego w pierwszej pracy opisującej rolę NO w RH (Kostic & Schrader, 1992) inhibitory NOS tylko częściowo hamowały RH wywołaną 30-60 sekundową okluzją. Pozostaje natomiast wątpliwość, dlaczego w niektórych doświadczeniach inhibitory cyklooksygenazy hamowały RH (Alexander i wsp., 1975; Kraemer i wsp., 1976; Miyajima i wsp., 1989), a w innych pozostawały na nią bez wpływu (Hintze & Kaley, 1977; Sunahara & Talesnik, 1979; Hintze & Vatner, 1984; Kimura & Satoh, 1985). Można, lecz tylko częściowo, rozbieżności te tłumaczyć różnicami gatunkowymi. Na przykład w tej pracy stwierdzono, że w krążeniu wieńcowym świnki morskiej acetylocholina czy bradykinina wykazują działanie naczyniorozszerzające dzięki uwolnieniu NO, natomiast Lamontagne i wsp. (1992b) udowodnili, że w sercu królika w tych odczynach obok NO bierze udział również prostacyklina.

Podejmowano wiele prób wyjaśnienia mechanizmów uwalniania przekaźników RH. Pohl i Busse (1989) wykazali, że hypoksja w świetle naczynia przy normoksji na zewnątrz naczynia stymuluje komórki śródbłonka naczyń do uwalniania NO. Zatem komórki śródbłonka naczyń znajdujące się w ciągłym kontakcie z przelywającą krwią miałyby spełniać rolę śródbłonkowego czujnika PO_2 (Pohl, 1990). Nie można jednak przyjąć tej hipotezy bez zastrzeżeń. Po pierwsze, czy zatrzymanie przepływu wieńcowego zaledwie na 1 sekundę może obniżyć PO_2 w stopniu wykrywalnym dla śródbłonkowego czujnika? Po drugie, czy tlenochłonna synteza NO może być uaktywniona w odpowiedzi na spadek PO_2 ? Po trzecie, wreszcie w jaki sposób sygnał spadku PO_2 miałby doprowadzać do

uwolnienia NO przez komórki śródbłonka?

Dawniej wydawało się, że zapasy mioglobiny w mięśniu sercowym są wystarczające by zapewnić metabolizm tlenowy mięśnia sercowego przez pierwsze 5 sekund niedotlenienia (Olsson, 1964), a RH wywołana bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego ma podłoże miogenne. Ostatnio wykazano jednak, że RH wywołana nawet 400 milisekundową okluzją naczyń wieńcowych jest ściśle związana z aktywnością metaboliczną serca (Sadick i wsp., 1987; Sadick i wsp., 1989). W moich doświadczeniach zaobserwowałem wyraźne niedokrwienne zmiany odcinka S-T i załamka T już po 7 sekundach okluzji przepływu wieńcowego. Schwartz i wsp. (1990) zaobserwowali obniżenie poziomu wysokoenergetycznych fosforanów w mięśniu sercowym a Levy i wsp. (1986) obniżenie PO_2 w mięśniu sercowym (Levy i wsp., 1986) już po 5 sekundach okluzji naczyń wieńcowych. Ponadto zaobserwowano, że poziom wysokoenergetycznych fosforanów w mięśniu sercowym zmienia się nawet w czasie trwania jednego skurczu serca (Fossel i wsp., 1980). Jest więc wielce prawdopodobnym że serce posiada subtelne mechanizmy regulujące przepływ wieńcowy w zależności od stanu jego metabolizmu i jednosekundowa czy nawet krócej trwająca okluzja naczyń wieńcowych je uruchamia. Niestety nasze narzędzia badawcze chyba są wciąż zbyt toporne by te mechanizmy uchwycić w ruchu.

Niemniej jednak, pierwsze kroki w kierunku zrozumienia mechanizmu uwalniania NO w czasie niedotlenienia zastały już postawione. Luckhoff i wsp. (1986) wykazali, że niedotlenienie komórek śródbłonka w hodowli związane jest ze wzrostem poziomu wolnych jonów wapniowych wewnątrz komórki. W komórkach śródbłonka syntaza NO jest procesem Ca^{++} zależnym (Busse i wsp., 1989; Busse i wsp., 1991; Forstermann i wsp., 1991). Istnieją więc przesłanki, by sądzić, że wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w śródbłonku naczyń wieńcowych, w odpowiedzi na spadek PO_2 w świetle naczyń, jest sygnałem uruchamiającym zwiększone tworzenie NO.

Nie można w tym miejscu pominąć innych możliwych mechanizmów uwalniania

NO w czasie RH. Mechaniczny efekt wpływającego do naczyń wieńcowych płynu, po okresie jego zamknięcia, może być powodem powstania tzw "shear stress" prowadzącego do uwolnienia NO (Pohl i wsp., 1986; Rubanyi i wsp., 1986; Buga i wsp., 1991). Ostatnio odkryto, że "shear stress" przez aktywację mechanoreceptorów komórek śródbłonka, zwiększa napływ jonów wapnia do komórki (Lansman i wsp., 1987; Revest & Abbott, 1992).

Ostatnie badania wykazały wzrost uwalniania trójfosforanu adenozyiny (ATP) w czasie niedotlenienia serca (Hopwood i wsp., 1989) i w okresie RH (Borst & Schrader, 1991). Równocześnie wykazano, że głównym źródłem uwalnianego w czasie RH ATP są komórki śródbłonka naczyń wieńcowych (Borst & Schrader, 1991). Wiadomo, że nukleotydy adenozyinowe na drodze stymulacji receptorów P_{2Y} uwalniają NO (Boeynaems & Pearson, 1990), nie można więc wykluczyć, że uwalniany z komórek śródbłonka ATP mógłby przyczyniać się do aktywacji NOS w czasie RH.

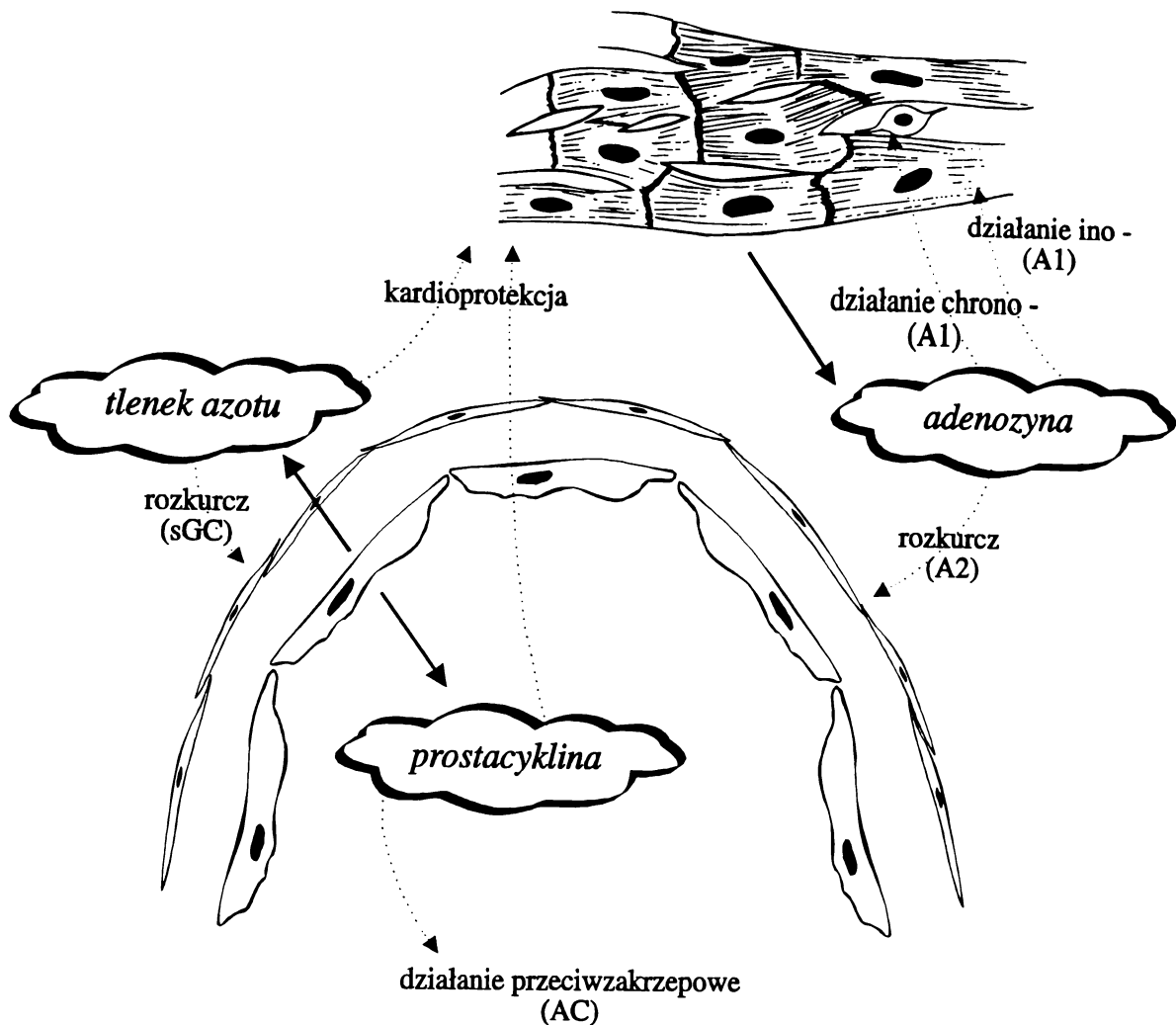
Jakikolwiek byłby mechanizm aktywacji NOS, to odbiorcą i przetwornikiem sygnału do produkcji NO w czasie RH są komórki śródbłonka naczyń wieńcowych, natomiast głównym źródłem uwalnianej w czasie RH adenozyiny jest mięsień sercowy (Kroll i wsp., 1987). Zaburzenie równowagi pomiędzy zaopatrzeniem a zapotrzebowaniem mięśnia sercowego na tlen (Berne, 1980; Bardenheuer & Schrader, 1986) aktywuje hydrolizę wewnątrzkomórkowego ADP, czego rezultatem jest uwolnienie adenozyiny do przestrzeni pozakomórkowej (Feigl, 1983). Mechanizm uwalniający adenozyinę może więc być czujnikiem PO_2 umieszczonym a komórkach mięśnia sercowego (Schrader i wsp., 1990; Deussen & Schrader, 1991; Smolenski i wsp., 1991).

Odmienne miejsce uwalniania adenozyiny i NO, różna czułość śródlonkowego czujnika PO_2 w porównaniu z sercowym, oraz gazowa natura NO mogą tłumaczyć "pierszeństwo" NO w odpowiedzi na przerwanie przepływu wieńcowego.

Rozkurcz naczyń wieńcowych w czasie niedotlenienia dotyczy głównie naczyń mikrokrażenia (von Beckerath i wsp., 1991). W tej części krażenia wieńcowego, w

przeciwieństwie do dużych naczyń wieńcowych, niewielka jest przestrzeń pozakomórkowa. Takie warunki anatomiczne spełniają doskonale wymagania komunikacji międzykomórkowej zaangażowanych w grę trzech typów komórek : komórek śródbłonka naczyń, komórek mięśni gładkich i komórek mięśnia sercowego. Uwolniony z komórek śródbłonka NO i uwolniona z mięśnia sercowego adenozyzna, z przeciwnych stron przenikają do komórek mięśni gładkich naczyń, tam wywierając swoje działanie naczyniorozszerzające, czego rezultatem jest obserwowana RH (schemat str.73).

Istnieją logiczne przesłanki by sądzić, że RH mięśnia sercowego ma znaczenie fizjologiczne. Nie ma jednak bezpośrednich na to dowodów. Szukałem więc przynajmniej jakiegoś przekonującego uzasadnienia tak intensywnego rozszerzenia naczyń w toku RH. Już pierwsi badacze RH zauważyli, że dług tlenowy zaciągany w czasie okluzji naczyń wieńcowych (tzw. oxygen debt) jest w czasie RH oddawany z nawiązką (tzw debt overpayment), oraz, że nasilenie RH jest nadmierne w stosunku do istniejącego zadłużenia tlenowego (Coffman & Gregg, 1960; Coffman & Gregg, 1961; Olsson & Gregg, 1965; Olsson, 1975). Wyżej cytowani autorzy nie potrafili jednak wyjaśnić tej obserwacji. Czyżby więc niepotrzebne było aż tak intensywne reaktywne rozszerzenie naczyń wieńcowych? W trakcie przeprowadzania doświadczeń uwagę moją zwrócił fakt, że niedokrwiennie zmiany EKG i spadek kurczliwości mięśnia sercowego powracały do normy prawie natychmiast po powtórnym otwarciu przepływu wieńcowego, podczas gdy RH trwała znacznie dłużej. Ostatnio wykazano, że zaburzenia metabolizmu i kurczliwości mięśnia sercowego wywołane 30 sekundową okluzją naczyń wieńcowych w "zdrowym" sercu powracają do normy już w pierwszych 30 sekundach kilkuminutowej RH. W sercu ze zwężonymi naczyniami wieńcowymi RH jest zmniejszona i okres powrotu prawidłowej czynności serca po krótkotrwałej okluzji naczyń jest ponad dwukrotnie dłuższy (Schwartz i wsp., 1991). Nasuwa się więc wniosek, że tak duże nasilenie RH i znaczne przeplacenie zadłużenia tlenowego ma swoje głębokie uzasadnienie w tym, żeby jak najszybciej przywrócić prawidłową funkcję serca po chwilowym epizodzie niedotlenienia i po



Schemat przedstawiający proponowaną w tej rozprawie hipotezę działania przekazników reaktywnej hyperemii.

Tlenek azotu, uwolniony przez komórki śródbłonna mikrokrążenia wieńcowego, oraz adenozyzna, uwolniona przez komórki mięśnia sercowego, z przeciwnych stron przenikają do komórek mięśni gładkich by wywołać reaktywne rozszerzenie naczyń wieńcowych, odpowiednio przez aktywację rozpuszczalnej cyklazy guanylowej (sGC) lub przez stymulację receptorów A2.

Komórki śródbłonna wieńcowego wraz z NO wytwarzają prostacyklinę, która uwalniana do światła naczynia nie wykazuje działania naczyniorozszerzającego lecz działanie przeciwzakrzepowe poprzez stymulację cyklazy adenylowej (AC) w płytkach krwi.

Tlenek azotu, prostacyklina, oraz adenozyzna, choć w odmienny sposób, działają kardioprotekcyjnie na niedotlenione serce (objaśnienie znajduje się w tekście).

chwilowym upośledzeniu jego czynności.

Ambicją każdego lekarza zajmującego się badaniami podstawowymi jest, by jego praca oprócz korzyści poznawczych miała też jakieś zastosowanie praktyczne. Ku mojemu zdziwieniu istnieją w piśmiennictwie prace uzasadniające zastosowanie kliniczne zjawiska RH mięśnia sercowego, jakby w uzupełnieniu szeroko już stosowanej RH krążenia obwodowego w diagnostyce schorzeń naczyń obwodowych (Bernstein & Fronek, 1982; Vogelberg i wsp., 1988; Wahlberg i wsp., 1990).

Głównym celem badania angiograficznego tętnic wieńcowych jest ocena anatomiczna rozległości i stopnia ciężkości zmian miażdżycowych w tych tętnicach. Badanie to jest szeroko stosowane nie tylko w celach diagnostycznych, ale ma również znaczenie w podejmowaniu decyzji co do dalszego leczenia, w określaniu skutków tego leczenia i w prognozowaniu przebiegu choroby. Obserwowane w czasie angiografii zwężenia zmienionych miażdżycowo naczyń wieńcowych zwykle wyraża się jako procent zwężenia światła naczynia (Guidelines, 1987). Ten sposób jednak okazuje się zawodny. Po pierwsze, wyniki otrzymane tą metodą są zmienne. Po drugie i najważniejsze, stopień miażdżycowego zwężenia naczyń wydaje się nie oddawać w pełni stopnia czynnościowego upośledzenia śródbłonna tych naczyń (White i wsp., 1984; Nissen i wsp., 1986).

W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych okazało się, że wielkość RH maleje wraz z postępującym zwężeniem naczyń wieńcowych (Hillis & Friesinger, 1976; Widmann i wsp., 1980; Hartman & Warltier, 1990; Feldman i wsp., 1979). Gdy opracowano technikę pozwalającą na dokładny pomiar RH w mięśniu sercowym u człowieka, zaczęto stosować reaktywne rozszerzenie naczyń jako wskaźnik upośledzenia czynnościowego zwężonych naczyń (Wright i wsp., 1980a). Wykazano, że rzeczywiście RH, będąc wskaźnikiem upośledzenia czynnościowego naczyń wieńcowych u ludzi, jest doskonałym uzupełnieniem klasycznej angiografii i może być zastosowana w ostatecznej śródoperacyjnej diagnostyce choroby niedokrwiennej serca oraz w podejmowaniu decyzji co do ilości wszczepianych pomostów naczyniowych (Wright i wsp., 1980a; Wright i

wsp., 1980b; White i wsp., 1984). Wszystko to ustalono jeszcze przed wyjaśnieniem mechanizmu RH i przed odkryciem natury chemicznej EDRF (Ignarro i wsp., 1987; Palmer i wsp., 1987). Powyższe obserwacje wydają się być zrozumiałe dopiero w świetle badań Kostica i Schradera (1992), oraz wielu innych autorów, którzy wykazali zmniejszone tworzenie NO przez naczynia miażdżycowe (Gryglewski, 1990). Przyczyną upośledzenia RH mięśnia sercowego w chorobie niedokrwiennej serca może być zmniejszenie tworzenia NO przez miażdżycowo zmienione naczynia wieńcowe. RH mięśnia sercowego wywołana np 15 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego stawałaby się więc bezpieczną (Wright i wsp., 1980b), znakomicie powtarzalną, śródoperacyjną metodą *ilościowej* oceny zdolności komórek śródbłonka zmienionych miażdżycowo naczyń do uwalniania NO. Zatem wydaje się, że w opisanych powyżej badaniach klinicznych stopień upośledzenia zdolności komórek śródbłonka naczyń do produkcji NO, czyli wielkość RH, był wskaźnikiem decydującym o rodzaju zabiegu operacyjnego.

Przepływ wieńcowy jest regulowany przez napięcie ściany naczyń oporowych, które utrzymują prawidłową dystrybucję przepływu wieńcowego przez ścianę lewej komory, a w tym odpowiednią perfuzję warstwy podwiersdziejowej serca. Jest to niezwykle istotne z tego powodu, że warstwa podwiersdziejowa, ze względu na jej obciążenie mechaniczne jest najbardziej wrażliwa na niedotlenienie serca (Bassenge & Heusch, 1990). Rozszerzenie naczyń w czasie RH dotyczy w większym stopniu warstwy podwiersdziejowej niż podnawoskowej (Hess & Bache, 1976; Warltier i wsp., 1981). Natomiast szereg leków naczyniorozszerzających, powodując rozkurcz naczyń podnawoskowych, wywołuje niekorzystną redystrybucję krwi, czego konsekwencją może być nawet niedotlenienie warstwy podwiersdziejowej (Warltier i wsp., 1981; Schad i wsp., 1991). W naczyniach zwężonych RH, a przede wszystkim jej komponenta podwiersdziejowa, jest upośledzona (Widmann i wsp., 1980). Upośledzony jest więc mechanizm uruchamiany w obliczu niedoboru tlenu i chroniący serce a zwłaszcza jego warstwę podwiersdziejową przed

skutkami nawet chwilowego jego niedokrwienia. Jeden z mechanizmów działania nitrogliceryny (Bache i wsp., 1975b), czy blokerów kanałów wapniowych (Bache & Dymek, 1982; Bache, 1989), leków szeroko stosowanych w chorobie niedokrwiennej serca, polega na zwiększeniu podwsięrdziowego przepływu wieńcowego. Wydaje się zatem, że leki faworyzujące przepływ podwsięrdziowy, a więc i leki potęgujące RH mogą okazać się korzystne w leczeniu choroby niedokrwiennej serca.

W tym świetle, przynajmniej z teoretycznego punktu widzenia, wydaje się nie pozbawione logiki ustanowienie RH punktem wyjścia do poszukiwań nowych leków mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu choroby niedokrwiennej serca. Takimi lekami mogłyby być środki przedłużające lub wzmacniające działanie tlenu azotu lub(i) adenozy, których zadaniem byłoby potęgowanie, upośledzonego w niedokrwiennej chorobie serca, fizjologicznego zjawiska RH.

VI. WNIOSKI

W sercu świnki morskiej, endogenne tlenek azotu, uwalniany z komórek śródbłonna naczyń wieńcowych, oraz endogenna adenozyne, uwalniana z komórek mięśnia sercowego przyczyniają się do reaktywnej hyperemii w różnym stopniu, w zależności od czasu trwania okluzji naczyń wieńcowych.

Tlenek azotu jest jedynym przekaźnikiem reaktywnej hyperemii wywołanej 1-5 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego tak, jak jest jedynym przekaźnikiem działania naczyniorozszerzającego małych dawek bradykininy oraz acetylocholiny i substancji P w pełnym zakresie ich dawek.

W reaktywnej hyperemii wywołanej ≥ 15 sekundowym zamknięciem przepływu wieńcowego obok tlenku azotu bierze udział adenozyne, przy czym jej kardioprotekcyjne działanie staje się wyraźne dopiero w RH wywołanej okluzją 30 sekundową.

W sercu świnki morskiej prostanoidy (PGI_2 , PGE_2) nie uczestniczą ani w reaktywnym rozszerzeniu naczyń, ani w rokurczu naczyń wywołanym przez substancje naczyniorozszerzające o mechanizmie działania zależnym od obecności śródbłonna naczyniowego.

VII. STRESZCZENIE

Reaktywna hyperemia mięśnia sercowego - jeden z mechanizmów autoregulacyjnych krążenia wieńcowego - może mieć znacznie fizjologiczne i diagnostyczne. Pomimo tego dotychczasowe badania nad przekaźnikami tego zjawiska ciągle jeszcze nie przyniosły ostatecznego rozstrzygnięcia.

W tej rozprawie doktorskiej podjęto próbę wyjaśnienia roli adenozyliny, prostanoidów i tlenu azotu w reaktywnej hyperemii mięśnia sercowego świnki morskiej. Punktem wyjścia były badania nad odczynowością krążenia wieńcowego serca świnki morskiej na substancje o mechanizmie działania zależnym i niezależnym od obecności śródbłonna naczyniowego. Doświadczenia przeprowadzono przy użyciu izolowanego serca świnki morskiej, które perfundowano płynem Krebsa-Henseleita metodą Langendorffa.

W przeprowadzonych badaniach farmakologicznych stosowano; inhibitor syntazy tlenu azotu, NO_2Arg , inhibitor cyklooksigenazy kwasu arachidonowego, indometacynę, oraz nioselektywnego antagonistę receptorów adenozylinowych 8-fenyloteofilinę.

Wykazano, że NO jest jedynym przekaźnikiem działania naczyniorozszerzającego acetylocholino, substancji P, małych dawek bradykininy, natomiast mechanizm rozkurczowego działania wysokich dawek bradykininy jest odmienny.

Ponadto zaobserwowano, że w izolowanym sercu świnki morskiej występuje szybka tolerancja na naczyniorozszerzające działanie nitrogliceryny, co czyni ten model korzystnym do dalszych badań nad tym zjawiskiem.

Reaktywną hyperemię wywoływano zamknięciem przepływu wieńcowego na okres od 1 sekundy do 2 minut i wykazano, że w izolowanym sercu świnki morskiej NO oraz adenozylina, a nie prostanoidy, są przekaźnikami reaktywnej hyperemii, oraz, że ich udział zależy od czasu trwania okluzji przepływu wieńcowego.

W tej pracy po raz pierwszy wykazano że NO jest jedynym przekaźnikiem RH wywołanej

bardzo krótkim zamknięciem przepływu wieńcowego, natomiast w RH wywołanej dłuższym zamknięciem przepływu wieńcowego uczestniczy adenozyina.

Prostanoidy, przynajmniej w sercu świnki morskiej, nie są mediatorami naczyniorozszerzającymi. Wyniki przedstawionych w tej rozprawie doktorskiej badań biochemicznych były w zgodzie z wnioskami wysuniętymi na podstawie badań farmakologicznych, bowiem zaobserwowano wzrost poziomu cGMP lecz nie cAMP w efluencie z naczyń wieńcowych w czasie RH.

Reasumując w izolowanym sercu świnki morskiej tlenek azotu i adenozyina w wymiarze reaktywnej hyperemii stają się uzupełniającymi się partnerami. Tlenek azotu - jako "wywoływacz" RH i przekaźnik natychmiastowego reagowania na przerwę w przepływie wieńcowym oraz adenozyina jako "utrwalacz" RH i przekaźnik przychodzący z pomocą NO, gdy niedotlenienie mięśnia sercowego przedłuża się. Mechanizm uwalniania przekaźników RH pozostaje jednak ciągle w kręgu hipotez.

Być może środki farmakologiczne potęgujące RH, a zatem przedłużające lub wzmacniające działanie tlenu azotu lub(i) adenozyiny będą wykazywać korzystne działanie kardioprotekcyjne.



Oskar Langendorff

1.02.1853-10.05.1908

"Nie żałuję trudu włożonego w stworzenie tej techniki która mimo że liczyłem się z pewnym rozczarowaniem zakończyła się sukcesem i mam nadzieje że mój wysilek pozwoli otworzyć wdzięczne pole do dalszych badań" (Langendorff, 1895, str. 292)

VIII. POSŁOWIE

Nie chcąc zanudzać potencjalnego czytelnika przydługim wstępem historycznym, spełniając jednak wewnętrzną potrzebę oddania hołdu twórcy modelu izolowanego serca, Oskarowi Langendorffowi, kreślę te parę słów o jego modelu i przeprowadzanych na nim doświadczeniach w epilogu mojej rozprawy doktorskiej.

Oskar Langendorff był badaczem o wszechstronnych zainteresowaniach. Opublikowane przez niego oryginalne prace (ponad 60) dotyczyły wielu zagadnień fizjologii serca, czynności układu nerwowego, fizjologii oddychania i trawienia. Z dzisiejszej perspektywy jednak, bez wątpienia najwartościowsze były osiągnięcia Langendorffa w zakresie fizjologii serca; stworzenie modelu izolowanego serca (Langendorff, 1895) i przeprowadzenie pierwszych badań fizjologicznych i farmakologicznych przy jego zastosowaniu (Langendorff, 1895; Langendorff, 1897; Langendorff, 1898; Langendorff, 1899).

Zasada modelu izolowanego serca była niezwykle prosta. Serce było perfundowane natlenowaną i ogrzaną krwią przez aortę w kierunku serca. W ten sposób krew przy zamkniętych zastawkach półksiężycowatych aorty wpływała do naczyń wieńcowych i odżywiała serce. Poprzednicy Langendorffa, którzy stosowali już od połowy XIX wieku model perfundowanego serca żaby uważali, że serce ssaków (i innych zwierząt stałocieplnych) nie nadaje się do badań *ex vivo* (Ludwig & Schmidt, 1868) ze względu na inną anatomię ich serca i skomplikowany układ naczyń wieńcowych. Langendorff jako pierwszy zrozumiał, że w przeciwieństwie do serca żaby odżywianego krwią komorową, serce ssaków odżywiane jest przez naczynia wieńcowe i sztuczna perfuzja tych naczyń pozwala na kilkugodzinne badania serca ssaków poza ich organizmem i daje "prawdziwą przyjemność patrzenia na jego regularne bicie" (Langendorff, 1895).

Stosując stworzoną przez siebie technikę Langendorff opisał działanie na serce

atropiny, muskaryny i chlorku potasu oraz szczegółowo zbadal jaki wpływ na pracę serca mają drażnienie nerwu błędnego (Langendorff, 1895), zmiana temperatury (Langendorff, 1895; Langendorff, 1897), i elektryczna stymulacja serca (Langendorff, 1898). W tej ostatniej pracy Langendorff jako pierwszy opisał zjawisko wzmocnienia kompensacyjnego skurczów serca. Najciekawsze dla mnie są jednak prace Langendorffa poświęcone skutkom zatrzymania przepływu wieńcowego w izolowanym sercu. Do jego czasów uważano (Conheim & Schulthess-Rechberg, 1885; Michaelis, 1885), że krótkotrwałe zatrzymanie przepływu wieńcowego prowadzi do nieodwracalnego zaburzenia pracy serca nazywanego przez niektórych autorów *delirium cordis* (Michaelis, 1885). W doświadczeniach przeprowadzonych na sercach kota, psa i królika Langendorff pokazał, że czasowe zatrzymanie przepływu wieńcowego na 4-10 min wywoływało zwolnienie czy nawet zatrzymanie pracy serca, ale na pewno nie prowadziło do nieodwracalnego jego zatrzymania. Po powtórnym otwarciu przepływu serce funkcjonowało normalnie. Langendorff uważał, że krótkotrwałe zatrzymanie przepływu wieńcowego w ogóle nie działa szkodliwie na serce, "serce bez większej szkody może znosić wielokrotne zatrzymanie przepływu" (Langendorff, 1895). Podsumowując te badania Langendorff podważał propagowaną przez współczesnych mu badaczy (Bernstein, 1894) opinię, że czynność serca jest stymulowana obecnością krwi w komorze (w stworzonym przez niego modelu izolowanego serca lewa komora jest pusta). Twierdził natomiast, że serce ssaków bije dzięki perfuzji naczyń wieńcowych i przerwanie tej perfuzji prowadzi do zatrzymania akcji serca. Dzisiaj te badania wydają nam się niezbyt odkrywcze, jednak w odniesieniu do ówczesnego stanu wiedzy na pewno były to badania pionierskie. Intrygujące jest przypuszczenie, że gdyby w swoich doświadczeniach Langendorff mierzył jeszcze przepływ wieńcowy to reaktywna hyperemia mięśnia sercowego - przedmiot mojej rozprawy doktorskiej - mogłaby zostać odkryta o 50 lat wcześniej. Jak niewiele dzieliło Langendorffa od tego odkrycia może świadczyć fakt, że w późniejszych doświadczeniach Langendorff mierzył przepływ wieńcowy. Niestety nie powtórzył już wyżej opisanych

doświadczeń z zatrzymywaniem przepływu wieńcowego. Warto dodać, że ten niemiecki uczony był pierwszym, który opisał związaną z rytmem pracy serca fazowość przepływu wieńcowego (Langendorff, 1899).

Stworzony przez Langendorffa model szybko znalazł zastosowanie w wielu laboratoriach fizjologicznych i farmakologicznych. Przez wielu autorów był ulepszany i modyfikowany (Gottlieb & Magnus, 1904; Heymans & Kochmann, 1904; Rusch, 1898). Jeszcze w zeszłym wieku wykazano, że izolowane serce równie dobrze jak krwią, która do perfuzji izolowanego serca stosował Langendorff, można perfundować natlenowanym płynem Ringera (Rusch, 1898), a zaraz potem, że rejestrację pracy lewej komory można udoskonalić przez umieszczenie w lewej komorze balonu gumowego (Gottlieb & Magnus, 1904; Heymans & Kochmann, 1904).

Dzisiaj model izolowanego serca ma ogromne zastosowanie w badaniach fizjologicznych i farmakologicznych i jestem przekonany, że Oskar Langendorff zasłużył, by jego imię przeszło do historii nauki, a stworzony przez niego model izolowanego serca nazywany był modelem Langendorffa bez względu na modyfikacje jakie się wtórnie pojawiły i mogą jeszcze pojawić.

Wszystkie doświadczenia mojej rozprawy doktorskiej przeprowadziłem przy użyciu metody którą wymyślił Langendorff prawie 100 lat temu, czyżby więc *nihil novi sub sole*? A jednak czułość aparatury, rozwiązania elektroniczne i możliwość rejestracji i interpretacji wyników przy pomocy komputera przekonują mnie, że nauka przez te 100 lat dokonała ogromnego skoku naprzód również w rozwiązaniach metodycznych. Konkluzja ta mogłaby się wydać banalna, gdyby nie fakt, że sam się o tym w pełni przekonałem, jednego dnia brnąć przez teksty Langendorffa, a drugiego dnia stosując rozwiązania metodyczne zlokalizowane w pół drogi pomiędzy czasami Langendorffa a współczesnością (Addendum), które nie pozwoliły mi uchwycić zjawiska reaktywnej hyperemii występującej po zamknięciu przepływu wieńcowego na kilka sekund. Zbadanie roli tlenu azotu i roli adenozyliny w różnych formach reaktywnej hyperemii stało się dopiero możliwym przy

zastosowaniu aparatu Langendorffa/HSE w którym myśl twórcy modelu izolowanego serca została uskrzydłona najnowszymi (i drogimi) rozwiązaniami technicznymi.

Najważniejsze prace Langendorffa oraz cytowanych w posłowie współczesnych jemu badaczy.

Bernstein J. Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart, 1894.

Conheim J. & Schulthess-Rechberg V. Ueber die Folgen der Kranzarterenverschliessung für das Herz. Virchow's Archiv f. path. Anat. 1885;85:503.

Gottlieb R. & Magnus R. Digitalis und Herzarbeit. Nach Versuchen am überlebenden Warmblüterherzen. Arch. Exper. Path. und Pharmacol. 1904;51:30.

Heymans J. F. & Kochmann M. Une nouvelle methode de circulation artificielle a travers le coeur isole de mammifere. Arch. Int. Pharmacodyn. Therap. 1904;13:379-386.

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflügers Arch. ges. Physiol. 1895;61:291-332.

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. II Abhandlung. Ueber den Einfluss von Wärme und Kälte auf des Herz der warmblütigen Thiere. Pflügers Arch. ges. Physiol. 1897;66:355-400.

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. III. Abhandlung. Vorübergehende Unregelmässigkeiten des Herzschlages und ihre Ausgleichung. Pflügers Arch. ges. Physiol. 1898;70:473-486.

Langendorff O. Zur Kenntniss des Blutlaufs in den Kranzgefässen des Herzens. Pflügers Arch. ges. Physiol. 1899;78:423-440.

Ludwig C. & Schmidt A. Das Verhalten der Gase, welche mit dem Blute durch dem reizbaren Säugethiermuskel strömen. Sächs. Sitz. -Ber. 1868;15:

Michaelis M. Ueber einige Ergebnisse bei Ligatur der Kranzarterien des Herzens. Zeitschr. f. Klin. Medicin. 1885;24:270.

Rusch H. Experimentalle Studien über die Ernährung des isolierten Säugetierherzens. Ebenda 1898;73:535-554.

8.1 Opis modelu izolowanego serca stworzonego przez Langendorffa (Langendorff, 1895).

Natlenowana i ogrzana krew z naczynia B pod wpływem panującego w tym naczyniu ciśnienia (ciśnienia perfuzyjnego) wpływała przez aortę do naczyń wieńcowych.

Gdy poziom krwi w naczyniu B obniżał się krew uzupełniano przez naczynie K.

Ciśnienie perfuzyjne wytwarzane było w naczyniu A a niewielkie jego wahania zapewniał prosty układ regulacyjny.

Woda wpływająca do szczelnie zamkniętego naczynia A (przy zamkniętym odpływie b) wytwarzała w nim ciśnienie powietrza nad poziomem płynu. To samo ciśnienie panowało nad powierzchnią wpływającej do serca krwi znajdującej się w naczyniu B (połączonym z naczyniem A). Nawet niewielki wzrost ciśnienia w naczyniu A powodował podniesienie słupka rtęci (C) i zamknięcie obwodu elektrycznego stworzonego przez rtęć w manometrze i dwa druciki platynowe (fig 2) co pociągało za sobą zamknięcie obiegu prądu w przekaźniku telegraficznym (R) i wytworzenie zamykającego dopływ wody (a) pola magnetycznego w elektromagnesie (E). Skutkiem tego ciśnienie perfuzyjne wracało do wartości wyjściowych.

Stała temperatura (D) perfundującej serce krwi utrzymywana była za pomocą palnika Bunsena (O) który ogrzewał do temp 40-45°C wypełnioną wodą wannę (N).

W koniuszek serca wbity był haczyk połączony nitką z układem zapisującym pracę lewej komory (cienka błona kauczukowa naciągnięta na kolbkowato rozszerzoną szklaną rurkę fig.3., lub później opracowany system dwóch błon kauczukowych fig.1)

IX. PIŚMIENNICTWO

- Ahn H., Lindhagen J. & Lundgren O.(1986) Measurement of colonic blood flow with laser Doppler flowmetry. *Scand. J. Gastroenterol.* 21:871-880.
- Aisaka K., Gross S. S., Griffith O. W. & Levi R.(1989) NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem. Biophys. Res Commun.* 160:881-886.
- Alexander R. W., Kent K. M., Pisano J. J., Keiser H. R. & Cooper T.(1975) Regulation of postocclusive hyperemia by endogenously synthesized prostaglandins in the dog heart. *J. Clin. Invest.* 55:1174-1181.
- Amezcuca J. L., Dusting G. J., Palmer R. M. & Moncada S.(1988) Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator. *Br. J Pharmacol.* 95:830-834.
- Amezcuca J. L., Palmer R. M., de Souza B. M. & Moncada S.(1989) Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J Pharmacol.* 97:1119-1124.
- Axelsson K. L. & Karlsson J. O.(1984) Nitroglycerin tolerance in vitro: effect on cGMP turnover in vascular smooth muscle. *Acta Pharmacol. Toxicol. Copenh.* 55:203-210.
- Azuma H., Ishikawa M. & Sekizaki S.(1986) Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J Pharmacol.* 88:411-415.
- Bache R. J., Cobb F. R. & Greenfield J. C. J.(1973) Effects of increased myocardial oxygen consumption on coronary reactive hyperemia in the awake dog. *Circ. Res* 33:588-596.
- Bache R. J., Cobb F. R., Ebert P. A. & Greenfield J. C.(1975a) Neurogenic influences on the coronary vascular response to ischemia in the awake dog. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 69:421-428.
- Bache R. J., Ball R. M., Cobb F. R., Rembert J. C. & Greenfield J. C. J.(1975b) Effects of nitroglycerin on transmural myocardial blood flow in the unanesthetized dog. *J. Clin. Invest.* 55:1219-1228.
- Bache R. J. & Dymek D. J.(1982) Effect of diltiazem on myocardial blood flow. *Circulation* 65:119-126.
- Bache R. J. & Hess D. S.(1986) Reactive hyperemia following one-beat coronary occlusions in the awake dog. *Am. J. Physiol.* 250:H474-H481.
- Bache R. J.(1989) Effects of calcium entry blockade on myocardial blood flow. *Circulation* 80:IV40-IV46.
- Badeer H. S.(1965) Influence of cooling the heart on reactive hyperaemia of the coronary bed in the heart-lung preparation. *Cir. Res.* 16:19-25.
- Balwierczak J. L., Sharif R., Krulan C. M., Field F. P., Weiss G. B. & Miller M. J.(1991) Comparative effects of a selective adenosine A2 receptor agonist, CGS 21680, and nitroprusside in vascular smooth muscle. *Eur. J Pharmacol.* 196:117-123.
- Bardenheuer H. & Schrader J.(1983) Relationship between myocardial oxygen consumption, coronary flow, and adenosine release in an improved isolated working heart preparation of guinea pigs. *Circ. Res* 52:263-271.
- Bardenheuer H. & Schrader J.(1986) Supply-to-demand ratio for oxygen determines formation of adenosine by the heart. *Am. J Physiol.* 250:H173-H180.

- Bassenge E. & Heusch G.(1990) Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116:77-165.
- Baydoun A. R. & Woodward B.(1991) Effects of bradykinin in the rat isolated perfused heart: role of kinin receptors and endothelium-derived relaxing factor. *Br. J Pharmacol.* 103:1829-1833.
- Bayliss W. M.(1902) On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol. Lond.* 28:202-231.
- Belardinelli L., Belloni F. L., Rubio R. & Berne R. M.(1980) Atrioventricular conduction disturbances during hypoxia. Possible role of adenosine in rabbit and guinea pig heart. *Circ. Res* 47:684-691.
- Belardinelli L., Mattos E. C. & Berne R. M.(1981) Evidence for adenosine mediation of atrioventricular block in the ischemic canine myocardium. *J Clin. Invest.* 68:195-205.
- Berne R. M.(1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204:317-322.
- Berne R. M., Rubio R., Duling B. R. & Wiedmeier V. T.(1970) Effects of acute and chronic hypoxia on coronary blood flow. *Adv. Cardiol.* 5:56-66.
- Berne R. M.(1980) The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res* 47:807-813.
- Berne RM, Levy MN: *Principles of Physiology*; in The C.V.Mosby Company (ed): . 1990, pp 279-296.
- Bernstein E. F. & Fronck A.(1982) Current status of noninvasive tests in the diagnosis of peripheral arterial disease. *Surg. Clin. North Am.* 62:473-487.
- Bittar N. & Pauly T. J.(1971) Myocardial reactive hyperemia responses in the dog after aminophylline and lidoflazine. *Am. J. Physiol.* 220:812-815.
- Bjornberg J., Albert U. & Mellander S.(1990) Resistance responses in proximal arterial vessels, arterioles and veins during reactive hyperaemia in skeletal muscle and their underlying regulatory mechanisms. *Acta Physiol. Scand.* 139:535-550.
- Block A. J., Poole S. & Vane J. R.(1974) Modification of basal release of prostaglandins from rabbit isolated hearts. *Prostaglandins* 7:473-486.
- Boesgaard S., Petersen J. S., Aldershvile J., Poulsen H. E. & Flachs H.(1991) Nitrate tolerance: effect of thiol supplementation during prolonged nitroglycerin infusion in an in vivo rat model. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 258:851-856.
- Boeynaems J. M. & Pearson J. D.(1990) P2 purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11:34-37.
- Borst M. M. & Schrader J.(1991) Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ. Res* 68:797-806.
- Bos G. M., Slaaf D. W., Majoor G. D., Tangelder G. J. & Reneman R. S.(1987) A model for chronic study of vascular morphology and reactivity of physically intact rat skin microcirculation. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 6:371-380.
- Bowmer C. J. & Yates M. S.(1989) Therapeutic potential for new selective adenosine receptor ligands and metabolism inhibitors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10:339-341.

- Brown L. A., Humphrey S. M. & Harding S. E.(1990) The anti-adrenergic effect of adenosine and its blockade by pertussis toxin: a comparative study in myocytes isolated from guinea-pig, rat and failing human hearts. *Br. J Pharmacol.* 101:484-488.
- Buga G. M., Gold M. E., Fukato J. M. & Ignarro L. J.(1991) Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17:187-193.
- Busse R., Forstermann U., Matsuda H. & Pohl U.(1984) The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. *Pflugers Arch.* 401:77-83.
- Busse R., Pohl U. & Luckhoff A.(1989) Mechanisms controlling the production of endothelial autacoids. *Z. Kardiol.* 78 Suppl 6:64-69.
- Busse R., Luckhoff A. & Mulsch A.(1991) Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic. Res Cardiol.* 86 Suppl 2:7-16.
- Cevese A. & Cerutti G.(1981) Interference of sympathetic innervation with reactive hyperemia in dog's skeletal muscle. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 57:1395-1401.
- Cherry P. D., Furchgott R. F., Zawadzki J. V. & Jothianandan D.(1982) Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* 79:2106-2110.
- Christie M. I. & Lewis M. J.(1991) A comparison of endothelium-derived relaxing factor activity in the coronary and renal arteries of the pig. *Eur. J Pharmacol.* 202:143-149.
- Coffman J. D. & Gregg D. E.(1960) Reactive hyperemia characteristics of the myocardium. *Am. J Physiol.* 199(6):1143-1149.
- Coffman J. D. & Gregg D. E.(1961) Oxygen metabolism and oxygen debt repayment after myocardial ischemia. *Am. J Physiol.* 201(5):881-887.
- Conheim J. E.(1872) Untersuchungen uber die Embolischen Prozesse. Berlin, Hirschwald 33-40.
- Cowan C. L. & Cohen R. A.(1991) Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am. J Physiol.* 261:H830-H835.
- Crossman D. C., Larkin S. W., Fuller R. W., Davies G. J. & Maseri A.(1989) Substance P dilates epicardial coronary arteries and increases coronary blood flow in humans. *Circulation* 80:475-484.
- Curnish R. R., Berne R. M. & Rubio R.(1972) Effect of aminophylline on myocardial reactive hyperemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141:593-598.
- Cushing D. J., Brown G. L., Sabouni M. H. & Mustafa S. J.(1991) Adenosine receptor-mediated coronary artery relaxation and cyclic nucleotide production. *Am. J Physiol.* 261:H343-H348.
- de Deckere E. A. M., Nugteren D. H. & Ten Hoor F.(1977) Prostacyclin is the major prostaglandin released from the isolated perfused rabbit and rat heart. *Nature* 268:160-163.
- de Nucci G., Gryglewski R. J., Warner T. D. & Vane J. R.(1988) Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* 85:2334-2338.
- Degenring F. H., Curnish R. R., Rubio R. & Berne R. M.(1976) Effect of dipyridamole on myocardial adenosine metabolism and coronary flow in hypoxia and reactive hyperemia in the isolated perfused guinea pig heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 8:877-888.

- Deussen A. & Schrader J.(1991) Cardiac adenosine production is linked to myocardial pO₂. *J Mol. Cell Cardiol.* 23:495-504.
- Dobson J. G. J.(1983a) Mechanism of adenosine inhibition of catecholamine-induced responses in heart. *Circ. Res* 52:151-160.
- Dobson J. G. J.(1983b) Adenosine reduces catecholamine contractile responses in oxygenated and hypoxic atria. *Am. J Physiol.* 245:H468-H474.
- Döring H. J., Dehnert H. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. D-7806 March, Germany, Biomesstechnik-Verlag, 1988.
- Drudy A. N. & Shent-Gyorgyi A.(1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. Lond.* 68:213-237.
- Dupuis J., Lalonde G., Lemieux R. & Rouleau J. L.(1990) Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure: role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acetylcysteine [see comments]. *J Am. Coll. Cardiol.* 16:923-931.
- Eikens E. & Wilcken D. E.(1973) Myocardial reactive hyperaemia in conscious dogs: effect of dipyridamole and aminophylline on responses to four- and eight-second coronary artery occlusions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 51:617-630.
- Eikens E. & Wilcken D. E.(1974) Reactive hyperemia in the dog heart. Effects of temporarily restricting arterial inflow and of coronary occlusions lasting one and two cardiac cycles. *Circ. Res* 35:702-712.
- Ernest J. T.(1976) Optic disc blood flow. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 96:348-351.
- Evoniuik G., Jacobson K. A., Shamim M. T., Daly J. W. & Wurtman R. J.(1987) A1- and A2-selective adenosine antagonists: in vivo characterization of cardiovascular effects. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 242:882-887.
- Fagrell B.(1985) Dynamics of skin microcirculation in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 Suppl 3:S53-S58.
- Feelisch M. & Kelm M.(1991) Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 180:286-293.
- Feigl E. O.(1983) Coronary Physiology. *Physiological Reviews* 63:72-95.
- Feldman R. L., Nichols W. W., Pepine C. J., Conetta D. A. & Conti C. R.(1979) The coronary hemodynamics of left main and branch coronary stenoses. The effects of reduction in stenosis diameter, stenosis length, and number of stenoses. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 77:377-388.
- Forster S., Woditsch I., Schroder H. & Schror K.(1991) Reduced nitric oxide release causes nitrate tolerance in the intact coronary circulation. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 17:867-872.
- Forstermann U., Schmidt H. H., Pollock J. S., Sheng H., Mitchell J. A., Warner T. D., Nakane M. & Murad F.(1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42:1849-1857.
- Fossel E. T., Morgan H. E. & Ingwall J. S.(1980) Measurement of changes in high-energy phosphates in the cardiac cycle by using gated ³¹P nuclear magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3654-3658.
- Fraenkel G. J. & Douglas B. S.(1969) Reactive hyperemia after aortic occlusion in sheep. *Surg. Gynecol.*

Obstet. 129:98-102.

Franco Cereceda A. & Lundberg J. M.(1989) Post-occlusive reactive hyperaemia in the heart, skeletal muscle and skin of control and capsaicin-pre-treated pigs. *Acta Physiol. Scand.* 137:271-277.

Fulton D., McGiff J. C. & Quilley J.(1992) Contribution of NO and cytochrome P450 to the vasodilator effect of bradykinin in the rat kidney. *Br. J Pharmacol.* 107:722-725.

Furchgott R. F. & Zawadzki J. V.(1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

Furchgott R. F.(1984) The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:175-197.

Gardiner S. M., Compton A. M., Bennett T., Palmer R. M. & Moncada S.(1990) Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 15:486-492.

Garris D. R., Ingenito A. J., McConnaughey M. M. & Dar M. S.(1984) Regulation of estrogen-induced uterine hyperemia and contractility in the guinea pig: cholinergic modulation of an alpha-adrenergic response. *Biol. Reprod.* 30:863-868.

Gentry R. M. & Johnson P. C.(1972) Reactive hyperemia in arterioles and capillaries of frog skeletal muscle following microocclusion. *Circ. Res* 31:953-965.

Gerritsen M. E. & Cheli C. D.(1983) Arachidonic acid and prostaglandin endoperoxide metabolism in isolated rabbit and coronary microvessels and isolated and cultivated coronary microvessel endothelial cells. *J Clin. Invest.* 72:1658-1671.

Giles R. W. & Wilcken D. E.(1977a) Reactive hyperaemia in the dog heart: inter-relations between adenosine, ATP, and aminophylline and the effect of indomethacin. *Cardiovasc. Res* 11:113-121.

Giles R. W. & Wilcken D. E.(1977b) Reactive hyperaemia in the dog heart: evidence for a myogenic contribution. *Cardiovasc. Res* 11:64-73.

Gourley J. K. & Heistad D. D.(1984) Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am. J. Physiol.* 246:H52-H58.

Griffith S. G., Meghji P., Moody C. J. & Burnstock G.(1981) 8-phenyltheophylline: a potent P1-purinoceptor antagonist. *Eur. J Pharmacol.* 75:61-64.

Gryglewski R. J., Bunting S., Moncada S., Flower R. J. & Vane J. R.(1976) Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandins peroxides. *Prostaglandins* 12:685-713.

Gryglewski R. J., Korbut R., Trabka Janik E., Zembowicz A. & Trybulec M.(1989) Interaction between NO donors and iloprost in human vascular smooth muscle, platelets, and leukocytes. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 14 Suppl 11:S124-S128.

Gryglewski R. J.(1990) Nitric oxide and atherosclerosis. *Thromb. Haemorrh. Disorders* 2/1:1-9.

Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR: Prostacyclin: From discovery to clinical application; in Rubanyi GM (ed): Cardiovascular Significance of Endothelium-Derived Vasoactive Factors. Mount Kisco NY, Futura Publishing Co., 1991, pp 3-37.

Gryglewski R. J., Zembowicz A., Salvemini D., Taylor G. W. & Vane J. R.(1992) Modulation of the

pharmacological actions of nitrovasodilators by methylene blue and pyocyanin. *Br. J Pharmacol.* 106:838-845.

Gryglewski R. J. & Swies J.(1992) Cardioprotection by molsidomine and iloprost in myocardial ischemia in anaesthetized cats. *Agents Actions Suppl.* 37:265-272.

Guidelines for coronary angiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee on Coronary Angiography). *Circulation* 76:963A-977A.

Hamilton T. C.(1976) Hyperaemic responses in two vascular beds of the anaesthetised cat. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 219:230-242.

Hartman J. C. & Warltier D. C.(1990) A model of multivessel coronary artery disease using conscious, chronically instrumented dogs. *J. Pharmacol. Methods* 24:297-310.

Hayashi Y., Tomoike H., Nagasawa K., Yamada A., Nishijima H., Adachi H. & Nakamura M.(1988) Functional and anatomical recovery of endothelium after denudation of coronary artery. *Am. J. Physiol.* 254:H1081-H1090.

Herbaczyńska Cedro K. & Vane J. R.(1974) Prostaglandins as mediators of reactive hyperaemia in kidney. *Nature* 247:492.

Hess D. S. & Bache R. J.(1976) Transmural distribution of myocardial blood flow during systole in the awake dog. *Circ. Res* 38:5-15.

Higuchi Y.(1985) Influence of arterial occlusion on hematocrit and plasma protein concentration of femoral venous blood in rabbit. *Jpn. J. Physiol.* 35:503-511.

Hillis W. S. & Friesinger G. C.(1976) Reactive hyperemia: an index of the significance of coronary stenoses. *Am. Heart J.* 92:737-740.

Hilton R. & Eichholtz F.(1925) The influence of chemical factors on the coronary circulation. *J. Physiol. Lond.* 59:413-425.

Hintze T. H. & Kaley G.(1977) Prostaglandins and the control of blood flow in the canine myocardium. *Circ. Res* 40:313-320.

Hintze T. H. & Vatner S. F.(1984) Reactive dilation of large coronary arteries in conscious dogs. *Circ. Res* 54:50-57.

Hitchon P. W., Dyste G. N., Osenbach R. K., Todd M. M., Yamada T. & Jensen A. E.(1990) Spinal cord blood flow in response to focal compression. *J. Spinal. Disord.* 3:210-219.

Honda N., Aizawa C. & Yoshitoshi Y.(1968) Postocclusive reactive hyperemia in the rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* 215:190-196.

Hopwood A. M., Lincoln J., Kirkpatrick K. A. & Burnstock G.(1989) Adenosine 5'-triphosphate, adenosine and endothelium-derived relaxing factor in hypoxic vasodilatation of the heart. *Eur. J Pharmacol.* 165:323-326.

Hottenstein O. D., Pawlik W. W., Remak G. & Jacobson E. D.(1992) Capsaicin-sensitive nerves modulate reactive hyperemia in rat gut. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199:311-320.

Ignarro L. J., Lipton H., Edwards J. C., Baricos W. H., Hyman A. L., Kadowitz P. J. & Gruetter C.

- A.(1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 218:739-749.
- Ignarro L. J., Byrns R. E., Buga G. M. & Wood K. S.(1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res* 61:866-879.
- Ignarro L. J.(1990) Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16:477-483.
- Ishii K., Chang B., Kerwin J. F. J., Huang Z. J. & Murad F.(1990) N omega-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J Pharmacol.* 176:219-223.
- Jageneau A. H., Schaper W. K. & Van Gerven W.(1969) Enhancement of coronary reactive hyperemia in unanesthetized pigs by an adenosine-potentiator (Lidoflazine). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 265:16-23.
- Johnson P. C.(1964) Review of previous studies and current theories of autoregulation. *Cir. Res.* 15 (Suppl.1):I2-9.
- Johnson P. C.(1991) The myogenic response. *News in Physiological Sciences* 6:41-42.
- Juhran W., Voss E. M., Dietmann K. & Schaumann W.(1971) Pharmacological effects on coronary reactive hyperemia in conscious dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 269:32-47.
- Kaley G., Hintze T. H., Panzenbeck M. & Messina E. J.(1985) Role of prostaglandins in microcirculatory function. *Adv. Prostaglandin. Thromboxane. Leukot. Res* 13:27-35.
- Kanatsuka H., Sekiguchi N., Sato K., Akai K., Wang Y., Komaru T., Ashikawa K. & Takishima T.(1992) Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ. Res* 71:912-922.
- Katz L. N. & Lindner E.(1939) Quantitative relationship between reactive hyperemia and the myocardial ischemia which it follows. *Am. J. Physiol.* 126:283-288.
- Kelm M. & Schrader J.(1988) Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart. *Eur. J Pharmacol.* 155:317-321.
- Kelm M. & Schrader J.(1990) Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res* 66:1561-1575.
- Kiel J. W., Riedel G. L., DiResta G. R. & Shepherd A. P.(1985) Gastric mucosal blood flow measured by laser-Doppler velocimetry. *Am. J. Physiol.* 249:G539-G545.
- Kimura T. & Satoh S.(1985) Inhibitory effect of quinacrine on myocardial reactive hyperemia in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232:269-274.
- Klabunde R. E. & Mayer S. E.(1979) Effects of ischemia on tissue metabolites in red (slow) and white (fast) skeletal muscle of the chicken. *Circ. Res* 45:366-373.
- Kontos H. A., Wei E. P., Kukreja R. C., Ellis E. F. & Hess M. L.(1990) Differences in endothelium-dependent cerebral dilation by bradykinin and acetylcholine. *Am. J Physiol.* 258:H1261-H1266.
- Kostic M. M. & Schrader J.(1992) Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ. Res* 70:208-212.

- Kraemer R. J., Phernetton T. M. & Folts J. D.(1976) Prostaglandin-like substances in coronary venous blood following myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199:611-619.
- Kroese A. J.(1977) The contribution of muscle and skin circulation to reactive hyperaemia in the human lower limb. *Vasa.* 6:9-14.
- Kroll K., Schrader J., Piper H. M. & Henrich M.(1987) Release of adenosine and cyclic AMP from coronary endothelium in isolated guinea pig hearts: relation to coronary flow. *Circ. Res* 60:659-665.
- Kurtz A.(1987) Adenosine stimulates guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *J Biol. Chem.* 262:6296-6300.
- Kvietys P. R., McLendon J. M., Bulkley G. B., Perry M. A. & Granger D. N.(1982) Pancreatic circulation: intrinsic regulation. *Am. J. Physiol.* 242:G596-G602.
- Lamontagne D., Pohl U. & Busse R.(1992a) Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circ. Res* 70:123-130.
- Lamontagne D., Konig A., Bassenge E. & Busse R.(1992b) Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 20:652-657.
- Lansman J. B., Hallam T. J. & Rink T. J.(1987) Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325:811-813.
- Lee L., Bruner C. A. & Webb R. C.(1990) Prostanoids contribute to endothelium-dependent coronary vasodilation in guinea pigs. *Blood Vessels* 27:341-351.
- Lefer A. M., Ogletree M. L., Smith J. B., Silver M. J., Nicolaou K. C., Barnette W. E. & Gasic G. P.(1978) Prostacyclin: A potentially valuable agent for preserving myocardial tissue in acute myocardial ischemia. *Science* 200:52-56.
- Lembeck F. & Donnerer J.(1981) Postocclusive cutaneous vasodilatation mediated by substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 316:165-171.
- Levy B. I., Pinard E., Michel J. B., Tedgui A. & Seylaz J.(1986) Transmural gradient of tissue gas tensions in the canine left ventricular myocardium during coronary clamping and reactive hyperemia. *Pflugers Arch.* 407:388-395.
- Lewis T. & Grant R.(1925) Observations upon reactive hyperaemia in man. *Heart* 12:73-120.
- Lombard J. H. & Duling B. R.(1981) Multiple mechanisms of reactive hyperemia in arterioles of the hamster cheek pouch. *Am. J. Physiol.* 241:H748-H755.
- Luckhoff A., Pohl U. & Busse R.(1986) Increased free calcium in endothelial cells in response to hypoxia and restitution of normoxia. *Pflugers Arch.* 406(Suppl 1):R46.
- Marcus M., Wright C., Doty D., Eastham C., Laughlin D., Krumm P., Fastenow C. & Brody M.(1981) Measurements of coronary velocity and reactive hyperemia in the coronary circulation of humans. *Circ. Res* 49:877-891.
- Marletta M. A., Yoon P. S., Iyengar R., Leaf C. D. & Wishnok J. S.(1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27:8706-8711.

- Meininger G. A.(1987) Responses of sequentially branching macro- and microvessels during reactive hyperemia in skeletal muscle. *Microvasc. Res* 34:29-45.
- Merrill G. F. & Young M. A.(1981) The influence of concurrently administered theophylline, ouabain and hypocapnia on coronary flow perturbations in the perfused guinea pig heart. *Blood Vessels* 18:1-8.
- Messina E. J., Weiner R. & Kaley G.(1977) Arteriolar reactive hyperemia: modification by inhibitors of prostaglandin synthesis. *Am. J. Physiol.* 232:H571-H575.
- Minkes M. S., Douglas J. R. & Needleman P.(1973) Prostaglandin release by the isolated perfused rabbit heart. *Prostaglandins* 3:439-443.
- Miyajima S., Aizawa Y. & Shibata A.(1989) Attenuation of reactive hyperemia caused by aspirin in canine coronary artery. *Angiology.* 40:824-829.
- Moore P. K., al Swayeh O. A., Chong N. W., Evans R. A. & Gibson A.(1990) L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J Pharmacol.* 99:408-412.
- Mulsch A. & Busse R.(1990) NG-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 341:143-147.
- Munzel T., Holtz J., Mulsch A., Stewart D. J. & Bassenge E.(1989) Nitrate tolerance in epicardial arteries or in the venous system is not reversed by N-acetylcysteine in vivo, but tolerance-independent interactions exist. *Circulation* 79:188-197.
- Murrell W.(1879) Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* Jan.18:80-81.
- Myers P. R., Minor R. L. J., Guerra R. J., Bates J. N. & Harrison D. G.(1990) Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345:161-163.
- Nakano J. & McCurdy J. R.(1967) Cardiovascular effects of prostaglandin E1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 156:538-547.
- Needleman P., Jakschik B. & Johnson E. M.(1973) Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187:324-331.
- Nielsen S. L. & Sejrsen P.(1972) Reactive hyperemia in subcutaneous adipose tissue in man. *Acta Physiol. Scand.* 85:71-77.
- Nissen S. E., Elion J. L., Booth D. C., Evans J. & DeMaria A. N.(1986) Value and limitations of computer analysis of digital subtraction angiography in the assessment of coronary flow reserve. *Circulation* 73:562-571.
- Noack E. & Feelisch M.(1991) Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. *Basic. Res Cardiol.* 86 Suppl 2:37-50.
- Noll G., Buhler F. R., Yang Z. & Luscher T. F.(1991) Different potency of endothelium-derived relaxing factors against thromboxane, endothelin, and potassium chloride in intramyocardial porcine coronary arteries. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 18:120-126.
- Olsson R. A.(1964) Kinetics of myocardial reactive hyperaemia blood flow in the unanesthetized dogs. *Cir. Res.* 14 (Suppl 1):I81-85.

- Olsson R. A. & Gregg D. E.(1965) Myocardial reactive hyperemia in the unanesthetized dog. *Am. J Physiol.* 208(2):224-230.
- Olsson R. A.(1975) Myocardial reactive hyperemia. *Circ. Res* 37:263-270.
- Olsson R. A. & Bünger R.(1987) Metabolic control of coronary blood flow. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 29:369-387.
- Olsson R. A. & Pearson J. D.(1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiological Reviews* 70(3):761-845.
- Onwochei M. O. & Mustafa S. J.(1985) Relationship between coronary flow and adenosine release in reactive hyperemia. *Life Sci.* 36:105-112.
- Orito K., Satoh K. & Taira N.(1993) Involvement of ATP-sensitive K channels in the sustained coronary vasodilator response to adenosine in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 231:183-189.
- Palmer R. M., Ferrige A. G. & Moncada S.(1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Palmer R. M., Ashton D. S. & Moncada S.(1988a) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666.
- Palmer R. M., Rees D. D., Ashton D. S. & Moncada S.(1988b) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 153:1251-1256.
- Parker J. O., Farrell B., Lahey K. A. & Rose B. F.(1987) Nitrate tolerance: the lack of effect of N-acetylcysteine. *Circulation* 76:572-576.
- Pawlik W. W., Hottenstein O. D. & Jacobson E. D.(1991) Adrenergic modulation of reactive hyperemia in rat gut. *Am. J. Physiol.* 261:G392-G400.
- Pelc L. R., Gross G. J. & Warltier D. C.(1991) Mechanism of coronary vasodilation produced by bradykinin. *Circulation* 83:2048-2056.
- Pinto A., Abraham N. G. & Mullane K. M.(1987) Arachidonic acid-induced endothelial-dependent relaxations of canine coronary arteries: contribution of a cytochrome P-450-dependent pathway. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 240:856-863.
- Pohl U., Holtz J., Busse R. & Bassenge E.(1986) Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8:37-44.
- Pohl U. & Busse R.(1989) Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 256:H1595-H1600.
- Pohl U.(1990) Endothelial cells as part of a vascular oxygen-sensing system: hypoxia-induced release of autacoids. *Experientia* 46:1175-1179.
- Pohl U. & Lamontagne D.(1991) Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Basic. Res Cardiol.* 86 Suppl 2:97-105.
- Radomski M. W., Palmer R. M. & Moncada S.(1987a) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 148:1482-1489.
- Radomski M. W., Palmer R. M. & Moncada S.(1987b) The anti-aggregating properties of vascular

endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J Pharmacol.* 92:639-646.

Radziszewski W. Badania nad mechanizmami regulującymi wewnątrzkomorkowe stezenie cyklicznego 3',5' - monofosforanu guanozyny. Rozprawa doktorska, 1992.

Rapoport R. M. & Murad F.(1983) Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic. Nucleotide. Protein Phosphor. Res* 9:281-296.

Rees D. D., Palmer R. M., Hodson H. F. & Moncada S.(1989a) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J Pharmacol.* 96:418-424.

Rees D. D., Palmer R. M. & Moncada S.(1989b) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* 86:3375-3378.

Rees D. D., Palmer R. M., Schulz R., Hodson H. F. & Moncada S.(1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J Pharmacol.* 101:746-752.

Regoli D. & Barabe J.(1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32:1-46.

Regoli D., Dion S., Rhaleb N. E., Drapeau G. & D'Orleans Juste P.(1990) Vasoactive peptides and their receptors. *Blood Vessels* 27:137-145.

Revest P. A. & Abbott N. J.(1992) Membrane ion channels of endothelial cells. *Trends. Pharmacol. Sci.* 13:404-407.

Richard V., Tanner F. C., Tschudi M. & Luscher T. F.(1990) Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries. *Am. J Physiol.* 259:H1433-H1439.

Roberts A. M., Messina E. J. & Kaley G.(1981) Prostacyclin (PGI₂) mediates hypoxic relaxation of bovine coronary arterial strips. *Prostaglandins* 21:555-569.

Rosenblum W. I.(1987) Hydroxyl radical mediates the endothelium-dependent relaxation produced by bradykinin in mouse cerebral arterioles. *Circ. Res* 61:601-603.

Roy C. S. & Brown J. G.(1872) The blood-pressure and its variations in the arterioles, capillaries and smaller veins. *J. Physiol. Lond.* 2:324-359.

Rubanyi G. M., Romero J. C. & Vanhoutte P. M.(1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J Physiol.* 250:H1145-H1149.

Rubio R., Berne R. M. & Katori M.(1969) Release of adenosine in reactive hyperemia of the dog heart. *Am. J. Physiol.* 216:56-62.

Sadick N., Dube G. P., McHale P. A. & Greenfield J. C. J.(1987) Metabolic mediation of single brief diastolic occlusion reactive hyperemic responses. *Am. J. Physiol.* 253:H25-H30.

Sadick N., Dube G. P., McHale P. A. & Greenfield J. C. J.(1989) Hyperemic response to coronary occlusion during a single diastole in conscious dog. *Am. J. Physiol.* 256:H1645-H1650.

Saito D., Nixon D. G. & Olsson R. A.(1981) Effect of adenosine deaminase on myocardial reactive hyperemia: preliminary report. *Basic. Res Cardiol.* 76:369-371.

Saito D., Kusachi S., Nagashima H. & Haraoka S.(1982) Enhancement of myocardial reactive hyperemia and adenosine-induced coronary vasodilation by dilazep, a new adenosine potentiator. *Arzneimittelforschung.* 32:1029-1032.

- Saito D., Abe Y., Tani H., Takeda K., Hyodo T., Nakatsu T., Ueda M. & Kusachi S.(1985) Effect of adenosine deaminase inhibitors on myocardial reactive hyperaemia following brief coronary occlusions. *Cardiovasc. Res* 19:578-583.
- Schad H., Heimisch W., Haas F., Blasini R. & Mendler N.(1991) Global and regional ventricular function following intracoronary application of papaverine. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 5:598-602.
- Schini V. B., Boulanger C., Regoli D. & Vanhoutte P. M.(1990) Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 252:581-585.
- Schrader J., Haddy F. J. & Gerlach E.(1977) Release of adenosine, inosine and hypoxanthine from the isolated guinea pig heart during hypoxia, flow-autoregulation and reactive hyperemia. *Pflugers Arch.* 369:1-6.
- Schrader J., Kroll K., Henrich M. & Piper H. M.(1987) Coronary and myocardial adenosine receptors. *Biomed. Biochim. Acta* 46:S421-S426.
- Schrader J., Deussen A. & Smolenski R. T.(1990) Adenosine is a sensitive oxygen sensor in the heart. *Experientia* 46:1172-1175.
- Schrör K. & Krebs R.(1976) On the action of PGE2 on coronary vessels. A comparative study with adenosine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 193 (Suppl):R27.
- Schrör K., Moncada S., Ubatara F. B. & Vane J. R.(1978) Transformation of arachidonic acid and prostaglandin endoperoxides by the guinea pig heart. Formation of RCS and Prostacyclin. *Eur. J Pharmacol.* 47:103-114.
- Schrör K., Link H. B., Rösen R., Klaus W. & Rösen P.(1980) Prostacyclin-induces coronary vasodilation. Interaction with adenosine, cyclic AMP and energy charge in the rat heart in vitro. *Eur. J Pharmacol.* 64:341-348.
- Schrör K.(1981) Possible role of prostaglandins in the regulation of coronary blood flow. *Basic. Res Cardiol.* 76:139-149.
- Schrör K.(1985) Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells. *Basic. Res Cardiol.* 80:502-514.
- Schrör K., Forster S., Woditsch I. & Schroder H.(1989) Generation of NO from molsidomine (SIN-1) in vitro and its relationship to changes in coronary vessel tone. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 14 Suppl 11:S29-S34.
- Schrör K., Forster S. & Woditsch I.(1991) On-line measurement of nitric oxide release from organic nitrates in the intact coronary circulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 344:240-246.
- Schutz W., Zimpfer M. & Raberger G.(1977) Effect of aminophylline on coronary reactive hyperaemia following brief and long occlusion periods. *Cardiovasc. Res* 11:507-511.
- Schwartz G. G., McHale P. A. & Greenfield J. C. J.(1982) Hyperemic response of the coronary circulation to brief diastolic occlusion in the conscious dog. *Circ. Res* 50:28-37.
- Schwartz G. G., Schaefer S., Gober J., Meyerhoff D. J., Smekal A., Massie B. & Weiner M. W.(1990) Myocardial high-energy phosphates in reactive hyperemia. *Am. J. Physiol.* 259:H1190-H1196.
- Schwartz G. G., Schaefer S., Trocha S. D., Steinman S., Gober J., Garcia J., Massie B. & Weiner M. W.(1991) Metabolic and functional consequences of blunted myocardial reactive hyperemia. *Am. J. Physiol.* 261:H892-H900.

- Scott J. B., Chen W. T., Swindall B. T., Dabney J. M. & Haddy F. J.(1979) Evidence from bioassay studies indicating a role for adenosine in cardiac ischemic and hypoxic dilation in the dog. *Circ. Res* 45:451-459.
- Shepherd A. P.(1982) Metabolic control of intestinal oxygenation and blood flow. *Fed. Proc.* 41:2084-2089.
- Shustova N. I., Dik I. G., Nedoshivin V. P. & LevtoV V. A.(1989) [Blood supply of skeletal muscles in reactive hyperemia]. *Fiziol. Zh. SSSR.* 75:493-507.
- Smolenski R. T., Schrader J., de Groot H. & Deussen A.(1991) Oxygen partial pressure and free intracellular adenosine of isolated cardiomyocytes. *Am. J Physiol.* 260:C708-C714.
- Steiner A. L., Wehmann R. E., Parker C. W., Kipnis D. M. *Advances in cyclic nucleotide research.* New York, Raven Press, 1972.
- Stewart A. G. & Piper P. J.(1988) Vasodilator actions of acetylcholine, A23187 and bradykinin in the guinea-pig isolated perfused heart are independent of prostacyclin. *Br. J Pharmacol.* 95:379-384.
- Sunahara F. A. & Talesnik J.(1979) Myocardial synthesis of prostaglandin-like substances and coronary reactions to cardiostimulation and to hypoxia. *Br. J. Pharmacol.* 65:71-85.
- Sundt T. M. J. & Waltz A. G.(1971) Cerebral ischemia and reactive hyperemia. Studies of cortical blood flow and microcirculation before, during, and after temporary occlusion of middle cerebral artery of squirrel monkeys. *Circ. Res* 28:426-433.
- Thomas W. E., Cooke P. H., Davies E. R., Jackson P. C. & Williamson R. C.(1981) Dynamic radionuclide scanning of the testis in acute scrotal conditions. *Br. J. Surg.* 68:621-624.
- Todoki K., Okabe E., Sugihara M., Sekishita T., Wakasugi Y. & Ito H.(1989) Salivary gland and kinins in reactive hyperemia in oral tissues. *Bull. Kanagawa. Dent. Coll.* 17:137-140.
- Tschudi M., Richard V., Buhler F. R. & Luscher T. F.(1991) Importance of endothelium-derived nitric oxide in porcine coronary resistance arteries. *Am. J Physiol.* 260:H13-H20.
- Ueeda M., Silvia S. K. & Olsson R. A.(1992) Nitric oxide modulates coronary autoregulation in the guinea pig. *Circ. Res* 70:1296-1303.
- Vallance P., Collier J. & Moncada S.(1989a) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man [see comments]. *Lancet* 2:997-1000.
- Vallance P., Collier J. & Moncada S.(1989b) Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc. Res* 23:1053-1057.
- Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J. & Moncada S.(1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339:572-575.
- Vane J. R.(1973) Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of action of aspirin like drugs. *Adv. Biosci* 9:395-397.
- Vogelberg K. H., Helbig G. & Stork W.(1988) Doppler sonographic examination of reactive hyperemia in the diagnosis of peripheral vascular disease. *Klin. Wochenschr.* 66:970-975.
- von Beckerath N., Cyrys S., Dischner A. & Daut J.(1991) Hypoxic vasodilatation in isolated, perfused guinea-pig heart: an analysis of the underlying mechanisms. *J Physiol. Lond.* 442:297-319.

von Euler U. S.(1935) Ueber die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata und Samenblasensekretes. *Klin. Wochenschr.* 14:1182-1183.

Wahlberg E., Jorneskog G., Olofsson P., Swedenborg J. & Fagrell B.(1990) The influence of reactive hyperemia and leg dependency on skin microcirculation in patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD), with and without diabetes. *Vasa.* 19:301-306.

Wartier D. C., Gross G. J. & Brooks H. L.(1981) Pharmacologic- vs. ischemia-induced coronary artery vasodilation. *Am. J. Physiol.* 240:H767-H774.

Wennmalm A.(1975) Prostaglandin release and mechanical performance in the isolated rabbit heart during induced changes in the internal environment. *Acta Physiol. Scand.* 93:15-24.

White C. W., Wright C. B., Doty D. B., Hiratza L. F., Eastham C. L., Harrison D. G. & Marcus M. L.(1984) Does visual interpretation of the coronary arteriogram predict the physiologic importance of a coronary stenosis? *N. Engl. J. Med.* 310:819-824.

Whittle B. J., Lopez Belmonte J. & Rees D. D.(1989) Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br. J Pharmacol.* 98:646-652.

Widmann T., Moret P., Ritschard J. & Donath A.(1980) [Regional myocardial perfusion in coronary stenosis of varying degrees]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 110:1666-1669.

Wilkin J. K.(1987) Cutaneous reactive hyperemia: viscoelasticity determines response. *J. Invest. Dermatol.* 89:197-200.

Williams M.(1987) Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27:315-345.

Wright C., Doty D., Eastham C., Laughlin D., Krumm P. & Marcus M.(1980a) A method for assessing the physiologic significance of coronary obstructions in man at cardiac surgery. *Circulation* 62:I111-I115.

Wright C. B., Doty D. B., Eastham C. L. & Marcus M. L.(1980b) Measurements of coronary reactive hyperemia with a Doppler probe. Intraoperative guide to hemodynamically significant lesions. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 80:888-897.

Zembowicz A., Dudek R. D., Radziszewski W., Swierkosz T. A., Trybulec M. & Gryglewski R. J.(1990) Vasorelaxant and platelet-suppressant potencies of four NO-donors. *Pol. J Pharmacol. Pharm.* 42:275-281.