

COLLEGIUM MEDICUM
UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
WYDZIAŁ LEKARSKI

Małgorzata Malczewska-Malec

**Efekty biochemiczne i krążeniowe egzogennej L-argininy
u chorych z samoistnym nadciśnieniem tętniczym**

Promotor: Prof. dr hab. Aldona Dembińska-Kieć

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095177

Z Zakładu Biochemii Klinicznej Katedry Biochemii Klinicznej
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik: Prof.dr hab. Aldona Dembińska-Kieć

[1996]

Pragnę wyrazić moją głęboką wdzięczność Pani Profesor Aldonie Dembińskiej-Kieć za inspirację, i wskazówki w trakcie prowadzonych badań, oraz za nieocenioną pomoc w redagowaniu tej pracy.

Szczególne wyrazy wdzięczności składam Pani Docent Kalinie Kaweckiej-Jaszc za umożliwienie mi przeprowadzenia badań w I Klinice Kardiologii, za cenne uwagi w czasie ich realizacji, oraz za wprowadzenie mnie w trudne zagadnienia kardiologii.

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACE	- enzym przekształcający angiotensynę
ADMA	- asymetryczna N ^ω dimetylo-L-arginina
ADP	- adenozyndifosforan
ANP	- przedsiolkowy peptyd natriuretyczny
cAMP	- cykliczny 3', 5' monofosforan adenozyiny
cGMP	- cykliczny 3', 5' monofosforan guanozyiny
eNOS	- konstytutywna syntaza tlenu azotu
DETA/NO	- dietylenotriamina
EDRF	- śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia
HDL	- lipoproteiny o dużej gęstości
IDDM	- cukrzyca insulinozależna
IL	- interleukina
INF	- interferon
iNOS	- indukowalna syntaza tlenu azotu
L-Arg	- L-arginina
L-NA	- N ^ω -nitro-L-arginina
L-NAA	- N ^ω -amino-L-arginina
L-NAME	- ester metylowy N ^ω -nitro-L-argininy
L-NIO	- N-imino-etylo- α -ornityna
L-NMMA	- N ^ω -monometylo-L-arginina
LDL	- lipoproteiny o małej gęstości
LPS	- lipopolisacharydy bakteryjne
mmLDL	- częściowo (minimalnie) zmodyfikowane lipoproteiny o małej gęstości
NANC-receptor	- receptor nieadrenergicznego, niecholinergicznego obwodowego układu nerwowego
NaNP	- nitroprusydek sodu
NIDDM	- cukrzyca insulinoniezależna
NMDA-receptor	- receptor N-metylo-D-asparaginowy
NO	- tlenek azotu
NO₂	- azotyny
NO₃	- azotany
NOS	- syntaza tlenu azotu
PAF	- czynnik aktywujący płytki
PAI	- inhibitor aktywatora plazminogenu
PDGF	- pochodzący z płytek czynnik wzrostowy
PGI₂	- prostacyklina
PMNS	- leukocyty obojętnochłonne
PTCA	- przeszkońska angioplastyka naczyń wieńcowych
RCT	- rozkurczowe ciśnienie tętnicze
SCT	- skurczowe ciśnienie tętnicze
SIN-1A	- sydnoniminy
SOD	- dysmutaza jonów nadtlenkowych
SNAP	- S-nitrozo-N-acetylo-penicylamina
SPER/NO	- sperma
TGFβ	- czynnik wzrostowy nowotworu β
TNFα	- czynnik martwicy nowotworu α
tPA	- tkankowy aktywator plazminogenu

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	str. 6
1.1	Śródbłonkowy Czynniki Rozszerzający Naczynia (EDRF/NO)	str. 6
1.2	Izoformy syntaz tlenku azotu	str. 7
1.3	Inhibitory syntaz tlenku azotu	str. 8
1.4	Mechanizmy działania tlenku azotu	str. 9
1.5	"Donory NO"	str.10
1.6	Rola tlenku azotu w układzie krążenia	str.10
1.7	Udział tlenku azotu w odpowiedzi immunologicznej ustroju	str.15
1.8	Rola tlenku azotu w układzie nerwowym	str.16
1.9	Inne funkcje tlenku azotu	str.17
1.10	Udział tlenku azotu w patogenezie nadciśnienia tętniczego	str.18
1.11	Generacja tlenku azotu w hipercholesterolemii i miażdżycy	str.21
1.12	Tlenek azotu w terapii chorób układu krążenia	str.22
2.	CEL PRACY	str.24
3.	MATERIAŁ I METODY	str.25
3.1	Materiał	str.25
3.2.	Podawanie L-argininy	str.26
3.3	Prowadzone obserwacje	str.27
	- Pomiary ciśnienia tętniczego i tętna	str.27
	- Badanie zdolności płytek do agregacji	str.27
	- Badanie aktywności fibrynolitycznej osocza	str.28
	- Badanie aktywności reninowej osocza	str.29
	- Badanie stężenia cyklicznego 3', 5' monofosforanu guanozyny (cGMP)	str.29
	- Oznaczanie stężenia azotynów/azotanów w moczu	str.30
3.4	Metody statystyczne	str.31

4.	WYNIKI	str.32
4.1	Pomiary ciśnienia tętniczego i tętna	str.32
	- Pomiary skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz tętna w trakcie wlewów soli fizjologicznej oraz L-argininy	str.32
	- Całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego i tętna	str.38
	- Zmiany ciśnienia tętniczego obserwowane w trakcie podawania soli fizjologicznej i L-argininy w zależności od wyjściowych wartości ciśnień	str.39
	- Zmiany ciśnienia tętniczego obserwowane w trakcie podawania L-argininy u pacjentów z prawidłowym i wysokim stężeniem LDL-cholesterolu w surowicy krwi	str.41
4.2	Wyniki badań biochemicznych	str.45
	- Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na aktywność płytek krwi	str.45
	- Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na aktywność fibrynolityczną osocza	str.45
	- Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na aktywność reninową osocza	str.45
	- Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na stężenie cGMP w surowicy	str.49
	- Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na stężenie wydalanych z moczem azotynów/azotanów	str.49
	- Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na stężenia wybranych parametrów biochemicznych we krwi	str.53
5.	DYSKUSJA	str.54
6.	WNIOSKI	str.61
7.	STRESZCZENIE	str.62
8.	PIŚMIENNICTWO	str.64

1. WSTĘP

1.1. Śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia (EDRF/NO).

Śródbłonek naczyniowy wyściełający naczynia krwionośne pełni istotną rolę w utrzymaniu homeostazy układu krążenia. Badania ostatnich dwudziestu lat udowodniły, że śródbłonek to nie tylko warstwa komórek strukturalnie oddzielająca głębiej położone komórki ściany naczynia od jego światła, ale przede wszystkim miejsce powstawania i uwalniania licznych substancji uczestniczących w regulacji przepływu i płynności krwi, regulacji odpowiedzi zapalnej czy immunologicznej.

W roku 1976 Gryglewski, Vane, Moncada i Bunting odkryli, że śródbłonek naczyniowy jest miejscem wytwarzania i uwalniania prostacykliny, która wykazuje działanie naczyniorozkurczowe i przeciwzakrzepowe [107]. W cztery lata później Furchgott i Zawadzki udowodnili rolę śródbłonka w niezależnym od cyklooksygenazy, wywołanym acetylocholiną rozkurczu ściany naczyń krwionośnych [92]. Obserwacje te przyczyniły się do odkrycia śródbłonkowego czynnika rozszerzającego naczynia (EDRF), nazwanego tak z uwagi na jego pierwsze opisane działanie biologiczne. Związek ten został również określony jako "endogenne nitrat", ponieważ wykazywał zdolność do rozkurczania naczyń, aktywacji cyklazy guanylowej i przez to zbliżone do nitratów właściwości zwiększania poziomu cGMP w komórkach mięśni ściany naczyń [191,192].

W następnych kilku latach wykazano, że EDRF to bardzo łatwo dyfundująca cząsteczka, o krótkim okresie półtrwania we krwi i właściwościach wolnego rodnika [132], a w 1987 roku Ignarro i Moncada niezależnie od siebie udowodnili, że EDRF jest molekułą tlenu azotu (NO) [130,219].

Substratami dla generowanego EDRF/NO są: L-arginina, tlen i zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) [192,220,264,271]. Enzym: syntaza NO (NOS), która jest dioksygenazą, w obecności kofaktorów: mononukleotydu flawinowego (FMN), dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD), hemu i tetrahydropteryny (wg. niektórych autorów stanowią one część składową enzymu) wprowadza dwa atomy tlenu do L-argininy [26,152,166,220,222,232,242,306,308]. Guanidynowy azot L-argininy ulega oksydacji do NO i cytruliny poprzez stadium pośrednie hydroksyguanidyny. Początkowo zdolność do generacji NO wykazano w komórkach śródbłonka i makrofagach [119,120,121,122]. Obecnie wiadomo, że w

specjalnych warunkach różnorodne komórki naszego ustroju mogą uwalniać NO [24,95,100,131,192,193, 268].

1.2. Izoformy syntaz tlenku azotu.

Wyodrębniono 2 podstawowe izoformy syntazy tlenku azotu:

- Konstytutywna syntaza (cNOS), wyodrębniona ze śródbłonka i komórek układu nerwowego (odpowiednio Ia i Ib) [25,26,64,232,278,298,315]. Jej aktywność jest uzależniona od kompleksów kalmodulina - jony wapnia. Konstytutywna NOS jest aktywowana przez wewnątrzpochodne i zewnątrzpochodne związki podnoszące stężenie jonów wapnia w tych komórkach (bradykinina, substancja P, endoteliny 1 i 3, serotonina, trombina, acetylocholina, ADP, czynnik aktywujący płytki-PAF, jonofory jonów wapnia, estry forbolu) [25]. Pewną odmianę cNOS (Ic) stwierdzono w obojętnochłonnych leukocytach wielojądrzastych (PMNs) krwi obwodowej. Jej aktywność jest zależna od jonów Ca^{++} , ale nie od kalmoduliny. [186,193,207]. Aktywność cNOS w obrębie centralnego systemu nerwowego (CSN) stwierdzono po aktywacji receptorów - aminokwasów pobudzających (receptor-NMDA) [26,315].

Śródbłonkowa cNOS, w przeciwieństwie do innych izoform (obecnych w cytozolu komórek) jest związana z błonami komórkowymi. Szczególne miejsce dla N-mirystylacji glicyny stwierdzone w obrębie tego enzymu zakotwicza cNOS w błonach komórkowych i tylko znikomą jej część można stwierdzić w cytoplazmie komórek śródbłonka [180,280]. Jej aktywacja jest wyzwalana (w obecności jonów Ca^{++} oraz kompleksów wapń/kalmodulina) przez autakoidy, oraz "siły ścinania" (shear stress) przepływającej krwi. W efekcie generowane są w sposób ciągły niewielkie (p-molowe) ilości tlenku azotu [166,193,207,278,315]. Powstały w ten sposób NO odgrywa istotną rolę w regulacji napięcia ściany naczyń i utrzymaniu homeostazy między komórkami krążącej krwi a ścianą naczynia [166,278,315].

- Drugą izoformą syntazy NO jest tzw. indukowalna NOS (iNOS) [64,152,166, 239,248,298,306,315]. Występuje ona zarówno we frakcji cytozolowej (typ II), jak też w ścisłym powiązaniu z błonami komórkowymi (typ IV). Pierwotnie jej aktywność wykazano w makrofagach [179], ale dalsze badania pozwoliły na wyodrębnienie iNOS także z neutrofilii, fibroblastów, hepatocytów, komórek Kupfera, astrocytów, chondrocytów, a także z komórek śródbłonka (typ III) mięśniówki gładkiej naczyń i włókien mięśniowych serca [32,166,214,273].

Do ekspresji enzymu dochodzi w wyniku parogodzinnego kontaktu komórek z lipopolisacharydami bakteryjnymi (LPS) lub cytokinami takimi jak: interferony α , β , γ , interleukina 1, czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) [68,166,195,207, 208,239,248,296,299]. Zarówno jony Ca^{++} , jak i kompleksy wapń/kalmodulina nie wpływają na aktywność tej izoformy, chociaż zauważono, że również i indukowalne izoformy mogą wchodzić w połączenia z kalmoduliną, niemniej jednak jej rola w tym układzie nie jest dotąd poznana [166]. Indukcja iNOS prowadzi do uwalniania bardzo dużych ilości tlenu azotu, którego stężenie (nmolowe) jest toksyczne dla mikroorganizmów i tkanek [119,120,166,193,300, 331].

1.3. Inhibitory syntaz tlenu azotu.

Różnice pomiędzy konstytutywną, a indukowalną NOS dotyczą również wrażliwości na działanie związków hamujących jej aktywność. Należą do nich pochodne substratu - L-argininy, które hamują w warunkach *in vitro* i *in vivo* tworzenie się NO. Wśród nich N^{ω} -nitro-L-arginina (L-NA) jest najsilniejszym inhibitorem cNOS, a N^{ω} -amino-L-arginina (L-NAA) wykazuje większe powinowactwo do iNOS. Zahamowanie generacji NO może być odwracalne, co wykazano dla N-imino-etylo- α -ornityny (L-NIO) w stosunku do cNOS lub nieodwracalne (L-NIO w stosunku do iNOS) [102,105,120,121,132,164,268].

Inne, znane inhibitory syntaz to związki wiążące flawoproteidy (np. difenyl-jod), związki wiążące hem (tlenek węgla), związki wiążące kalmodulinę (kalcyneuryna, trifluoperazyna). Te ostatnie hamują selektywnie konstytutywną NOS [25,89,297].

Hamującą aktywność w stosunku tylko do iNOS wykazują natomiast związki obniżające stężenie tetrahydropteryny, inhibitory indukcji i syntezy białek np. glukokortykosterydy (hamują ekspresję genu), a także TGF β (-1,-2,-3) i interleukiny -4,-8,-10 [58,69,71,193,267].

Selenoorganiczny związek wypierający Se^{3+} - ebselen jest w niskim stężeniu inhibitorem cNOS, a w wysokim iNOS [336].

Innym mechanizmem hamowania aktywności NOS jest skrócenie okresu półtrwania mRNA dla iNOS. TNF- α ma indukować białko hamujące w ten sposób indukcję genu iNOS makrofagów [335].

Działanie biologiczne NO jest hamowane przez oksyhemoglobinę, która reaguje z tlenkiem azotu i w wyniku tej reakcji powstają methemoglobina i jon azotanowy [130,183].

1.4. Mechanizmy działania tlenu azotu.

EDRF/NO jest małą, lipofilną cząsteczką, która może łatwo dyfundować przez błony biologiczne i działać drogą pozareceptorową. Tlenek azotu ma silne powinowactwo do żelaza grupy hemu i grup SH-enzymów, powodując ich aktywację lub dezaktywację [166]. Przyłączenie tlenu azotu do żelaza grupy hemowej cyklazy guanylowej wyzwała jej aktywność, co w efekcie powoduje wzrost stężenia cGMP i inicjuje szereg wewnątrzkomórkowych przemian [56,132,144,154, 193,246]. Poprzez wzrost poziomu cGMP, tlenek azotu rozszerza naczynia, wpływa na przekaz informacji w układzie nerwowym, hamuje aktywność płytek. Inhibitory fosfodiesterazy nasilają aktywność biologiczną NO [64,166, 242,245,269].

Rozpuszczona cyklaza guanylowa jest najprawdopodobniej hamowana przez błękit metylenowy (dzięki właściwościom redukującym tego związku), co stanowi jeden z mechanizmów obniżających efekt biologiczny NO [70,132,183].

Jako labilna molekula, która posiada niesparowany elektron, NO wykazuje właściwości wolnego rodnika i uczestniczy w mechanizmach nieswoistej obronności organizmu [193]. Jego okres półtrwania w natlenionych płynach fizjologicznych wynosi kilka sekund i jest on unieczynniany przez rodniki ponadtlenkowe (O_2^{\bullet}) obecne w tych płynach [14,108]. W wyniku reakcji NO i O_2^{\bullet} dochodzi do powstania jonów NO_2^- i NO_3^- , a pośrednim stadium w tej reakcji jest jon peroksynitrytowy $ONOO^-$, który stanowi źródło toksycznych dla tkanek rodników hydroksylowych OH^{\bullet} [15,132]. Ochronne własności wobec NO wykazuje dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), usuwająca ze środowiska anion ponadtlenkowy O_2^{\bullet} , nasilając przez to aktywność biologiczną NO [108,170,183, 193,197,235,237, 238].

Przypuszcza się, że NO może wywierać swoje wewnątrzkomórkowe działanie również poprzez łączenie się z centrum aktywnym enzymów łańcucha oddechowego mitochondriów, rybozylację ADP, upośledzenie syntezy i destrukcję DNA, nitrowanie tyrozyny, a także przez udział w procesie modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [132,154,155,166,211,312].

Powyższe mechanizmy są częściowo związane z obronną rolą NO generowanego przez iNOS, ale mogą również wywoływać niszczenie komórek gospodarza (np. w cukrzycy). Tlenek azotu wydaje się odgrywać istotną rolę w patogenezie tego schorzenia i to zarówno w cukrzycy insulinozależnej (IDDM) jak i insulinoniezależnej (NIDDM), chociaż w różnorodny sposób. Pod wpływem cytokin ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$) w makrofagach, a także w komórkach β trzustki dochodzi do ekspresji iNOS [55,142]. Generowany w dużych ilościach tlenek

azotu, prawdopodobnie współuczestniczy (z wolnymi rodnikami) w niszczeniu wysp trzustkowych i tym samym przyczynia się do powstawania IDDM [84,149]. Natura upośledzenia układu L-arginina-NO w NIDDM dotyczy nie samej trzustki. W cukrzycy typu II (NIDDM) dochodzi do zmniejszonej generacji NO i prostacykliny w śródbłonku, a także do upośledzonej reaktywności mięśni gładkich naczyń [129,329].

Tlenek azotu tworzy również kompleksy z cząsteczkami zawierającymi grupę tiolową (np. albuminami osocza). Powstają wówczas S-nitrozotiole, które wydłużają biologiczny okres półtrwania NO [132,187,200,241,292].

1.5. "Donory NO".

Duże podobieństwo do działania biologicznego tlenu azotu wykazuje grupa związków określonych jako "donory NO", których działanie rozszerzające naczynia krwionośne, czy działanie antyagregacyjne jest od dawna dobrze znane. Należą do nich związki, które spontanicznie uwalniają w roztworze wodnym tlenek azotu np. związek SIN-1A (metabolit molsidominy), lub takie (np. nitrogliceryna), które do uwolnienia NO wymagają obecności enzymów, glutationu i cysteiny. Nitroprusydek sodu (NaNP), posiada w swojej strukturze ugrupowanie NO i może dzięki temu bezpośrednio aktywować cyklazę guanylową i tą drogą wywoływać efekt biologiczny [98,132,150,151,193,200,275]. Obecnie, duże zainteresowanie budzi nowa grupa związków, wykazująca własności donorów tlenu azotu, o stosunkowo długim okresie półtrwania. Należy do nich między innymi związek tlenu azotu ze sperminą (SPER/NO) czy dietylenotriaminą (DETA/NO), których metabolizm i działanie biologiczne stanowi przedmiot intensywnych badań [178].

1.6. Rola tlenu azotu w układzie krążenia.

Generowany w śródbłonku pod wpływem cNOS tlenek azotu pełni ważne zadania regulacyjne w układzie krążenia [16,166,192,231,269,278,315]. Jego własności naczyniorozszerzające zostały w znacznym stopniu poznane dzięki zastosowaniu w badaniach *in vitro* i *in vivo* inhibitorów NOS - pochodnych L-argininy. Zaobserwowano, że dożylnie podanie zwierzętom N^ω-monometylo-L-argininy (L-NMMA) wywołuje wzrost ciśnienia tętniczego krwi w wyniku zwiększenia oporu naczyniowego w łożysku nerkowym, trzewnym, mózgowym, kończyn i wieńcowym [94,132,193,221,247]. Również przewlekłe skarmianie

szczurów L-NMMA i estrem metylovym N^ω-nitro-L-argininy (L-NAME) prowadzi do trwałego wzrostu ciśnienia tętniczego [14,266].

Wykazano również, że podawanie L-NMMA miejscowo do tętnicy łokciowej u ludzi hamowało rozszerzenie naczyń kończyny górnej wywoływane bradykininą lub acetylocholiną. Nie wpływało natomiast na rozkurcz wywołany podaniem nitrogliceryny [313].

Ważnym dowodem dla roli NO w homeostazie układu krążenia było odkrycie występującego u ludzi endogennego inhibitora NOS - asymetrycznej dwumetylo pochodnej L-argininy (ADMA) i jego symetrycznego izomeru SDMA. Związki te wykryto w moczu i osoczu pacjentów z niewydolnością nerek, nadciśnieniem tętniczym i rzucawką okołoporodową [85,314]. Zauważono, że ADMA (ale nie SDMA) podawana ochotnikom lokalnie do tętnicy łokciowej znamienne zmniejszała przepływ krwi w obrębie przedramienia. Równoczesne podanie L-argininy zapobiegało temu zjawisku [38]. Obecność ADMA we krwi i moczu udało się wykazać również i u zdrowych ludzi, ale były to ilości śladowe [314].

Obserwacje te stały się podstawą do postawienia hipotezy, że wytwarzany w śródbłonku naczyń tlenek azotu pełni kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego oporu obwodowego, ciśnienia krwi i stanowi endogenne autoregulacje tkankowego przepływu krwi [48,113,117,166,181,192,193,225,247, 269,294,313,315].

Najważniejszym fizjologicznym bodźcem dla ciągłego uwalniania NO w śródbłonku mają być (obok autakoidów) "siły ścinania" (shear stress) i rozciąganie ściany naczyń, wywołane przez pulsacyjne przemieszczanie się strumienia krwi [29,53,62,175,278]. Shear stress aktywuje kanały potasowe śródbłonka naczyń, zwiększa napływ jonów wapnia i zmienia spoczynkowy potencjał błonowy komórek w kierunku bardziej ujemnych wartości [53]. Zauważono, że zastosowanie verapamilu, charybdotoksyny lub iberiotoksyny (blokery wapniozależnych kanałów potasowych - K⁺_{Ca}), a także obniżenie stężenia jonów wapnia w medium hamują wywołany siłami shear stress rozkurcz naczyń krwionośnych [53,217]. Związki te nie mają natomiast wpływu na rozkurcz wywołany przez donory NO, czyli egzogenne tlenek azotu.

Silnym dowodem na kluczową rolę shear stress w indukcji syntezy NO, było wykazanie wzrostu mRNA śródbłonkowej cNOS w odpowiedzi na przepływ krwi, wysięk czy niedotlenienie [208,212]. W wielu pracach udowodniono, że podstawowe uwalnianie tlenu azotu ze śródbłonka reguluje przepływ krwi w obrębie mózgu [81,304,310], serca [3,17], płuc [86], układu pokarmowego [134] i nerek [65,252]. Chociaż rolę jaką przypisuje się NO w utrzymaniu homeostazy

ciśnienia tętniczego jest duża, to jednak stan napięcia mięśni gładkich naczyń pozostaje pod kontrolą również wielu innych czynników pochodzących z krwi, układu nerwowego i samego śródbłonna [166,169,185,231,316,333]. Śródbłonek naczyniowy jest miejscem intensywnej syntezy i uwalniania nie tylko EDRF/NO, ale także szeregu innych naczyniorozkurczających (prostacyklina, śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący) jak i naczynioobkurczających substancji (endoteliny, tromboksan, wolne rodniki, śródbłonkowy czynnik kurczący, prostaglandyny, angiotensyna II) [50,107,185,194,196,231,278,316,333]. W fizjologicznych warunkach zachowana jest pomiędzy nimi czynnościowa równowaga [316]. Związki te wspólnie kontrolują stopień napięcia mięśni gładkich naczyń i w efekcie utrzymują naczynia w stanie aktywnego rozkurczu [132,316]. Niektóre spośród czynników regulujących stan napięcia ściany naczyń wywierają znaczny wpływ na jej przebudowę ("remodeling"), ponieważ oddziałują na wzrost, rozplam i migrację komórek mięśniowych i podścieliska. Wykazano, że angiotensyna, endotelina 1 czy PAF sprzyjają migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń, gdy EDRF/NO hamuje ich proliferację, podobnie jak prostacyklina (PGI₂) i śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący [99,279].

Interesujące obserwacje dotyczą udziału autonomicznego układu nerwowego w uwalnianiu NO w naczyniach. Zauważono, że niektóre parasympatyczne włókna nerwowe zawierające NOS kończą się w przydatce dużych naczyń. Zaobserwowano, że w dużych tętnicach mózgu i siatkówki powstały tą drogą tlenek azotu przenika niejako z zewnątrz do mięśni gładkich naczyń i powoduje ich rozkurcz [213].

EDRF/NO uczestniczy w utrzymaniu homeostazy układu krążenia również poprzez modyfikację przepływu wieńcowego i wpływ na funkcję mięśnia sercowego [3,5,77,89,91,155,166,234]. Przekonywujących dowodów o istotnej roli jaką pełni NO w regulacji napięcia tętnic wieńcowych dostarczyły także badania z użyciem inhibitorów NOS. Zaobserwowano, że podanie L-NMMA do tętnic wieńcowych wywołuje skurcz naczyń wieńcowych w obszarze, w którym wcześniej wywołano jego rozkurcz przy pomocy acetylocholino [157,234]. Podanie L-NAME prowadzi do ischemii mięśnia sercowego [227], a przewlekłe podawanie tego związku szczurom spowodowało rozwój kardiomiopatii niedokrwiennej [265].

Tlenek azotu pełni również funkcję mediatora wczesnej fazy reaktywnej hyperemii tj. powysiłkowego przekrwienia narządu (również mięśnia sercowego) [47,181] po krótkim okresie niedotlenienia, czy podczas wytężonej pracy. Obserwowane wówczas poszerzenie łożyska naczyniowego i zwiększenie perfuzji tkankowej ma duże znaczenie dla fizjologii narządu, czyli też dla

skurczu mięśnia sercowego i jego odżywiania [47]. Wydaje się, że w zwiększeniu przepływu krwi następującym po dłuższym okresie niedotlenienia uczestniczą obok NO również i inne mediatory, takie jak np. adenozyina i prostaglandyny [47].

Czynność skurczowa mięśnia sercowego jest regulowana przez liczne czynniki pochodzące z wsierdzia i śródbłonna naczyń wieńcowych, w tym też przez NO [8,141,166,244,286]. W badaniach prowadzonych na izolowanych kardiomiocytach, mięśniach brodawkowatych i izolowanych sercach zwierząt, wykazano, że czynniki podnoszące stężenie cGMP powodują: zmniejszenie maksymalnego skurczu, skrócenie fazy skurczowej, przyspieszenie początku fazy rozkurczu bez zmian siły skurczu, czy też generowanego ciśnienia [90,189,281,282, 286].

U ludzi obserwacje wpływu NO na mięsień sercowy badano poprzez dowieńcowe podawanie donora NO - nitroprusydku sodu (NaNP). Odnotowano zwolnienie częstości akcji serca, spadek szczytowego i końcowo-skurczowego ciśnienia w lewej komorze, wcześniejsze wystąpienie fazy rozkurczu izowolumetrycznego lewej komory oraz poprawę rozciągliwości tej komory [229]. Infuzja NaNP do prawego przedsionka wywoływała zbliżone efekty, chociaż słabiej zaznaczone [228]. Obserwowany spadek częstości akcji serca pod wpływem NO może być wynikiem zmian w odpowiedzi receptora muskarynowego na stymulację cholinergiczną [8,253], hamowania przez NO stymulacji β -adrenergicznej lub zahamowania uwalniania amin katecholowych z zakończeń adrenergicznych serca [83,115].

Regulacja czynności skurczowej mięśnia sercowego przez EDRF/NO może wynikać nie tylko z aktywności konstytutywnej, śródbłonkowej syntazy NO, ale także z aktywności konstytutywnej i indukowalnej NOS samych kardiomiocytów [8,16,23,79,87,277]. Zaobserwowano bowiem, że w izolowanych sercach, cNOS pochodząca ze śródbłonna mediuje odpowiedź na acetylocholinę, natomiast indukowalna NOS uaktywnia się po ekspozycji na cytokiny lub endotoksyny i powoduje duże upośledzenie kurczliwości miocytów [8,16,23,79,87,165,278,302]. NOS może być indukowana w kardiomiocytach np. w czasie wirusowego zapalenia mięśnia sercowego. Stwierdzana wówczas odwracalna dysfunkcja lewej komory może być spowodowana nadmierną ilością uwalnianego tlenu azotu, który upośledza skurcz mięśnia sercowego [16,166].

Badania ostatnich lat uwypukliły rolę tlenu azotu w reperfuzyjnym uszkodzeniu miokardium, spotykanym podczas odwracalnych (dusznicza bolesna spoczynkowa i wysiłkowa, angioplastyka wieńcowa) i nieodwracalnych (zawał serca) epizodów niedokrwienia oraz w czasie zabiegów kardiochirurgicznych.

Hipoksja lub hipoksja z następującą reperfuzyją prowadzi do wzrostu przepuszczalności śródbłonna, hamuje jego właściwości przeciwzkrzepowe i nasila adhezję leukocytów do endothelium. Towarzyszy temu spadek produkcji EDRF/NO jak i obniżenie poziomu cAMP w śródbłonku [39,172,284]. Podczas zjawiska ischemii/reperfuzyji tkanki dochodzi do generacji wolnych rodników tlenowych (rodnik ponadtlenkowy- O_2^* , nadtlenek wodoru- H_2O_2 , rodnik hydroksylowy- OH^*), które między innymi hamują działanie biologiczne EDRF/NO [15].

Uszkodzenie śródbłonna jest czynnikiem inicjującym aktywację neutrofilii. Już w ciągu 45 minut od zamknięcia tętnicy wieńcowej można stwierdzić w niedokrwionym mięśniu sercowym obecność neutrofilii łącznie z przylegającymi do nich płytkami krwi ("satelityzm") [260]. Podczas reperfuzyji obserwuje się wzrastające przyleganie leukocytów do śródbłonna, a ich aktywacja wiedzie do uszkodzenia ściany naczyń i tkanki do której penetrują [80,164,167,182,199,263, 318,326].

Znaczącą rolę przypisuje się tlenkowi azotu w procesie zapobiegania rozwojowi restenozy po przezskórnej angioplastyce naczyń wieńcowych (PTCA) oraz w zarastaniu pomostów aortalno-wieńcowych. Późna restenoza jest najczęstszym powikłaniem PTCA i występuje u 30-40 % chorych w ciągu 3-6 miesięcy po skutecznej angioplastyce [35]. W wyniku uszkodzenia tętnicy w czasie zabiegu powstaje dysfunkcja śródbłonna i defekt uwalniania NO. Udało się wykazać obniżenie ekspresji cNOS w zakresie uszkodzonego odcinka tętnicy i możliwość powrotu ekspresji po odbudowaniu się śródbłonna [202]. Równocześnie w krótkim czasie po zabiegu PTCA dochodzi do ekspresji iNOS w komórkach mięśni gładkich neointymy i w obrębie makrofagów nagromadzonych w uszkodzonym obszarze [114,291]. Niemniej jednak trudno jest jednoznacznie ocenić czy wzmożona produkcja NO z iNOS może ograniczać proliferację komórek mięśni gładkich, które to pozytywne działanie przypisuje się śródbłonkowej cNOS.

NO wpływa na homeostazę układu krążenia również poprzez wpływ na układ krzepnięcia i fibrynolizę [18,166,170,192,242]. W warunkach fizjologicznych, przy zachowanej prawidłowej funkcji śródbłonna, ilości NO, które są z niego uwalniane, regulują funkcję płytek krwi. NO hamuje ich agregację i uwalnianie z płytek substancji o silnym działaniu biologicznym, takich jak: tromboksan, serotonina, ADP, czynnik aktywujący płytki (PAF), czynnik wzrostu (PDGF) [7,18, 63,93,103,127,166,187,192,240,242,287].

Wykazano synergistyczne działanie przeciwplatek PGI₂ i NO [30,173, 235,237,242]. Niewielkie ilości tlenu azotu niejako przygotowują płytki na

działanie PGI₂, co zwiększa wielokrotnie jej działanie anty- i dezagregacyjne [170,237]. Nie wykazano natomiast synergistycznego działania między PGI₂ i NO w stosunku do rozkurczu mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych [109].

Ponadto NO znacznie silniej niż PGI₂ hamuje adhezję płytek i leukocytów obojętnochłonnych (PMNs) do śródbłonna. Proces adhezji płytek do śródbłonna kontrolowany jest bowiem raczej przez cGMP a nie cAMP [63,236, 238,242,287].

Ludzkie komórki megakarioblastyczne (Meg-01) posiadają konstytutywną syntazę NO i mają zdolność ekspresji indukowalnej syntazy w odpowiedzi na interleukinę-1 β i TNF α [158]. Tak więc, obydwie enzymy mogą być syntetyzowane w obrębie megakariocytów i następnie przekazane do płytek. Przypuszczalnie NOS ulega uczynnieniu podczas agregacji w płytkach krwi, a uwalniany NO zwrótnie hamuje agregację [242].

Do substancji uwalnianych z płytek w czasie ich agregacji należy inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI) [196,290]. Wykazano, że NO podobnie jak prostacyklina hamuje uwolnienie tej substancji i na tej drodze aktywuje układ fibrynolityczny krwi [145].

Aktywność antyagregacyjna i fibrynolityczna NO, a także hamowanie przez tlenek azotu uwalniania z płytek czynników wzrostu (PDGF), zapobiega powstawaniu przyściennych zakrzepów i może również przyczyniać się do zapobiegania zarówno powikłań zakrzepowo-zatorowych jak i rozwoju blaszki miażdżycowej [10].

1.7. Udział tlenu azotu w odpowiedzi immunologicznej ustroju.

Obserwacje ostatnich lat wykazały udział tlenu azotu i PGI₂ w modulowaniu odczynu zapalnego. Inicjacja chemotaksji leukocytów (PMNs) jak i limfocytów [210], jest spowodowana ekspresją i kooperacją selektyn na ich powierzchni, które następnie zakotwiczą te komórki np. do śródbłonna [201]. Szczególną rolę ma odgrywać w tym procesie selektyna P - białko, które m.in. inicjuje przyleganie płytek krwi do PMNs ("satelityzm") [260]. Zjawisko to sprzyja kooperacji komórek i tworzeniu substancji o działaniu biologicznym np. leukotrienu LTC₄ lub czynnika aktywującego płytki krwi-PAF co w efekcie sprzyja chemotaksji i szerzeniu się procesu zapalnego [162].

Iloprost (egzogenna pochodna prostacykliny) i nitroprusydek sodu hamują zależną od selektyny P adhezję płytek do PMNs [63].

Proces chemotaksji neutrofilii, monocytów/makrofagów i limfocytów jest inicjowany przez stadium toczenia się ("rolling") komórek po śródbłonku [201,

210]. W jego wyniku zaktywowane neutrofile nieodwracalnie zakotwiczą się do śródbłonka. Proces ten jest mediowany między innymi przez $\beta 2$ integryny (CD11/CD18) i adhezyny (ICAM-1, ICAM-2) śródbłonka [201]. Dochodzi wówczas do tzw. "wybuchu tlenowego" i uwolnienia wolnych rodników [162]. Udowodniono, że L-arginina i NO-donor (SNAP) mogą hamować "rolling" leukocytów i w ten sposób zmniejszać rozległość blizny pooperacyjnej u psów [156]. Odwrotny efekt obserwowano po podaniu psom inhibitorów NOS np L-nitro-metyloestru argininy (L-NAME) [156]. Ocenia się, że zahamowanie adhezji neutrofilów do komórek śródbłonka zmniejsza tworzenie wolnych rodników tlenowych o co najmniej 90% [283].

Tlenek azotu odgrywa także kluczową rolę w nieswoistej odporności ustroju. Wytwarzany przez indukowalną NOS w makrofagach, leukocytach, limfocytach, komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego, hepatocytach, miocytach mięśniówki gładkiej naczyń i serca, fibroblastach, komórkach mezangialnych kłębuszków nerkowych i śródbłonku naczyń, wykazuje cytostatyczne i cytotoksyczne działanie [72,120,166,193,315]. Znanymi aktywatorami indukcji NOS są: TNF- α , interferon γ , leukotrien B₄ oraz lipopolisacharydy błon komórkowych bakterii (LPS), jak i fagocytoza kompleksów antygen-przeciwciała. Uwolniony tą drogą w dużych ilościach NO, działa cytotoksycznie dla komórek nowotworowych i niszczy mikroorganizmy [75,121,193,207,315]. Działanie to może wynikać z hamowania przez NO szeregu enzymów, zwłaszcza łańcucha oddechowego, takich jak: akonitazy z cyklu Krebsa, oksydoreduktazy ubichinonu-NADPH, czy oksydoreduktazy bursztynianu [71,122,153,159,192]. Tlenek azotu hamuje także syntezę DNA lub uszkadza DNA poprzez deaminację zasad [122,192,330]. Toksyczność wobec drobnoustrojów może być także związana z tworzeniem wolnych rodników [15,166,207]. Dowodem na udział NO w tych procesach jest wyraźny wzrost wydalanych z moczem azotanów i azotynów u pacjentów ze spadkiem ciśnienia tętniczego w przebiegu szoku septycznego [215], względnie u leczonych interferonem lub TNF- α [19,123].

1.8. Rola tlenu azotu w układzie nerwowym.

Tlenek azotu pełni też rolę neuroprzekaźnika w centralnym układzie nerwowym, gdzie bierze udział w procesach rozwoju i dorastania mózgu, w procesach uczenia się i pamięci [51,64,96,166,288,289,315]. Gwałtowny wyrzut tlenu azotu w następstwie niedotlenienia mózgu może być przyczyną napadu padaczkowego, wskutek aktywacji receptorów NMDA [95,190,337]. Inhibitory

syntezy L-argininy, takie jak L-MMA i L-NA skutecznie zapobiegają napadom drgawek wyzwolonych kwasem kainowym lub niedotlenieniem, co wykazano w modelu doświadczalnym [190,337].

NO jest też prawdopodobnie neuroprzebieźnikiem w przewodzeniu dośrodkowym bólu w rogach tylnych rdzenia [64,315]. Stwierdzono, że w wyniku dokanałowego podania L-NA, dochodzi do zahamowania biosyntezy NO na wysokości rdzenia kręgowego i nasilenia działania przeciwbólowego morfiny [233]. Postuluje się również przekazywanie sygnału bólu drogą NO/cGMP w ośrodkowym układzie nerwowym [64,216].

Udowodniono, że NO pełni funkcję neuroprzebieźnika w tzw. nieadrenergicznej niecholinergiczej (NANC) części układu nerwowego [31]. Tego typu włókna nerwowe są częścią układu autonomicznego odpowiedzialnego za czynność motoryczną mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego, narządów miednicy i dróg oddechowych. Tą drogą odbywać się może również regulacja przepływu krwi oraz czynności ruchowej przewodu pokarmowego [9,24,31, 66,95,101,193,207,288].

1.9. Inne funkcje tlenu azotu.

Tlenek azotu uczestniczy też w uwalnianiu szeregu hormonów: hormonu wzrostu, prolaktyny, insuliny i glukagonu [218,243,274]. Zaobserwowano również, że podanie L-argininy pobudza uwalnianie trzustkowej somatostatyny, nadnerczowych katecholamin i wazopresyny [78,133,312,325]. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach wykazano hamujący wpływ NO na wydzielanie reniny i przedsionkowego peptydu sodopędnego (ANP) [170,262,321].

Zaburzenie funkcji śródbłonna z towarzyszącym upośledzeniem generacji tlenu azotu wykazano w przebiegu wielu patologicznych stanów, uznanych powszechnie za czynniki ryzyka rozwoju miażdżycy, takich jak: nadciśnienie tętnicze [34,36,166,192,193,247,262,269,313,315], cukrzyca [37,129,329], hiperlipoproteinemia [6,40,317,320], jak również i w zaawansowanej miażdżycy czy jej powikłaniach [67,110]. Wykazano wyraźny związek upośledzonej generacji NO z powstawaniem zakrzepów [242], chorobą niedokrwienną serca i skurczem naczyń [234]. Zaburzenie funkcji śródbłonna może też rozwinąć się jako konsekwencja procesu reperfuzji po niedotlenieniu mięśnia sercowego [15], np. po przezskórnej angioplastyce (PTCA) [114,291].

1.10. Udział tlenu azotu w patogenezie nadciśnienia tętniczego.

Rozwój nadciśnienia tętniczego jest wynikiem współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych [2]. Do jego rozwoju przyczyniają się nieprawidłowości w zakresie regulacji objętości krwi, zwiększonej kurczliwości naczyń i przebudowa ściany naczynia (remodeling), która prowadzi do zmniejszenia średnicy światła i wzrostu oporu w krążeniu.

Wyniki badań ostatnich lat sugerują, że rozwój typowych dla nadciśnienia zmian strukturalnych jest poprzedzony zaburzoną funkcją śródbłonna [2,181]. Chociaż jego integralność jest zachowana, to jednak obserwuje się zmiany w przepuszczalności, kształcie komórek i ich ułożeniu w stosunku do strumienia krwi, a także stopniu replikacji i gęstości komórek. Zostało ostatnio udowodnione, że pogrubienie błony wewnętrznej wyprzedza kliniczną manifestację nadciśnienia tętniczego [2,61].

Dysfunkcja śródbłonna sprzyja rozrostowi mięśniówki gładkiej ściany naczynia i tym samym przyczynia się do zwężenia jego światła [60,99]. Konsekwencją pogrubienia ściany naczyniowej jest zwiększenie dystansu dla dyfundującego od strony światła tlenu. Zmniejszenie ciśnienia parcjalnego tlenu (PO_2) prowadzi do wzrostu stężenia wolnych rodników w obrębie ściany naczyniowej [2,181]. Wolne rodniki uszkadzają tkanki, a w świetle naczynia nasilają oksydacyjną modyfikację białek np. LDL ("stress oksydacyjny") [2,205]. Coraz więcej danych przemawia za hipotezą, że wytwarzane aniony nadadtlenkowe wyzwalają rozwój nadciśnienia tętniczego, ponieważ unieczynnijają śródbłonną EDRF/NO [2,181,225,261]. Koncepcję tę potwierdzają badania prowadzone na spontanicznie nadciśnieniowych szczurach (SHR), u których podanie dysmutazy nadadtlenkowej (SOD - "zmiatacza" wolnych rodników) powodowało obniżenie ciśnienia tętniczego. Nie obserwowano podobnego efektu po podaniu SOD zdrowym szczurom [2,181]. Zauważono, że podanie SOD obniżało również ciśnienie tętnicze u szczurów z nadciśnieniem tętniczym wywołanym podaniem amin katecholowych. Również w tym modelu postuluje się zwiększoną produkcję wolnych rodników w ścianie naczynia, które niszczą wytworzony w śródbłonku tlenek azotu [2, 205].

Liczne badania wskazują, że zaburzenie homeostazy ciśnienia tętniczego, jako konsekwencja niedoboru NO w śródbłonku leży u podstaw rozwoju różnorodnych postaci nadciśnienia lub niedociśnienia tętniczego, obserwowanych u zwierząt doświadczalnych i u ludzi [185,251,252,269]. EDRF/NO wywiera wpływ na wielkość ciśnienia tętniczego krwi poprzez regulację prawidłowego przepływu nie tylko systemowego, ale również nerkowego [124,174,262]. Ponadto

tlenek azotu zapewnia właściwą funkcję wydalniczą nerek, a zwłaszcza sprawne wydalanie przez nerkę sodu [255,262]. Udowodniono, że możliwość elastycznego zwiększania produkcji NO w nerce w odpowiedzi na wzrost stężenia sodu jest konieczna dla utrzymania ciśnienia tętniczego w prawidłowych granicach [174,255, 262,276].

Związek niedoboru NO z rozwojem nadciśnienia tętniczego udowodniono w badaniach nad szczepem szczurów wrażliwych na podaż soli (Dahl/Rapp). Szczury te (wyhodowane wskutek manipulacji genetycznej), w odpowiedzi na dietę bogatosolną rozwijają nadciśnienie tętnicze, a w ich nerkach obserwuje się zmiany morfologiczne typowe dla nadciśnienia złośliwego [44]. Okazało się, że w przeciwieństwie do zdrowych szczurów, szczury Dahl/Rapp nie mogą reagować wzrostem uwalniania NO ze śródbłonka w odpowiedzi na bodziec (podaż soli). Wykazano ponadto, że podawanie szczurom wrażliwym na sól równocześnie z dietą bogatosolną L-argininy zapobiegało rozwojowi nadciśnienia i zmianom morfologicznym w nerkach [43,44].

Udział niedoboru NO w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego postuluje się również u ludzi, zwłaszcza w odniesieniu do nadciśnienia pierwotnego i niektórych form nadciśnienia wtórnego [166,181,192,269].

Obniżonej produkcji tlenu azotu i prostacykliny w śródbłonku w przebiegu nadciśnienia tętniczego [77,269,278] towarzyszy zwiększona ekspresja endoteliny I i angiotensyny II [278]. Zwiększona indukcja i wytwarzanie tych i innych (PAF, trombina, cytokiny) czynników wzrostowych przez "siły ścinania" sprzyja powstawaniu zmian strukturalnych ściany naczyń [99]. Zahamowanie "bazalnego" uwalniania tlenu azotu jest ponadto związane z nadwrażliwością ściany naczyń na czynniki o charakterze naczynioskurczowym [169]. U ludzi z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym zaobserwowano upośledzenie zależnego od śródbłonka rozkurczu naczyń, podczas gdy zachowany jest prawidłowy mechanizm rozkurczu po podaniu egzogennych donorów NO [5,161,223,224,225]. Odpowiedź ściany naczyń na "wazodilatory" które działają poprzez indukcję biosyntezy NO w śródbłonku może być nawet paradoksalna. Stwierdzono bowiem, że podanie acetylocholinę do naczyń wieńcowych osobom z nadciśnieniem tętniczym (czyli z upośledzoną funkcją śródbłonka) wywołuje znaczny skurcz tych naczyń, podczas gdy u ludzi zdrowych obserwuje się rozkurcz [28,234].

Badania Vallance'a wykazały obecność we krwi i moczu zdrowych ludzi niewielkie ilości naturalnie występującego inhibitora syntazy NO - asymetrycznej dimetylargininy (ADMA) [313]. Wysokie stężenie ADMA we krwi wykryte u pacjentów poddawanych hemodializie z powodu niewydolności nerek i

nadciśnienia, może przynajmniej w części odpowiadać za rozwój nadciśnienia tętniczego w przebiegu niewydolności nerek [314].

Wzrost liczby pacjentów poddawanych zabiegom przeszczepiania narządów uwidocznili związek pomiędzy rozwojem nadciśnienia tętniczego i przewlekłym stosowaniem cyklosporyny [1,12,59,82,168,184,269,301,309]. Cyklosporyna uszkadza śródbłonek i wywołuje silny skurcz naczyń, zwłaszcza w zakresie łożyska nerkowego. Najnowsze badania wskazują, że cyklosporyna zmniejsza produkcję NO na drodze hamowania ekspresji iNOS na poziomie mRNA w komórkach L929 pobudzonych cytokinami [82], komórkach mesangialnych stymulowanych IL-1 β [198] i w komórkach mięśni gładkich naczyń szczura [184]. Istnieją też doniesienia o możliwości indukcji nadciśnienia przez cyklosporynę poprzez wpływ na aktywność nerkowego cytochromu P-450 [12].

Zaburzenie szlaku metabolicznego L-arginina-NO może być odpowiedzialne nie tylko za wzrost, ale również za nadmierne obniżenie ciśnienia tętniczego co jest obserwowane np. w przebiegu wstrząsu septycznego [166,193,195,209,230,249,269,307]. Lipopolisacharydy uwalniane w czasie infekcji z błon bakteryjnych oraz cytokiny stanu zapalnego aktywują indukcję NOS w bardzo wielu komórkach (makrofagi, hepatocyty, śródbłonek itd). Uwolnienie dużych ilości NO do strumienia krwi powoduje nadmierne poszerzenie łożyska naczyniowego i bardzo trudny do opanowania spadek ciśnienia tętniczego [128, 230].

Hamowanie syntazy tlenku azotu we wstrząsie septycznym wydaje się być skutecznym sposobem postępowania, na co wskazują prowadzone doświadczenia u zwierząt [139,140,209,307] i nieliczne próby kliniczne u ludzi, którym podawano L-NMMA [128,230]. Brak selektywnego inhibitora iNOS prowadzi jednak do równoczesnego zahamowania cNOS i niedoboru generacji NO w łożysku naczyniowym. Stwarza to niebezpieczeństwo hipoperfuzji tkanek i powstawania zatorów płytkowych w kłębuszkach nerkowych [16,209].

Wprowadzenie do terapii cytokin np. interferonu- γ , czynników nekrozy guzów (TNF), interleukin (IL) wiąże się z występowaniem niepożądanego objawu ubocznego - spadku ciśnienia tętniczego [139]. Jest to najprawdopodobniej związane z faktem, że cytokiny są silnym bodźcem indukcji iNOS zarówno u zwierząt jak i ludzi [16,32,58,123,139]. Kwestionuje się jednak skuteczność równoczesnego podawania inhibitorów NOS aby zapobiec temu niepożądanemu spadkowi ciśnienia krwi, gdyż mogą one również zmniejszać efekt terapeutyczny cytokin.

1.11. Generacja tlenu azotu w hipercholesterolemii i miażdżycy

W hipercholesterolemii (często współistniejącej z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą) zmniejszona jest aktywność NO, a naczynia w odpowiedzi na acetylocholinę paradoksalnie obkurczają się [67,225,317,320]. Zauważono, że obniżenie poziomu cholesterolu we krwi poprzez stosowanie diety lub preparatów farmakologicznych przywraca u osób z hipercholesterolemią prawidłowe wydzielanie NO przez śródbłonek i normalizuje stan napięcia mięśni gładkich naczyń. W grupach pacjentów leczonych z powodu zaburzeń lipidowych dietą niskocholesterolową [4], cholestyraminą [4], lovastatyną [4,311], pravastatyną [76] czy zastępczą terapią estrogenową (kobiety po okresie menopauzy) [160], obserwowano wyraźną poprawę odpowiedzi ściany naczynia na acetylocholinę.

Generacja NO jest zaburzona w miażdżycy, chociaż mechanizm powstawania niedoboru tlenu azotu jest niedokładnie poznany [42,45,88,110,206,256,257,305,320]. Może on wynikać zarówno z upośledzonej aktywności cNOS, jak i ze zwiększonej degradacji NO przez zmodyfikowane LDL. Różnorodne koncepcje zakładają: zmienioną przez proces miażdżycowy aktywność receptorów dla substancji uwalniających NO (acetylocholina, bradykinina, substancja P) [88], unieczynnienie tlenu azotu przez zmodyfikowane lipoproteiny [46] lub hamowanie aktywności cykazy guanylanowej przez zmodyfikowane, lecz nie natywne LDL [273,272]. Występowanie niedoboru NO może sprzyjać rozwojowi blaszki miażdżycowej. Zwiększone pobieranie zmodyfikowanych lipoprotein o małej gęstości (mmLDL) drogą tzw. receptora "scavenger" jest uznawany za podstawę inicjacji blaszki miażdżycowej [111]. Niedobór endogennego NO sprzyja też powstawaniu promiażdżycowych, zmodyfikowanych LDL i nasila ich wychwyt przez makrofagi [332]. Udowodniono, że mmLDL hamują naczyniorozkurczową funkcję śródbłonna [67,256,305,334], stymulują produkcję cytokin i czynników wzrostu [32,214].

Rozwojowi zmian miażdżycowych, a także zaburzeniom zatorowo-zakrzepowym sprzyja też podwyższony poziom homocysteiny we krwi [250,293]. W warunkach zdrowia, niewielkie jej ilości tworzone w organizmie reagują z tlenkiem azotu i powstaje S-NO-homocysteina, która jest związkiem o biologicznych właściwościach samego NO [293]. Przy nadmiarze homocysteiny dochodzi do zwiększonej syntezy nadtlenku wodoru (H_2O_2) i jego toksycznego działania na śródbłonek [322].

1.12. Tlenek azotu w terapii chorób układu krążenia.

Ponieważ prawidłowe funkcjonowanie śródbłonka i generowanie NO pełni ważną rolę w utrzymaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego, podejmowane są próby zapobiegania dysfunkcji endotelium lub przywrócenia jego funkcji. W tym celu, w zaburzeniach gospodarki lipoproteinowej zalecane są diety niskocholesterolowe i niskotłuszczowe, wzbogacone o tłuszcze roślinne jedno- i wielonienasycone oraz oleje pochodzące z ryb [4,319]. Leczenie dietetyczne, przynajmniej u części pacjentów może wydatnie obniżyć poziom lipidów w surowicy krwi. Przy braku pożądanych efektów celowe jest zastosowanie farmakoterapii [4,76,160,311]. Udowodniono też korzystny wpływ wysiłku fizycznego, który jak wykazano w badaniach na zwierzętach zwiększa produkcję NO i ekspresję eNOS w naczyniach wieńcowych [143].

Coraz większe znaczenie prewencyjne przypisuje się substytucji hormonalnej u kobiet po okresie menopauzy. Stosowanie estrogenów obniża poziom LDL-cholesterolu, zwiększa stężenie HDL, obniża poziom fibrynogenu, insuliny, zwiększa tolerancję glukozy, obniża ciśnienie tętnicze, hamuje uwalnianie czynników wzrostu dla komórek mięśni gładkich ściany tętnicy [11,188,295,323]. Prawdopodobnie w wyniku takiej terapii nasileniu ulega synteza i uwalnianie EDRF/NO ze śródbłonka naczyniowego. Wykazano wzrost transkrypcji mRNA dla syntazy tlenu azotu, syntazy prostacykliny oraz cyklooksygenazy w wyniku długotrwałego podawania estrogenów [188].

Szczególne zainteresowanie budzi grupa leków hamujących konwersję angiotensyny I do II inhibitory (inhibitory ACE). Działanie hipotensyjne tych leków wynika również z zahamowania przez nie degradacji endogennej bradykininy [27,33,163,225,278,328]. Udowodniono, że inhibitory ACE zwiększają produkcję tlenu azotu w hodowli komórek śródbłonka i zwiększają jego uwalnianie pod wpływem bradykininy [278]. Prawdopodobnie również antyproliferacyjny wpływ tej grupy preparatów w stosunku do mięśni gładki wynika ze wzmożonej generacji tlenu azotu.

Najnowsze badania wskazują, że leczenie nadciśnienia tętniczego może wywierać korzystny wpływ na normalizację funkcji śródbłonka. Lyons wykazał, że z uwagi na zaburzenia w uwalnianiu tlenu azotu u ludzi z nadciśnieniem tętniczym, lokalne dotętnicze podanie L-NMMA wywołuje u nich tylko nieznaczną odpowiedź [171]. O ile u zdrowych ludzi po miejscowym podaniu L-NMMA (do tętnicy ramiennej) dochodzi do wzrostu ciśnienia tętniczego i oporu naczyniowego, to w nadciśnieniu tętniczym ten efekt jest wyraźnie mniejszy (z uwagi na niskie podstawowe uwalnianie NO u pacjentów z nadciśnieniem).

Podawanie tym chorym przez okres 6 tygodni enalaprilu lub amlodipiny spowodowało znamienne obniżenie ciśnienia tętniczego, ale także normalizację odpowiedzi naczyń na podanie L-NMMA (skurcz, wzrost ciśnienia) [171].

Prowadzone są też próby przywracania prawidłowej czynności śródbłonna na drodze dostarczania nadmiaru substratu do jego syntezy - L-argininy. Pomimo, że stężenie argininy we krwi jest wysokie, to istnieje szereg badań, które wskazują, że podanie tego aminokwasu przywraca niektóre funkcje śródbłonna naczyniowego u zwierząt i ludzi [54,57,73,74,319,315]. W badaniach doświadczalnych udowodniono nawet, że L-arginina może przeciwdziałać pojawianiu się zmian miażdżycowych [73,315]. Obserwacje prowadzone na zdrowych ochotnikach pokazały, że L-arginina podana dożylnie (30g/300ml/30min) obniża ciśnienie tętnicze krwi, obniża opór obwodowy, zwiększa częstość akcji serca [125,126,203,204]. Wyrazem zwiększonej generacji NO w tych badaniach był wzrost stężenia cGMP i L-cytruliny w surowicy krwi, a także wzrost wydalania w moczu azotanów i azotynów [125,126].

Osobną grupę badań stanowią próby podawania nie substratu, a samego tlenu azotu pacjentom z podwyższonym ciśnieniem np. w łożysku naczyń płucnych [97,166,254,258,259,278]. Wykazano, że podanie w inhalacji niewielkich dawek tlenu azotu wywołuje wybiórczy rozkurcz naczyń w obszarach płuc o upośledzonej wentylacji [112]. Zauważono też, że wdychanie tlenu azotu obniża nadciśnienie płucne u ludzi z zespołem ARDS [258], a także u noworodków z przetrwałym nadciśnieniem płucnym [254,259]. Równocześnie zaobserwowano rozszerzający wpływ NO na oskrzela, co stwarza możliwość alternatywnej drogi leczenia stanów skurczowych oskrzeli [166].

2. CEL PRACY

Celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie: czy przedłużone, dożylne podawanie L-argininy może zwiększyć generację tlenku azotu w śródbłonku naczyniowym i tym samym wywierać korzystne efekty krążeniowe i biochemiczne u pacjentów z pierwotnym, opornym na leczenie nadciśnieniem tętniczym. Ocenę tę próbowano przeprowadzić na podstawie badań:

1. Pomiarów: skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz tętna, przeprowadzanych w trakcie okresowego podawania L-argininy przez 7 kolejnych dni i 24-godzinne automatyczne monitorowanie tych parametrów.

2. Oznaczania stężenia cGMP w surowicy oraz azotanów i azotynów w moczu, jako wyznaczników generacji tlenku azotu u pacjentów którym podawano L-argininę.

3. Badania wybranych parametrów biochemicznych: aktywności płytek krwi, aktywności fibrynolitycznej i reninowej osocza u pacjentów tej grupy.

Dodatkowo przeanalizowano wpływ wlewów L-argininy na wartości ciśnienia tętniczego w grupach pacjentów z wysokim i niskim stężeniem LDL-cholesterolu, oraz wykonano analizę odpowiedzi ciśnienia tętniczego na stosowaną L-argininę w zależności od wyjściowych wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał.

Pacjenci do badań byli rekrutowani spośród chorych zarejestrowanych w Przyklinicznej Przychodni Nadciśnieniowej I Kliniki Kardiologii. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badań w całym okresie jego trwania byli hospitalizowani w tej klinice.

Badaniem zostało objętych 30 mężczyzn w wieku 40 - 67 lat ($\bar{x}=51.5$, $SD=7.3$) z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. U chorych tych wykluczono współistnienie innych chorób, w szczególności ostrą chorobę niedokrwienną serca, choroby nerek, wątroby, cukrzycę oraz inne zaburzenia endokrynologiczne. Wszyscy zakwalifikowani chorzy uczestniczyli w pełnym cyklu badań.

Czasokres nadciśnienia (mierzony od momentu stwierdzenia pierwszy raz podwyższonego ciśnienia tętniczego) wynosił u tych pacjentów średnio 14.9 lat, $SD = 10.8$. Dwudziestu pięciu spośród badanych miało rozpoznany II stopień, a pięciu III stopień nadciśnienia tętniczego według klasyfikacji WHO. Wszyscy pacjenci w okresie poprzedzającym badanie poddani byli terapii skojarzonej przy użyciu leków obniżających ciśnienie tętnicze, należących do grup: β -adrenolityków, inhibitorów enzymu przekształcającego (inhibitory ACE), blokerów kanału wapniowego, leków moczopędnych, leków o działaniu ośrodkowym i leków rozszerzających naczynia tętnicze. U pacjentów tych rozpoznawano oporność na leczenie (przy skojarzonym leczeniu przeciwciśnieniowym 3 preparatami, w okresie powyżej 1 miesiąca, ciśnienie tętnicze przekraczało 160/65 mmHg).

W celu oceny aktualnego stanu zdrowia i kontroli zaawansowania nadciśnienia tętniczego po przyjęciu do kliniki, chorzy poddawani byli szczegółowemu badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu, a następnie wykonywano u nich niezbędne badania dodatkowe.

Przez cały okres hospitalizacji pacjenci pozostawali na diecie z ograniczeniem spożycia soli oraz tłuszczów zwierzęcych. W celu zmniejszenia ilości wydalanych z moczem związków azotowych (produktów przemian białek), na 24 godziny przed planowanymi wlewami wprowadzono również ograniczenie spożycia białka do 0,5 g/kg wagi należnej na dobę. Z uwagi na zaawansowanie choroby, farmakologiczne leczenie przeciwciśnieniowe nie było odstawiane. To niezbędne leczenie hipotensyjne było prowadzone z użyciem leków z grup: β -adrenolityków, inhibitorów enzymu konwertującego, blokerów kanału

wapniowego i leków o działaniu ośrodkowym. Stosowane preparaty i ich dawki nie ulegały zmianie w trakcie pobytu pacjenta w klinice. Nie stosowano natomiast preparatów moczopędnych, jak również nie podawano nitratów, aspiryny i leków przeciwzakrzepowych.

U wszystkich pacjentów wykonano standartowe laboratoryjne badania diagnostyczne (OB, morfologię krwi, stężenie jonów w surowicy - sodu, potasu i chloru, stężenie mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, bilirubiny, glukozy w surowicy krwi, badanie aktywności niektórych enzymów w surowicy - transaminazy asparaginianowej, transaminazy alaninowej, fosfatazy alkalicznej, gammaglutamylotransferazy, cholinesterazy, dehydrogenazy mleczanowej, amylazy, badanie stężenie białka całkowitego w surowicy z proteinogramem, lipidogram w surowicy krwi i badanie ogólne moczu). Dodatkowo u każdego chorego przeprowadzono w całodobowej zbiorce moczu oznaczenia:

- wydalania jonów (sód i potas);
- stężenia kwasu wanilino-migdałowego,
- stężenia kwasu 5-hydroksyindolooctowego,
- stężenia 17-hydroksysteroidów i 17-ketogennych sterydów,
- stężenia kreatyniny.

Ponadto każdy pacjent miał wykonany elektrokardiogram spoczynkowy, badanie radiologiczne klatki piersiowej, echokardiogram i badanie okulistyczne z oceną dna oka. Jeżeli zachodziły wskazania, niektórzy spośród chorych mieli wykonywane również inne badania np. ekg wysiłkowe, 24-godzinne monitorowanie akcji serca metodą Holtera.

Po wykonaniu wstępnych oznaczeń i ocenie lekarskiej, chorzy zakwalifikowani do dalszych badań, zostali o nich indywidualnie, ustnie i pisemnie poinformowani przez lekarza. Pacjenci wyrażali na proponowane badanie pisemną zgodę, pouczeni o możliwości rezygnacji z niego w każdej chwili. Projekt prowadzonych obserwacji uzyskał również akceptację Komisji Etycznej Collegium Medicum UJ.

3.2. Podawanie L-argininy

Właściwe obserwacje były prowadzone przez 5 kolejnych dni (od poniedziałku do piątku). W pierwszym dniu ("dzień 0") chory otrzymywał podawany ze stałą prędkością przez 180 minut wlew kroplowy 300 ml 0,9% roztworu soli fizjologicznej (0.9% NaCl), który stanowił w tym badaniu kontrolę. W następnych, kolejnych 4 dniach ("dzień I-IV") stosowano wlewy z L-argininy. Chlorowodorek L-argininy (L-argininhydrochlorid-Lösung firmy Clintec Salvia)

podawano w dawce 16.84 g i w objętości 300 ml każdego dnia przez 3 godziny. Wszystkie wlewy przeprowadzono w godzinach porannych, pomiędzy 9.00 a 12.00. Zarówno roztwór soli fizjologicznej jak i aktywnego preparatu był podawany bezpośrednio do lewej żyły łokciowej. Każdego dnia na 30 minut przed wlewem pacjent przyjmował pozycję leżącą i pozostawał w niej do 1 godziny po zakończonej kroplówce.

3.3. Prowadzone obserwacje

Pomiary ciśnienia tętniczego i tętna

Po wykluczeniu różnic w wielkości ciśnienia tętniczego pomiędzy kończynami górnymi, pomiary ciśnienia tętniczego były następnie dokonywane na prawym ramieniu, przy użyciu manometru rtęciowego. Pierwszy pomiar był wykonywany bezpośrednio przed wlewem soli fizjologicznej lub L-argininy, a następne odczyty ciśnienia tętniczego były przeprowadzane w półgodzinnych odstępach przez cały okres prowadzonego wlewu. Pomiarów dokonywano w pozycji leżącej, z szybkością redukcji ciśnienia około 2mmHg/sekundę i z dokładnością do 2mmHg. Równoległe z dokonywanymi pomiarami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, mierzono tętno na tętnicy promieniowej.

Dwukrotnie w trakcie prowadzonych obserwacji wykonano 24-godzinną, automatyczną rejestrację ciśnienia tętniczego i tętna przy pomocy aparatu Space Labs 90202a. Aparat ten był każdorazowo zakładany o godz. 13.00 i przez kolejne 24 godziny dokonywał automatycznych pomiarów ciśnienia tętniczego i tętna w odstępach 30-minutowych w godzinach od 6.00 do 22.00 i w odstępach 60-minutowych w godzinach od 22.00 do 6.00. Pierwsze monitorowanie przeprowadzane było przed zastosowaniem wlewów z L-argininy i swoim zasięgiem obejmowało wartości ciśnienia i tętna rejestrowane w trakcie podawanej soli fizjologicznej w dniu "0". Drugi raz automatyczne pomiary ciśnienia i tętna przeprowadzono w trakcie podawania L-argininy i rejestrowano wartości ciśnienia i tętna stwierdzone w drugim dniu stosowania tego preparatu (dzień "II").

Badanie agregacji płytek krwi

Wykonane było w "0" i "II" dniu prowadzonych wlewów. Krew pobierano czterokrotnie: bezpośrednio przed wlewem soli fizjologicznej i w 120 minucie jego trwania oraz bezpośrednio przed wlewem L-argininy (dzień II) i w 120 minucie jej infuzji. Agregację płytek przeprowadzono w osoczu bogatopłytkowym PRP (Platelet Rich Plasma) uzyskanym z pobranej od pacjenta

świeżej krwi (z dodatkiem 3.15% cytrynianu sodu w stosunku 10:1), poprzez 10-minutowe wirowanie w temperaturze pokojowej przy 900 x g. Dla potrzeb tej metody używano osocza bogatopłytkowego, rozcieńczonego do standartowej ilości płytek - 200 tys./mm³. Rozcieńczenie płytek w PRP do pożądanego stężenia dokonywano za pomocą własnego osocza ubogopłytkowego PPP (Platelet Poor Plasma) pacjenta. PPP uzyskiwano poprzez 20-minutowe odwirowanie części krwi lub części PRP przy 2000 x g. W celu wykonania agregacji przygotowywano próbkę odniesienia (ślepa), którą dla PRP stanowiło PPP. Pomiarów agregacji dokonywano przy pomocy Lumi Agregometru (model 500-Ca firmy Chrono-log Corporation z rejestratorem). Stosowanym czynnikiem proagregacyjnym było ADP (ADP reagent Chrono-par 384). Zgodnie z zasadą pomiaru agregacji płytek krwi wg. Borna [22] w agregometrze zachodzi ciągły pomiar zmian transmisji światła przechodzącego przez stale mieszane osocze bogatopłytkowe. W wyniku tworzenia się agregatów płytkowych dochodzi do zwiększenia transmisji światła, co można zaobserwować na rejestratorze w postaci wykresu. Stopień wzrostu transmisji zależy od nasilenia procesu agregacji płytek. W przypadku dezagregacji płytek transmisja światła wtórnie obniża się. W przeprowadzonym badaniu wyznaczano progowe stężenie ADP, czyli najniższe stężenie, które powoduje nieodwracalną agregację o widocznej dwuetapowości przebiegu.

Badanie aktywności fibrynolitycznej osocza

Wykonywane było czterokrotnie; dwukrotnie w dniu wlewu soli fizjologicznej (dzień "0"), (krew pobrana przed wlewem i w 120 minucie jego trwania) oraz dwukrotnie w drugim dniu podawania L-argininy (dzień "II"), (krew pobrana przed wlewem i w 120 minucie infuzji). Oznaczanie przeprowadzano poprzez określenie czasu lizy skrzepu euglobulinowego wg. von Kauli [137]. Krew pobierano do plastikowych probówek na 3.8% cytrynian w stosunku 4+1, a następnie odwirowywano osocze w temperaturze pokojowej przez 5 minut przy obrotach 2000 x g. Do uzyskanego osocza ubogopłytkowego dodawano redestylowaną wodę w stosunku 1+15 i uzyskany roztwór zakwaszono gazowym dwutlenkiem węgla do pH = 5.4. Tak uzyskane wytrącone euglobuliny odwirowywano (3000 rpm przez 5 minut w temperaturze pokojowej), a następnie po odlaniu supernatantu pozostały osad (euglobuliny) rozpuszczano w 1ml buforu Michaelisa (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄ pH=7.3) i dodawano trombinę (2U/300μl), uzyskując skrzep. Mierzono czas upłynięcia skrzepu (w minutach) w warunkach łaźni wodnej o temperaturze 37°C.

Badanie aktywności reninowej osocza

Przeprowadzane było czterokrotnie: w próbce krwi pobranej bezpośrednio przed infuzją 0.9% NaCl i w 120 minucie jej wlewu (dzień "0"), oraz w próbkach krwi uzyskanych przed podaniem L-argininy i w 120 minucie jej wlewu w "II" dniu badania.

Oznaczenie wykonywane było metodą radioimmunologiczną (RIA), przy użyciu zestawu Biodata Renin MAIA kit, code 12964. Zestaw ten służy do oceny aktywności reninowej osocza poprzez radioimmunologiczne oznaczenie angiotensyny I. U leżącego pacjenta pobierano krew do schłodzonych próbek zawierających EDTA-Na₂ (2mg/ml krwi). Probówki z krwią były natychmiast umieszczane w łaźni lodowej i lodówce o temperaturze 4°C. Krew odwirowywano w temperaturze 4°C przy 2000 obrotach na minutę, a następnie próbki osocza zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C. Oznaczenia dokonywano nie później niż w 1 miesiąc od pobrania krwi. Osocze inkubowano w standartowych warunkach (90 min. w pH 6.0, 3 godziny w pH 7.4 w 4° i 37°C) w celu wyzwolenia generacji angiotensyny I przez reninę. Dodanie enzymatycznego inhibitora zapobiegało degradacji angiotensyny I. W następnym etapie przeprowadzono oznaczenie oparte na współzawodnictwie pomiędzy antygenem pochodzącym z próbek badanych i próbek standardowych a angiotensyną znakowaną ¹²⁵J o wiązanie się ze swoistymi przeciwciałami. Ilość znacznika związanego z cząsteczką przeciwciała była odwrotnie proporcjonalna do ilości antygeny obecny w próbkach standardowych i badanych. Czulość metody dla opisywanego zestawu wynosiła 0.039 ng/ml, a specyficzność powyżej 99%.

Badanie stężenia cyklicznego 3',5'- monofosforanu guanozyny (cGMP)

Dokonywano dwukrotnie w dniu "0" w próbce krwi pobranej bezpośrednio przed wlewem soli fizjologicznej i w 120 minucie jego trwania. Ponowne dwukrotne oznaczenie przeprowadzono w drugim dniu infuzji L-argininy (dzień "II") w próbkach krwi pobranych przed wlewem i w 120 minucie podawania L-argininy.

Krew po pobraniu do próbek zawierających 7.5 mM EDTA odwirowywano w 2000g przez 15 minut w 4°C, a następnie próbki osocza zamrażano w -20°C. Oznaczenia dokonywano metodą radioimmunologiczną, w której wykorzystano współzawodnictwo pomiędzy nieznakowanym a znakowanym ¹²⁵J cGMP o ograniczoną ilość miejsc wiążących specyficznego przeciwciała. Ilość radioaktywnego znacznika powiązanego z cząsteczką przeciwciała była odwrotnie proporcjonalna do stężenia dodanego cGMP. W celu

osiągnięcia optimum czułości przeprowadzano acetylację próbek zawierających standardy jak i próbek badanych przez dodanie mieszaniny acetylującej, zawierającej jedną objętość bezwodnika kwasu octowego i 2 objętości trójetyloaminy. Czułość metody wynosiła 0.005 pmol/ml, a swoistość przewyższała 99.9% (niska reakcja krzyżowa z cAMP).

Oznaczenie stężenia azotynów/azotanów w moczu

Badanie przeprowadzane było u każdego pacjenta dziesięciokrotnie. Każdego dnia prowadzonych wlewów (dzień "0"- "IV") zarówno soli fizjologicznej jak i L-argininy określano stężenie azotynów w próbce moczu oddanego na około pół godziny przed rozpoczęciem infuzji. Druga próbka moczu w każdym dniu prowadzonego badania była uzyskana w około 1 godzinę po zakończonym wlewie.

Do badań wykorzystano jonoselektywną elektrodę gazową (azotynowa elektroda gazowa firmy "Detektor" s.c. Aparatura elektrochemiczna Warszawa), która umożliwia pomiar stężenia tlenków azotu w roztworach wodnych. Główną częścią elektrody jonoselektywnej jest membrana, która styka się z dwoma roztworami: wewnętrznym o stałym składzie i zewnętrznym - badanym. Pomiedzy powierzchnią membrany a stykającym się z nią roztworem zachodzi reakcja wymiany jonowej, w wyniku której na granicy faz membrana - roztwór występuje pewien potencjał elektryczny.

Do próbki moczu o objętości 5 ml dodawano 5 ml 0.5 mol/l BaCl_2 w celu usunięcia węglanów, a następnie próbkę wirowano 10 minut przy szybkości 3000 obrotów na minutę. Pomiarów potencjałów dokonywano w supernatancie po zakwaszeniu próbki przez dodanie 0.5 ml 4.3 mol/l H_3PO_4 . Ilość generowanego z $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ tlenku azotu mierzono poprzez zmianę potencjału elektrody NO - selektywnej, zanurzonej w badanej próbce moczu, która przez cały okres pomiaru była mieszana mieszadłem magnetycznym. Po dokonaniu pierwszego pomiaru potencjału, do próbki dodawano odpowiednią ilość wzorca wewnętrznego - 0.1 mol/l NaNO_2 i po upływie minuty notowano wartość potencjału. W obliczeniach zawartości tlenku azotu w moczu korzystano z metody dodawania wzorca. W metodzie tej nieznane stężenie badanego roztworu ocenia się na podstawie zmiany siły elektromotorycznej elektrody jonoselektywnej.

3.4. Metody statystyczne

Wszystkie obliczenia statystyczne zostały dokonane przy pomocy pakietu SAS System (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) dla komputerów osobistych.

W celu uwidocznienia zmian w wartościach skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, dokonanych pod wpływem podawanych infuzji, w obliczeniach zastosowano analizę wariancji (tzw. modele uogólnione GLM), badające trendy czasowe w obrębie poszczególnych dni prowadzonego badania. Wyżej wymieniona analiza pozwoliła również na ocenę zmienności międzypersonicznej. Do zastosowanego modelu dodano zmienną grupującą, dzięki której prześledzono zmiany ciśnienia tętniczego wśród pacjentów z różnymi poziomami LDL-cholesterolu, cholesterolu całkowitego. Inny model zastosowany w programie GLM zakładał różne wyjściowe wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego.

Analizę badanych w poszczególnych dniach parametrów biochemicznych przeprowadzono w oparciu o obliczone wartości średnie i SD, a znamienność statystyczną określono przy użyciu testu t Studenta.

Obserwowane w trakcie wlewów L-argininy zmiany parametrów hemodynamicznych i biochemicznych odnoszono do analogicznych parametrów rejestrowanych w "0" dniu badania, czyli infuzji 0,9% roztworu soli fizjologicznej.

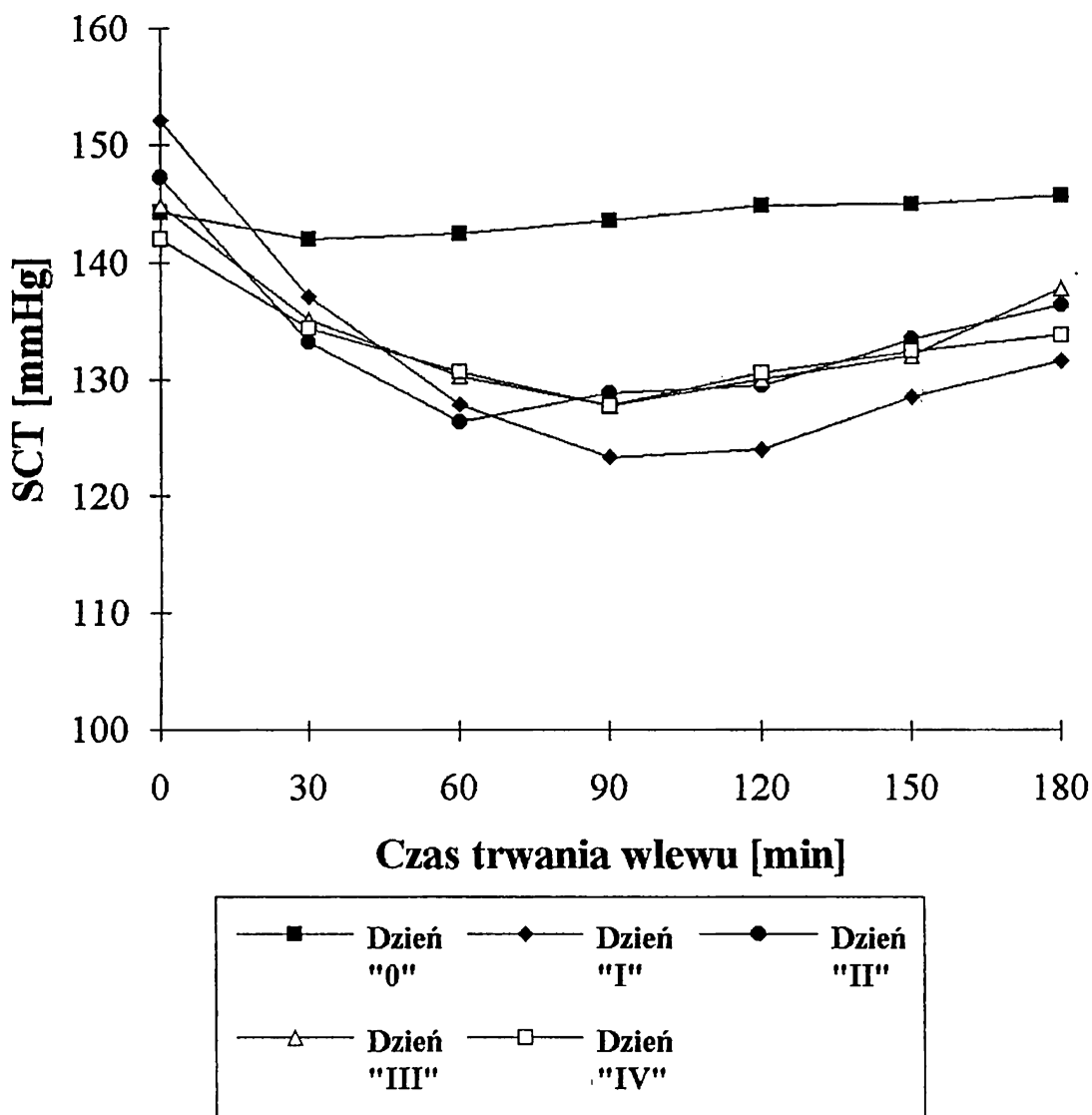
4.1. Pomiary ciśnienia tętniczego i tętna

Pomiary skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz tętna w trakcie wlewów soli fizjologicznej oraz L-argininy

Zmiany skurczowego ciśnienia tętniczego obserwowane w trakcie prowadzonych wlewów z soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dzień "I-IV") przedstawiono na ryc.1. W trakcie dożylnego wlewu soli fizjologicznej nie obserwowano żadnych istotnych zmian w wartościach skurczowego ciśnienia tętniczego. Średnie skurczowe ciśnienie tętnicze (SCT) mierzone przed wlewem wynosiło 144.34mmHg, SD=17.56. Kolejne średnie wartości SCT uzyskane z pomiarów dokonywanych co 30 minut w trakcie wlewu wynosiły: 142.00mmHg, SD=16.51; 142.55mmHg, SD=16.51; 143.65mmHg, SD=15.23; 144.82mmHg, SD=15.67; 144.96mmHg, SD=14.63; 145.72mmHg, SD=14.48.

W każdym dniu dożylnego podawania L-argininy (dnie "I-IV") obserwowano trend obniżania się skurczowego ciśnienia tętniczego w miarę czasu trwania wlewu. Przeanalizowano zmiany w SCT w zależności od dnia w którym podawano L-argininę i czasu trwania wlewu, z uwzględnieniem zmienności międzypersonicznej (analiza wariancji GLM) i wykazano, że we wszystkich czterech dniach wlewu L-argininy trend obniżania się SCT nosił cechy trendu drugiego stopnia (funkcja kwadratowa zmiennej czasowej) o dużej znamienności statystycznej ($p < 0.01$).

Wyjściowe średnie ciśnienia skurczowe przed wlewem L-argininy w poszczególnych dniach badania nie różniły się istotnie od średniego SCT w "0" dniu badania przed wlewem soli fizjologicznej. Natomiast zaobserwowano, że we wszystkich dniach podawania L-argininy obniżanie się skurczowego ciśnienia tętniczego następowało szybciej w pierwszych, a wolniej w dalszych minutach wlewu (ryc.1). Najniższe wartości SCT rejestrowano w 90 minucie "I" dnia ($\bar{x}=123.31\text{mmHg}$, SD=16.18), w 60 minucie "II" dnia ($\bar{x}=126.34\text{mmHg}$, SD=15.74), w 90 minucie "III" dnia ($\bar{x}=127.79\text{mmHg}$, SD=12.23) i w 90 minucie "IV" dnia ($\bar{x}=127.70\text{ mmHg}$, SD=13.35). Wartości skurczowych ciśnień rejestrowanych w ostatnich minutach wlewu (120, 150, 180 minuta) były wyższe od ciśnień rejestrowanych we wcześniejszych okresach wlewów, ale nadal znamienne niższe w porównaniu do analogicznych wartości w dniu podawania soli fizjologicznej (dzień "0") (Ryc.1).



Ryc. 1 Zmiany średniego skurczowego ciśnienia tętniczego (SCT) rejestrowane w trakcie wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dnie "I", "II", "III" i "IV")

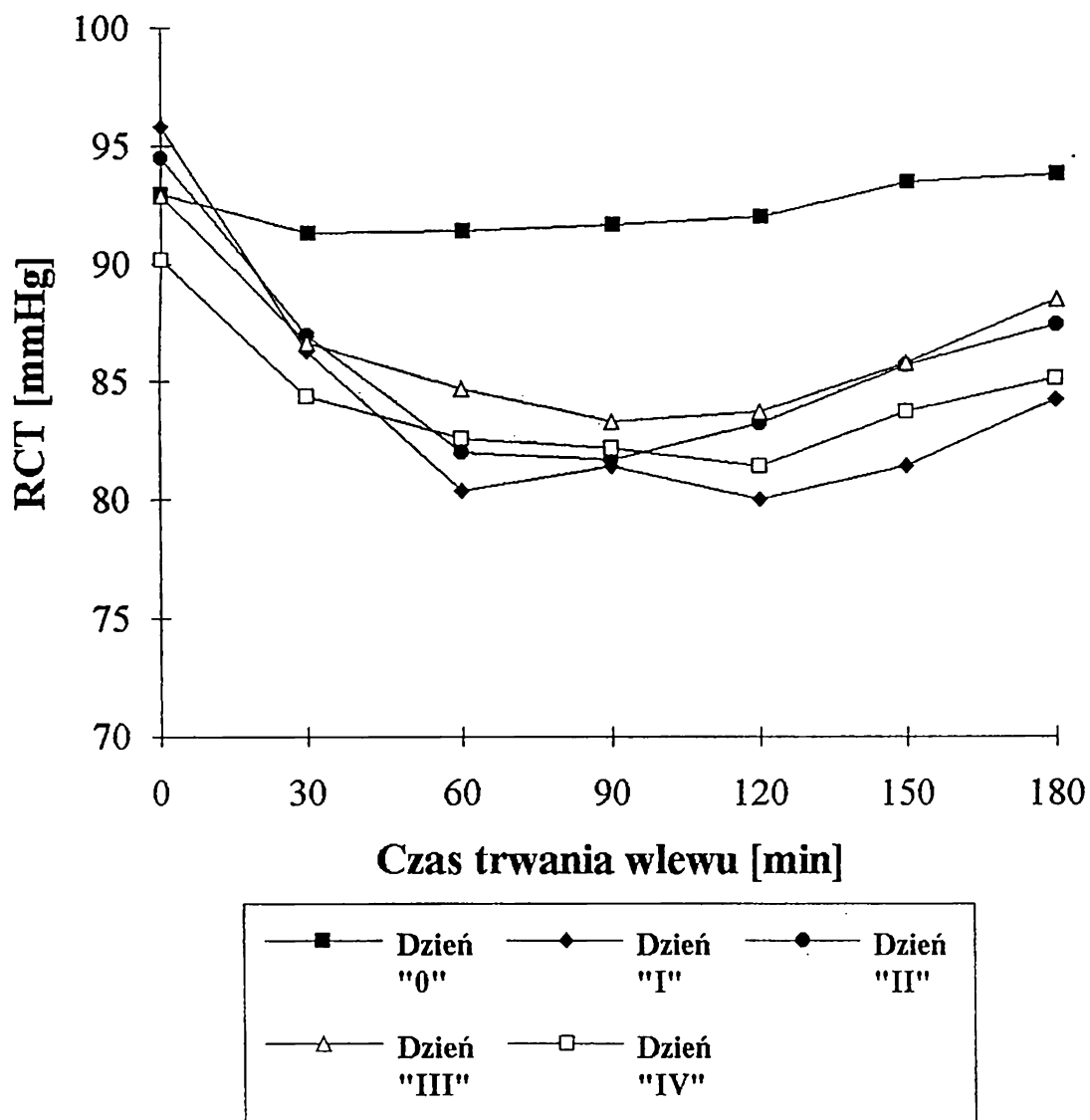
Najsilniejszy efekt hipotensyjny w trakcie podawania L-argininy obserwowano w "I" dniu. Średnie SCT obniżyło się z wartości 152.13 mmHg (SD=20.02) maksymalnie do wartości 123.31 mmHg (SD=16.18) w 60 minucie wlewu (o około 19%).

Procentowy, maksymalny spadek skurczowego ciśnienia tętniczego był w każdym kolejnym dniu wlewu L-argininy niższy. W "II" dniu wynosił - 14.3%, w "III" dniu - 11.9% i w "IV" dniu - 10.1%.

Na ryc.2 przedstawiono zmiany rozkurczowego ciśnienia tętniczego obserwowane w trakcie wlewu soli fizjologicznej (dzień "0") oraz L-argininy (dnie "I-IV"). W trakcie infuzji soli fizjologicznej nie obserwowano żadnych istotnych zmian w wartościach rozkurczowego ciśnienia tętniczego (RCT). Średnie RCT mierzone przed wlewem wynosiło 93.03 mmHg, SD=9.25. Kolejno rejestrowane średnie RCT wynosiło: w 30 minucie - 91.38 mmHg (SD=9.29), w 60 minucie - 91.44 mmHg (SD=9.00), w 90 minucie - 91.72 mmHg, (SD=9.55), w 120 minucie - 92.00 mmHg, (SD=9.66), w 150 minucie - 93.51 mmHg, (SD=9.23) i w 180 minucie - 93.86 mmHg, (SD=8.53). Wyjściowe, rejestrowane przed wlewami (soli fizjologicznej i L-argininy we wszystkich dniach prowadzonego badania) średnie wartości RCT nie różniły się istotnie między sobą. W trakcie podawania L-argininy obserwowano trend obniżania się rozkurczowego ciśnienia tętniczego o charakterze trendu drugiego stopnia (funkcja kwadratowa dla zmiennej czasowej) o dużej istotności statystycznej ($p < 0.01$), (analiza wariancji GLM). W każdym dniu wlewu L-argininy średnie wartości RCT różniły się znamienne ($p < 0.01$) od analogicznych wartości rejestrowanych w przebiegu wlewu soli fizjologicznej.

Podobnie do skurczowego, rozkurczowe ciśnienie tętnicze w największym stopniu obniżało się w "I" dniu wlewu L-argininy. Średnie RCT obniżyło się w tym dniu z wartości 95.86 mmHg (SD=13.56) do 80.00 mmHg (SD=9.68) w 120 minucie wlewu (o około 17%). W kolejnych dniach maksymalny spadek RCT w stosunku do wartości przed wlewem wynosił 13.5% w "II" dniu, 10.4% w "III" dniu, oraz 9.8% w "IV" dniu.

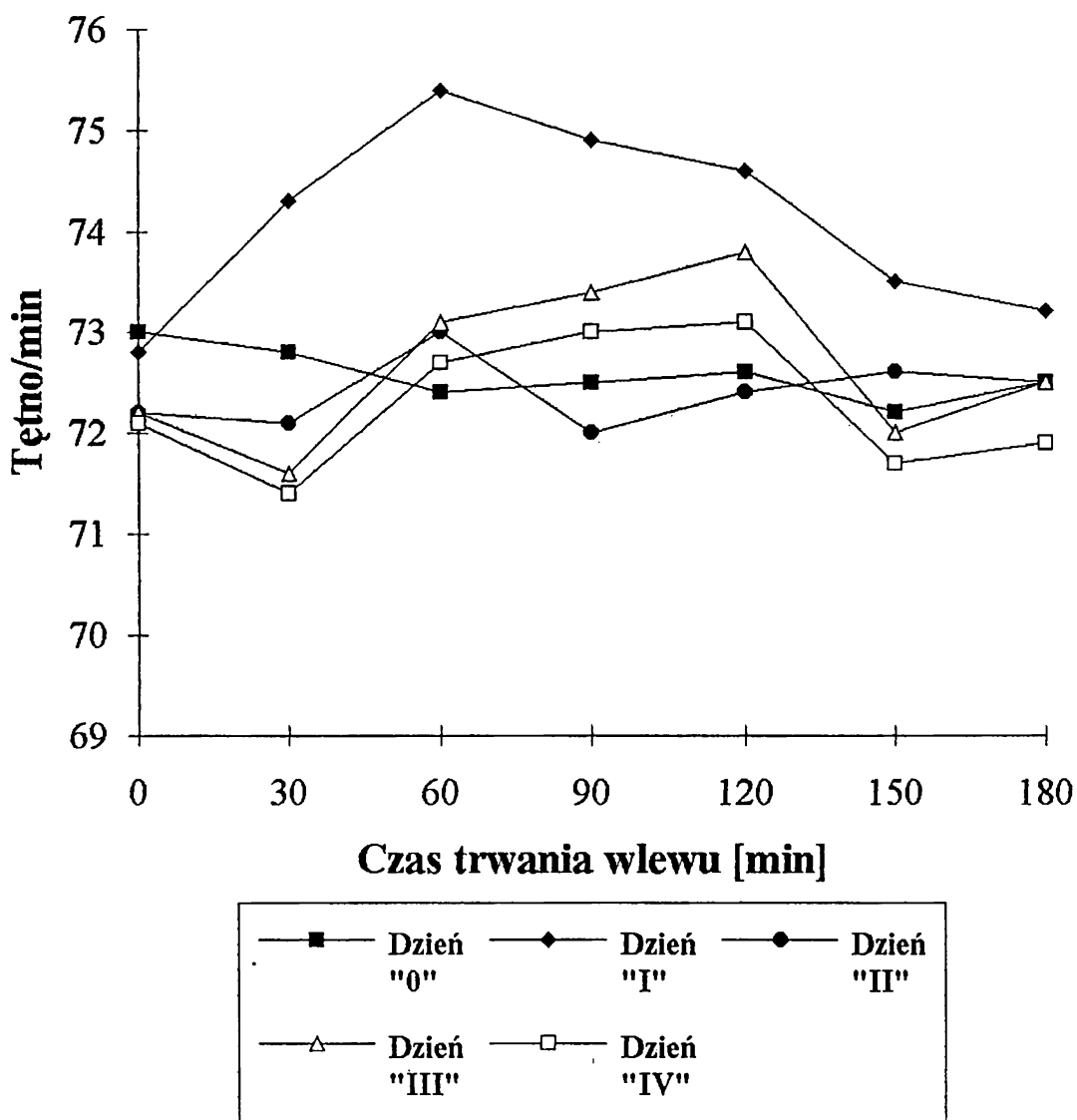
Najniższe średnie wartości RCT zarejestrowano w "I" dniu w 120 minucie wlewu (\bar{x} =80.00 mmHg, SD=9.68), w "II" dniu w 90 minucie (\bar{x} =81.79 mmHg, SD=7.11), w "III" dniu w 90 minucie (\bar{x} =83.37 mmHg, SD=8.88), a w "IV" dniu w 120 minucie (\bar{x} =81.44 mmHg, SD=7.53). Średnie wartości RCT rejestrowane w 150 i 180 minucie wlewu były wyższe, ale nadal znamienne niższe od analogicznych wartości rejestrowanych w czasie wlewu soli fizjologicznej i znamienne niższe od średnich wartości RCT rejestrowanych przed wlewem każdego dnia ($p < 0.01$).



Ryc. 2 Zmiany średniego rozkurczowego ciśnienia tętniczego (RCT) rejestrowane w trakcie wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dnie "I", "II", "III" i "IV")

Zmiany w częstości tętna obserwowane w trakcie wlewu soli fizjologicznej były niewielkie i nieznamiennie statystycznie (ryc.3). Średnie wartości tętna przed wlewem 0.9% NaCl wynosiły - 73.00 uderzeń na minutę (SD=7.27). Kolejne, rejestrowane co 30 minut średnie wartości tętna wynosiły: w 30 minucie - \bar{x} =72.82 uderzeń/min.(SD=6.96), w 60 minucie - \bar{x} = 72.44 uderzeń/min. (SD=7.25), w 90 minucie - \bar{x} =72.58 uderzeń/min. (SD=6.73), w 120 minucie - \bar{x} =72.68 uderzeń/min. (SD=6.77), w 150 minucie - \bar{x} =72.20 uderzeń/min. (SD=7.09), w 180 minucie - \bar{x} =72.58 uderzeń/min. (SD=7.17).

W każdym dniu wlewu L-argininy obserwowano wzrost częstości tętna pod wpływem podawanego preparatu i trend ten był istotny statystycznie ($p<0.01$) (ryc.3). Największy wzrost częstości tętna obserwowano w "I" dniu infuzji. Średnia częstość tętna wzrosła z 72.89 uderzeń/min. (SD=7.09) przed wlewem do 75.44 (SD=8.48) uderzeń/min. w 60 minucie wlewu, co stanowiło 3.5% wzrost. W pozostałych dniach podawania L-argininy wzrost był mniejszy i wynosił maksymalnie 1% w "II" dniu, 2% w "III" dniu i 1.5% w "IV" dniu. Największe zmiany w częstości tętna były obserwowane w 30 - 120 minucie podawanych wlewów, a w dalszych minutach średnie wartości tętna zbliżały się do wartości rejestrowanych przed wlewem.



Ryc. 3 Zmiany częstości tętna obserwowane w trakcie wlewu soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dni "I", "II", "III" i "IV")

Całodobowe monitorowanie ciśnienia tętniczego i tętna

Wyniki całodobowego monitorowania skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego z doby w której podawano sól fizjologiczną i z doby w której stosowano wlew L-argininy przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1. Średnie wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego wyliczone na podstawie całodobowego automatycznego monitorowania ciśnienia tętniczego, przeprowadzonego w dniu wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dzień "II").

Ciśnienie tętnicze	Okres	Wlew	
		0,9 % NaCl	L-arginina
Skurczowe	Dzień 6 ⁰⁰ - 22 ⁰⁰	\bar{x} = 140.68 mmHg SD = 15.96	\bar{x} = 134.09 mmHg SD = 11.62
	Noc 22 ⁰⁰ - 6 ⁰⁰	\bar{x} = 130.45 mmHg SD = 16.01	\bar{x} = 126.99 mmHg SD = 13.96
Rozkurczowe	Dzień 6 ⁰⁰ - 22 ⁰⁰	\bar{x} = 91.05 mmHg SD = 10.75	\bar{x} = 85.89 mmHg SD = 8.25*
	Noc 22 ⁰⁰ - 6 ⁰⁰	\bar{x} = 81.87 mmHg SD = 10.61	\bar{x} = 79.95 mmHg SD = 9.07

* p < 0.05

Średnie skurczowe ciśnienie tętnicze wyliczone na podstawie automatycznego rejestrowania ciśnienia tętniczego (co pół godziny w ciągu dnia i co 1 godzinę w nocy) było wyższe w dniu podawania soli fizjologicznej od analogicznej wartości w dniu podawania L-argininy i to zarówno w dzień jak i w nocy, chociaż różnice te były nieznamiennie statystycznie.

Podobnie średnie rozkurczowe ciśnienie tętnicze (RCT) wyliczone z automatycznego monitorowania było w dniu wlewu soli fizjologicznej wyższe zarówno w dzień jak i w nocy od średniego RCT w dniu wlewu L-argininy. Różnice w średnim RCT dla godzin 6-22 były istotne statystycznie (p < 0.05). Dane uzyskane z całodobowego, automatycznego monitorowania ciśnienia

tętniczego pozwoliły na określenie zmienności ciśnienia w ciągu doby ocenianej jako odchylenie standardowe ze wszystkich pomiarów dokonanych w trakcie dnia i nocy (tabela 2).

TABELA 2. Zmienność ciśnienia tętniczego oceniana jako odchylenia standardowe (SD) ze wszystkich pomiarów ciśnienia w ciągu doby w dniu wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dzień "II").

Ciśnienie tętnicze	Okres	Wlew	
		0.9 % NaCl	L-arginina
Skurczowe	Dzień 6 ⁰⁰ - 22 ⁰⁰	$\bar{x} = 140.68$ mmHg SD = 21.62	$\bar{x} = 134.10$ mmHg SD = 18.15**
	Noc 22 ⁰⁰ - 6 ⁰⁰	$\bar{x} = 130.45$ mmHg SD = 20.59	$\bar{x} = 126.99$ mmHg SD = 18.07*
Rozkurczowe	Dzień 6 ⁰⁰ - 22 ⁰⁰	$\bar{x} = 91.07$ mmHg SD = 16.03	$\bar{x} = 85.89$ mmHg SD = 13.93**
	Noc 22 ⁰⁰ - 6 ⁰⁰	$\bar{x} = 81.88$ mmHg SD = 14.71	$\bar{x} = 79.96$ mmHg SD = 13.38**

* p < 0.05

** p < 0.01

Pacjenci, którym zastosowano wlewy soli fizjologicznej a następnie L-argininy wykazywali dużą zmienność ciśnienia. Zwraca uwagę statystycznie znamienne zmniejszenie się zmienności ciśnienia w "II" dniu podawania L-argininy.

Zmiany ciśnienia tętniczego obserwowane w trakcie podawania soli fizjologicznej i L-argininy w zależności od wyjściowych wartości ciśnień

Na podstawie rejestrowanych wartości ciśnień w trakcie prowadzonych wlewów, stwierdzono istnienie zależności pomiędzy wielkością początkowego

ciśnienia tętniczego a jego zmianami w trakcie wlewu. W każdym dniu infuzji, zarówno soli fizjologicznej jak i L-argininy przeanalizowano zmiany skurczowego ciśnienia tętniczego w grupie pacjentów z wyjściowym ciśnieniem skurczowym wyższym lub równym 140 mmHg (grupa 1, n = 14) oraz w grupie pacjentów z wyjściowym SCT niższym od 140 mmHg (grupa 2, n = 16) (ryc.4). Stwierdzono, że wartość wyjściowego ciśnienia skurczowego w sposób znamieny statystycznie ($p < 0.01$) wpływa na dalszy przebieg krzywej średnich wartości SCT w czasie wlewu (analiza wariancji GLM). W "0" dniu badania wartości średnich ciśnień zarejestrowanych w czasie wlewu soli fizjologicznej w obu grupach pacjentów nie zmieniały się istotnie. Natomiast we wszystkich dniach podawania L-argininy obserwowano znamienne ($p < 0.01$) obniżanie się SCT zarówno w grupie z wyjściowym SCT ≥ 140 mmHg jak i < 140 mmHg. Silniejszy efekt hipotensyjny zauważono jednak w grupie 1 z wyższym ciśnieniem skurczowym ($F=103.9$), niż w grupie 2, z niższym ciśnieniem skurczowym ($F=57.51$). W grupie 1 maksymalny procentowy spadek SCT w stosunku do ciśnienia przed wlewem, rejestrowany w kolejnych dniach stosowania L-argininy wynosił 20.6% w dniu "I", 17% w dniu "II", 14.4% w dniu "III" i 11.8% w "IV" dniu. W grupie 2 spadek SCT chociaż też znamieny, był mniejszy i wynosił odpowiednio: w "I" dniu - 14.5%, w "II" dniu - 9.7%, w "III" dniu - 10.3% i w "IV" dniu - 8.4%.

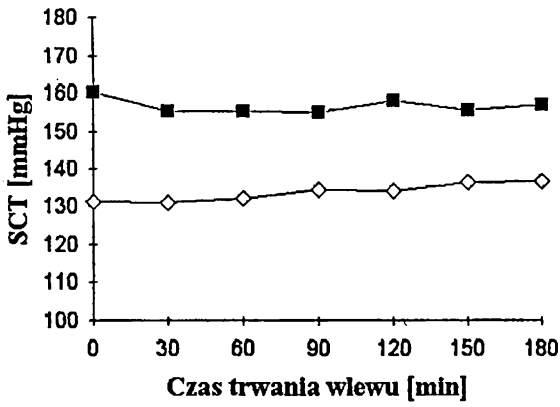
Podobną analizę przeprowadzono w odniesieniu do ciśnienia rozkurczowego w grupach pacjentów z wyjściowym ciśnieniem rozkurczowym większym lub równym 90 mmHg (grupa 1, n=15) i mniejszym od 90 mmHg (grupa 2, n=15) (ryc.5). Wykazano, że wartości średniego ciśnienia rozkurczowego rejestrowane w czasie wlewu zależą w istotny sposób ($p < 0.01$) od wielkości wyjściowego ciśnienia rozkurczowego, rejestrowanego przed infuzjami (analiza wariancji GLM). Podanie soli fizjologicznej w dniu "0" nie powodowało żadnych istotnych zmian w wartościach RCT rejestrowanych w czasie wlewu i to zarówno w grupie 1 jak i 2. We wszystkich dniach podawania L-argininy silniejszy efekt hipotensyjny uwidoczniono w grupie 1 z wyższym ($F=59.15$) niż w grupie 2 z niższym ciśnieniem rozkurczowym ($F=54.06$). Maksymalny procentowy spadek rozkurczowego ciśnienia tętniczego w grupie 1 wynosił w kolejnych dniach podawania L-argininy: w "I" dniu - 19.8%, w "II" dniu - 16%, w "III" dniu - 12.1% i w "IV" dniu - 13.5%. W grupie 2 z wyjściowym RCT mniejszym od 90 mmHg wynosił odpowiednio: w "I" dniu - 14.3%, w "II" dniu - 13.0%, w "III" dniu - 9.6% oraz w "IV" dniu - 8.7%.

Zmiany ciśnienia tętniczego obserwowane w trakcie podawania L-argininy u pacjentów z prawidłowym i wysokim stężeniem LDL-cholesterolu w surowicy krwi

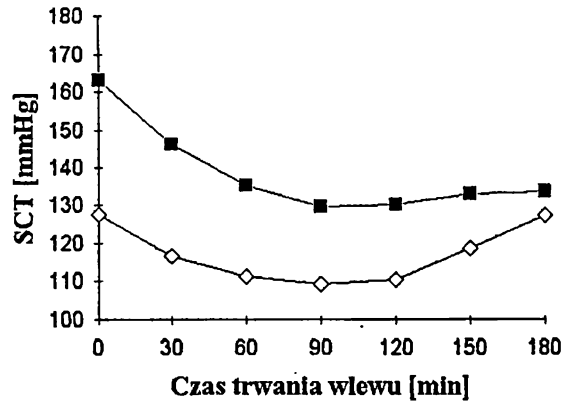
Na podstawie przeprowadzonych przed wlewami oznaczeń stężenia lipidów w surowicy krwi, stwierdzono u 15 pacjentów hipercholesterolemię (cholesterol całkowity $>5.2\text{mmol/l}$), a u 12 podwyższony poziom LDL-cholesterolu (LDL-chol. $>3.5\text{mmol/l}$). W grupach tych średnie stężenie cholesterolu całkowitego we krwi wynosiło - $\bar{x}=7.27\text{mmol/l}$, $SD=1.01$, natomiast średnie stężenie LDL-cholesterolu wynosiło - $\bar{x}=4.76\text{mmol/l}$, $SD=0.70$. W grupie osób z prawidłowym poziomem cholesterolu ($n=15$), jego średnie stężenie wynosiło - $\bar{x}=4.49\text{mmol/l}$, $SD=0.54$. W grupie pacjentów z prawidłowym poziomem LDL-cholesterolu w surowicy ($n=18$) jego średnie stężenie wynosiło - $\bar{x}=2.69\text{mmol/l}$, $SD=0.59$.

Przeprowadzona analiza wariancji (GLM), która uwzględniała wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia w poszczególnych dniach, zmienność międzyosobniczą oraz stężenie cholesterolu całkowitego i LDL-cholesterolu w surowicy krwi, wykazała, że wartość LDL-cholesterolu istotnie wpływała na wielkość skurczowego ciśnienia tętniczego w trakcie wlewów L-argininy ($p<0.05$). Stężenie LDL-cholesterolu nie wpływało natomiast na wartości rozkurczowego ciśnienia tętniczego. Nie wykazano również żadnych istotnych korelacji pomiędzy poziomem całkowitego cholesterolu we krwi a rozkurczowym i skurczowym ciśnieniem tętniczym rejestrowanym w trakcie wlewów soli fizjologicznej i L-argininy. Na ryc.6 przedstawiono zmiany skurczowego ciśnienia tętniczego w grupach pacjentów z LDL-cholesterolem w surowicy wyższym od 3.5mmol/l (grupa 1) oraz z LDL-cholesterolem niższym od 3.5mmol/l (grupa 2). U pacjentów grupy 1 stwierdzono wyższe średnie ciśnienie skurczowe, rejestrowane przed wlewem we wszystkich dniach badania w porównaniu do pacjentów grupy 2. Podanie soli fizjologicznej (dzień "0") nie wpłynęło istotnie na wartości SCT rejestrowane w trakcie wlewu w obu grupach. W czasie podawania L-argininy obniżenie skurczowego ciśnienia tętniczego było znamienne w obu badanych grupach ($p<0.01$). Skurczowe ciśnienie tętnicze w większym stopniu obniżało się w grupie pacjentów z LDL-cholesterolem niższym od 3.5mmol/l ($F=137.21$) niż w grupie pacjentów z cholesterolem wyższym od 3.5mmol/l ($F=96.94$). Kształt krzywej, obrazującej zmiany skurczowego ciśnienia tętniczego pod wpływem podawanej L-argininy był podobny w obu grupach. W trakcie infuzji L-argininy najniższe wartości SCT rejestrowano pomiędzy 60. a 120. minutą wlewu w obu grupach i we wszystkich dniach.

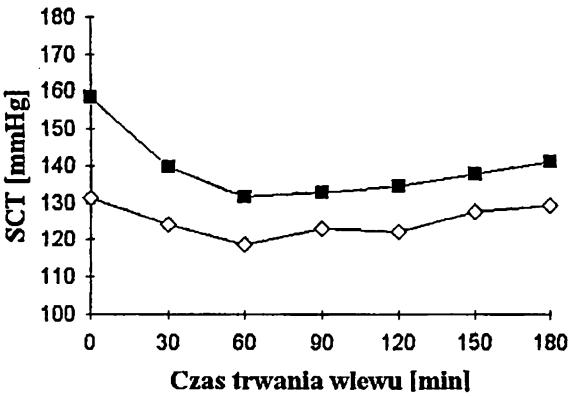
"0" dzień
sól fizjologiczna



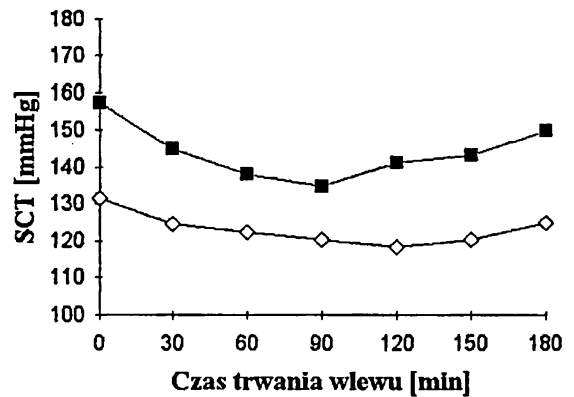
"I" dzień
L - Arginina



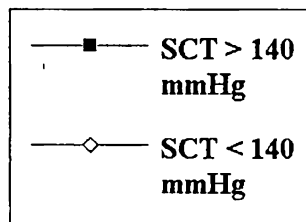
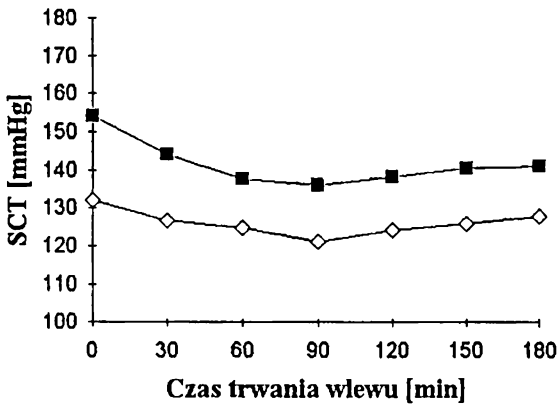
"II" dzień
L - Arginina



"III" dzień
L - Arginina

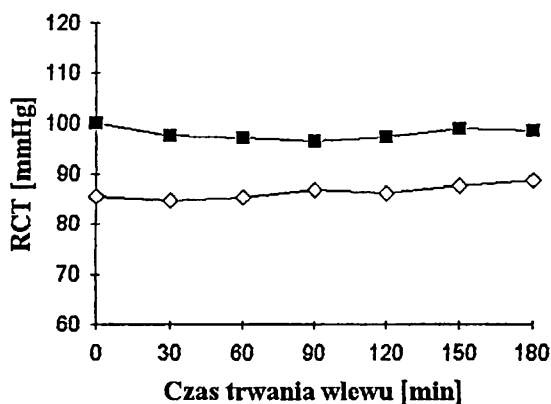


"IV" dzień
L - Arginina

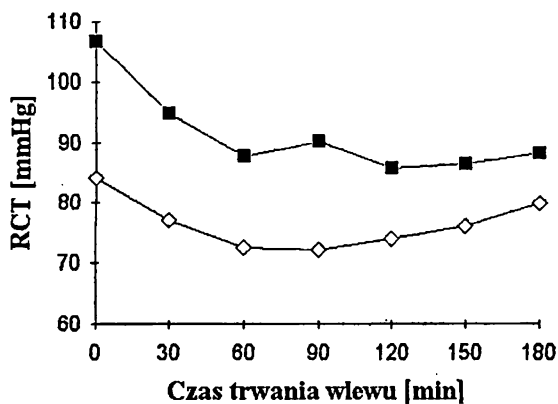


Ryc. 4 Zmiany skurczowego ciśnienia tętniczego (SCT) w grupach pacjentów z wyjściowych średnim skurczowym ciśnieniem tętniczym ≥ 140 mmHg (grupa 1, n = 14) i < 140 mmHg (grupa 2, n = 16), obserwowane w trakcie wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dnie "I", "II", "III" i "IV")

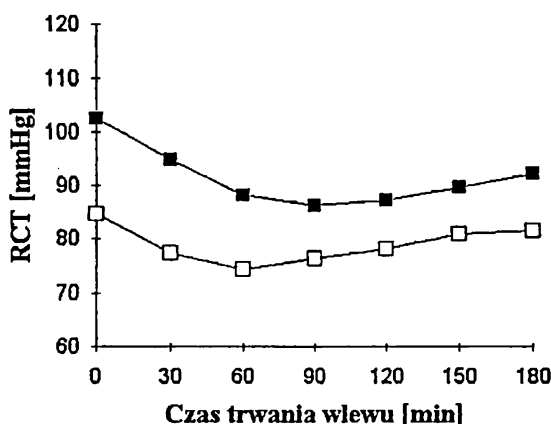
"0" dzień
sól fizjologiczna



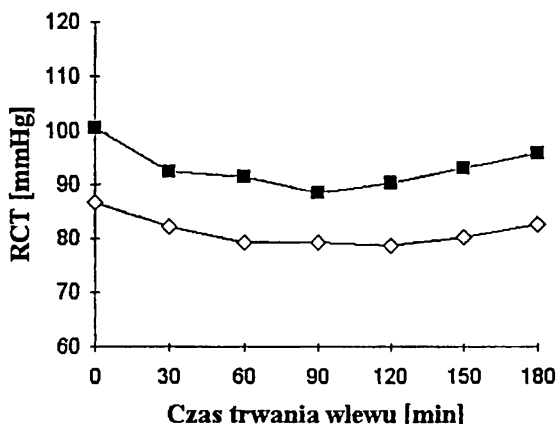
"I" dzień
L - Arginina



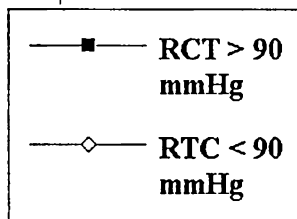
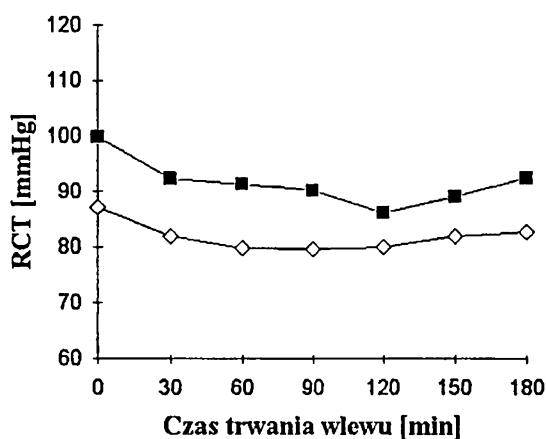
"II" dzień
L - Arginina



"III" dzień
L - Arginina

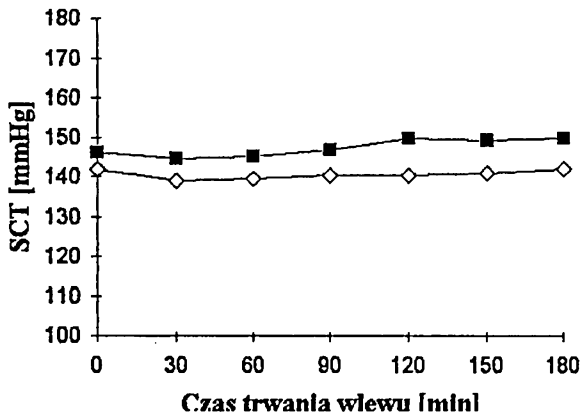


"IV" dzień
L - Arginina

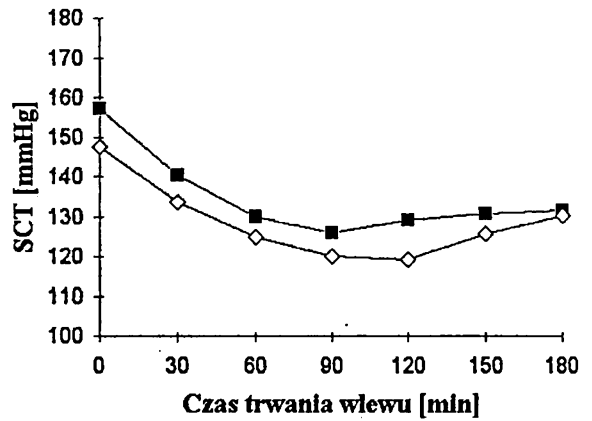


Ryc. 5 Zmiany rozkurczowego ciśnienia tętniczego (RCT) w grupach pacjentów z wyjściowym średnim rozkurczowym ciśnieniem tętniczym ≥ 90 mmHg (grupa 1, n=15) i < 90 mmHg (grupa 2, n=15), obserwowane w trakcie wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dnie "I", "II", "III" i "IV")

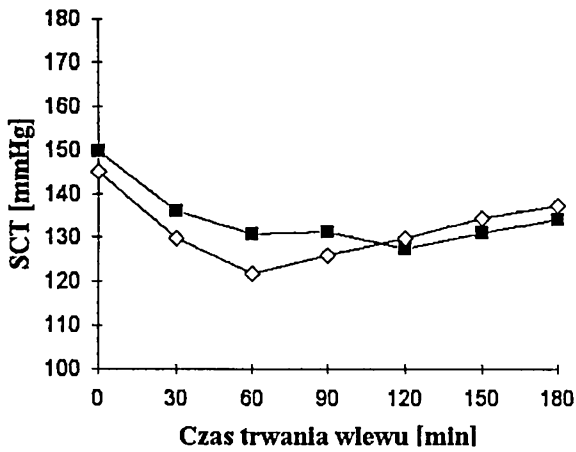
"0" dzień
sól fizjologiczna



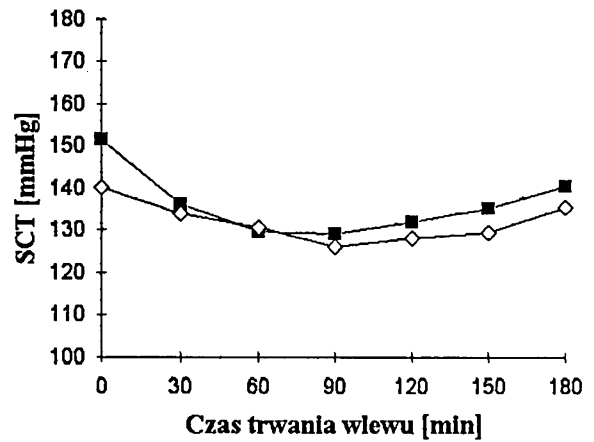
"I" dzień
L - Arginina



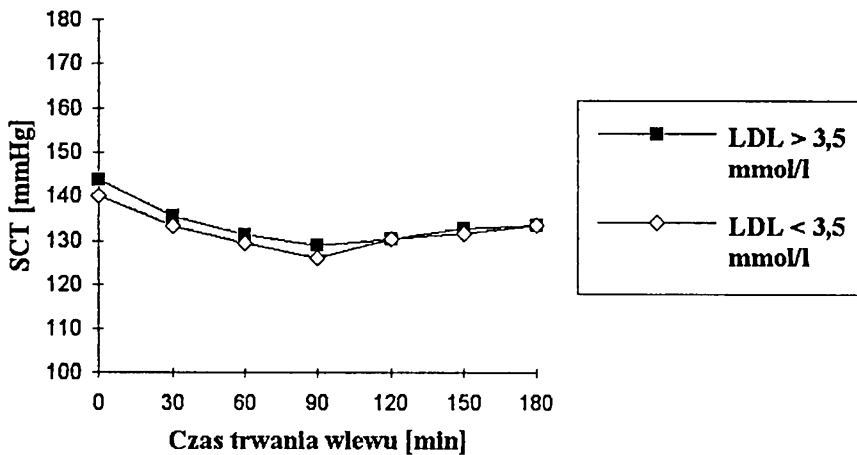
"II" dzień
L - Arginina



"III" dzień
L - Arginina



"IV" dzień
L - Arginina



Ryc. 6 Zmiany skurczowego ciśnienia tętniczego (SCT) w grupie pacjentów ze stężeniem LDL - cholesterolu w surowicy > 3.5 mmol/l (grupa 1, n = 12, \bar{x} = 4.76 mmol/l, SD = 0,70) oraz w grupie pacjentów ze stężeniem LDL cholesterolu \leq 3.5 mmol/l (grupa 2, n = 18, \bar{x} = 2.69 mmol/l, SD = 0,59). Obserwacje w trakcie wlewów soli fizjologicznej (dzień "0") i L-argininy (dnie "I", "II", "III" i "IV")

4.2. Wyniki badań biochemicznych

Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na aktywność płytek krwi

Aktywność płytek krwi oceniana jako progowe stężenie proagregacyjne ADP, w "0" dniu badania, przed wlewem soli fizjologicznej wynosiła 1.87 $\mu\text{mol/l}$ ($\text{SD}=1.56$) i nie różniła się istotnie od aktywności mierzonej po wlewie ($\bar{x}=1.86$ $\mu\text{mol/l}$, $\text{SD}=1.46$) (ryc.7). Wlew z L-argininy powodował nieznaczny wzrost progowego stężenia proagregacyjnego ADP, potrzebnego do wywołania dwustopniowej agregacji płytek i wzrost ten nie nosił cech znamienności statystycznej.

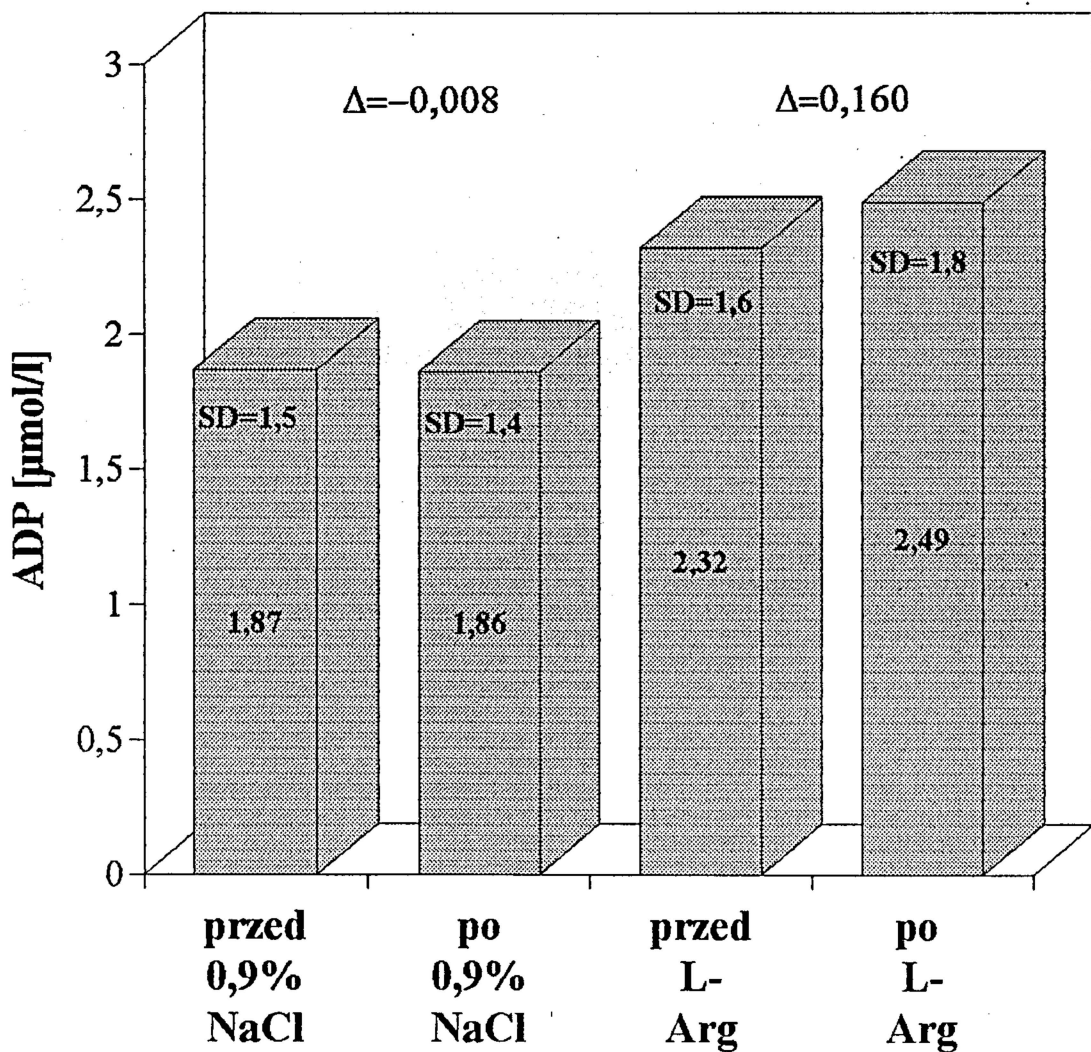
Średnie progowe stężenie ADP przed wlewem L-argininy wynosiło 2.32 $\mu\text{mol/l}$ ($\text{SD}=1.65$), a po wlewie 2.49 $\mu\text{mol/l}$ ($\text{SD}=1.83$).

Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na aktywność fibrynolityczną osocza

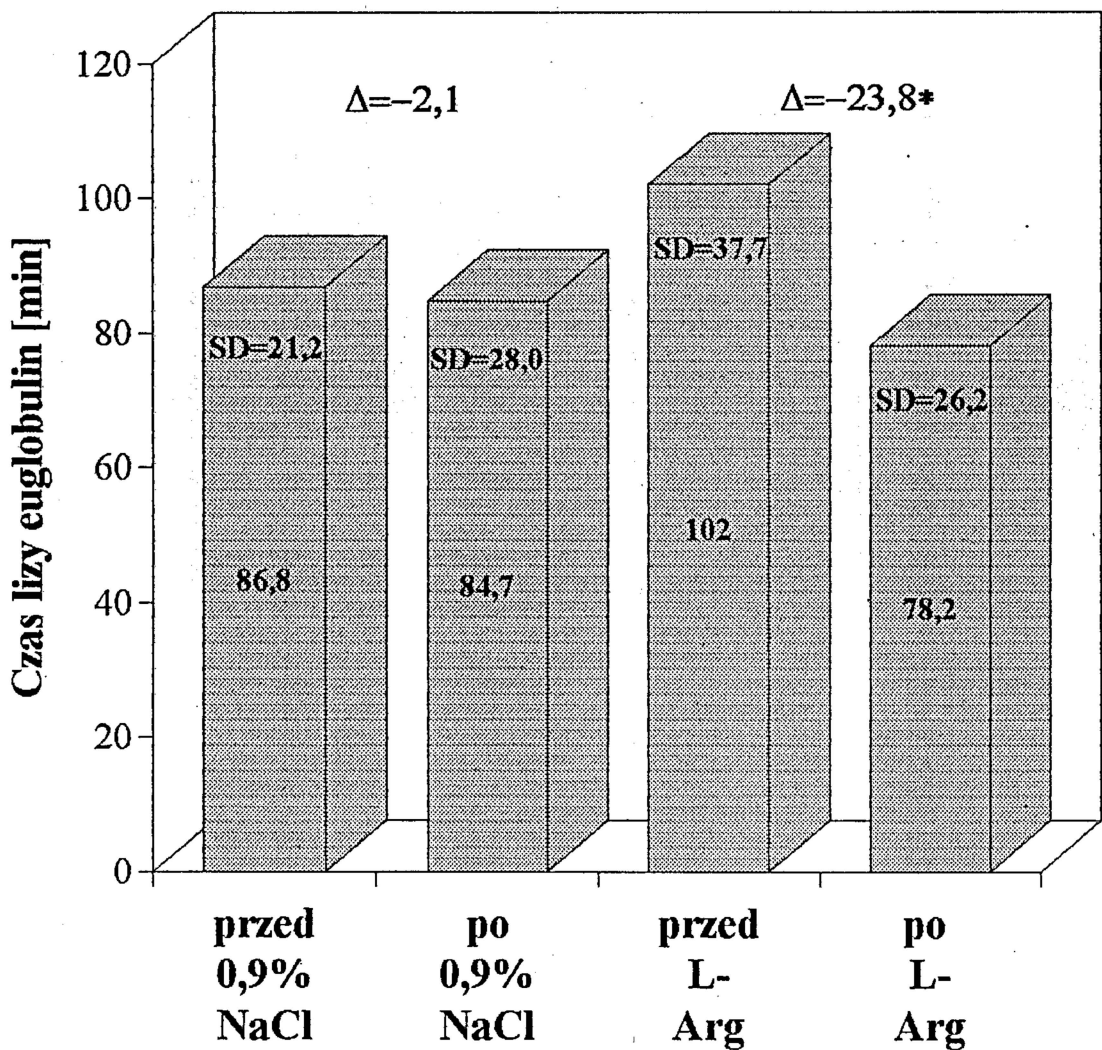
Aktywność fibrynolityczna osocza wyrażona jako czas lizy euglobulin i oceniana przed i po wlewie soli fizjologicznej w "0" dniu badania nie różniła się istotnie. Średni czas lizy euglobulin przed wlewem 0.9% NaCl wynosił 86.8 minut ($\text{SD}=21.9$), a po wlewie 84.7 minut ($\text{SD}=28.07$). Podanie L-argininy powodowało znamienne ($p < 0.05$) skrócenie czasu lizy euglobulin z 102.0 minut ($\text{SD}=37.74$) do 78.2 minut ($\text{SD}=26.21$) (ryc.8).

Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na aktywność reninową osocza

Zarówno wlew soli fizjologicznej jak i L-argininy powodował niewielkie i nieznamienne statystycznie obniżenie stężenia reniny w surowicy krwi (ryc.10). Średnie stężenie reniny w surowicy krwi przed wlewem soli fizjologicznej wynosiło 8.41 ng/ml ($\text{SD}=5.46$), a po wlewie 5.56 ng/ml ($\text{SD}=6.87$). Przed wlewem L-argininy stężenie reniny wynosiło 8.32 ng/ml ($\text{SD}=8.48$), a po wlewie 5.95 ng/ml ($\text{SD}=7.22$).

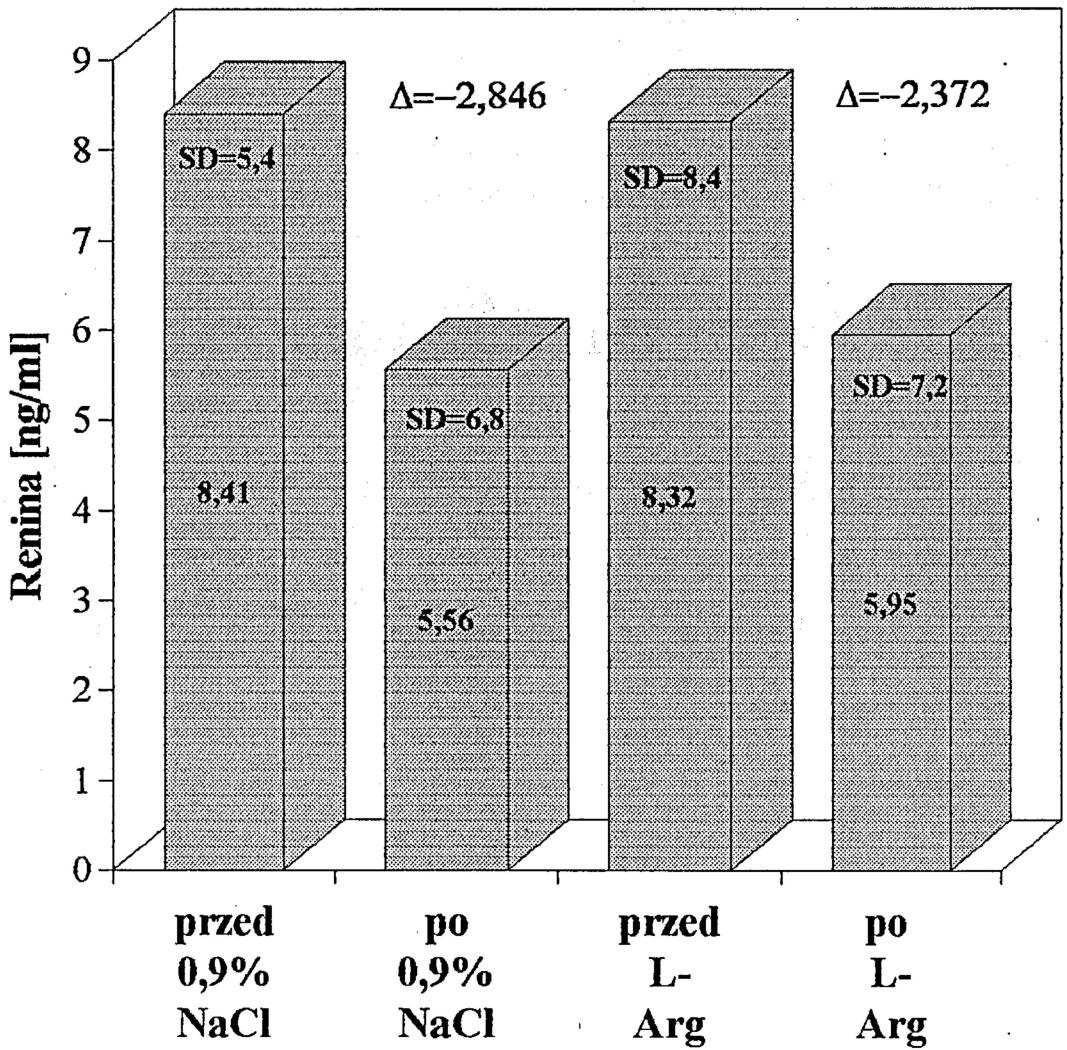


Ryc. 7 Wpływ dożylnych wlewów soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i L-argininy (L-arg) na proguwe stężenie proagregacyjne ADP.



* $p < 0,05$

Ryc. 8 Wpływ dożylnych wlewów soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i L-argininy (L-arg) na aktywność fibrynolityczną osocza - wyrażoną jako czas lizy euglobulin.



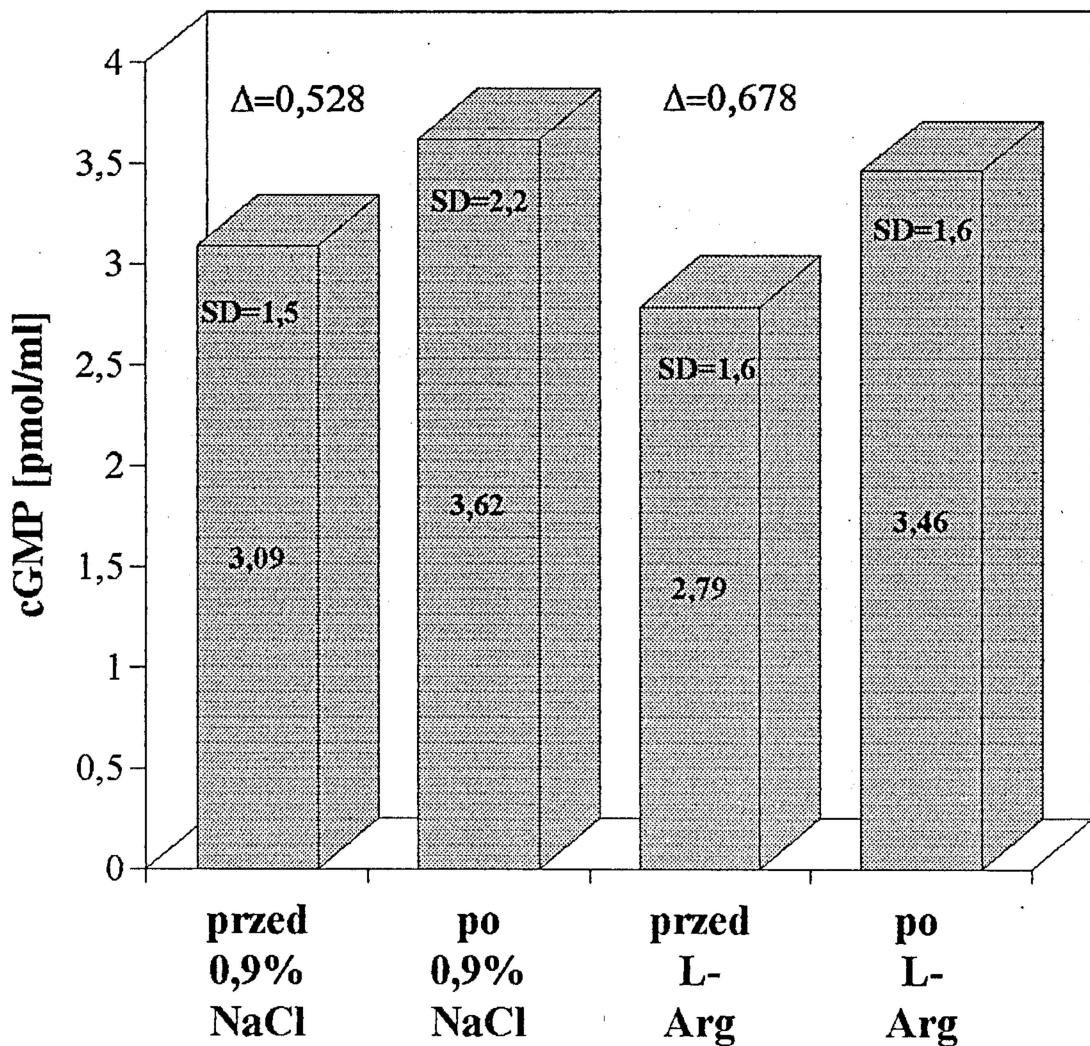
Ryc. 9 Wpływ dożylnych wlewnych soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i L-argininy (L-arg) na stężenie reniny w surowicy.

Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na stężenie cGMP w surowicy

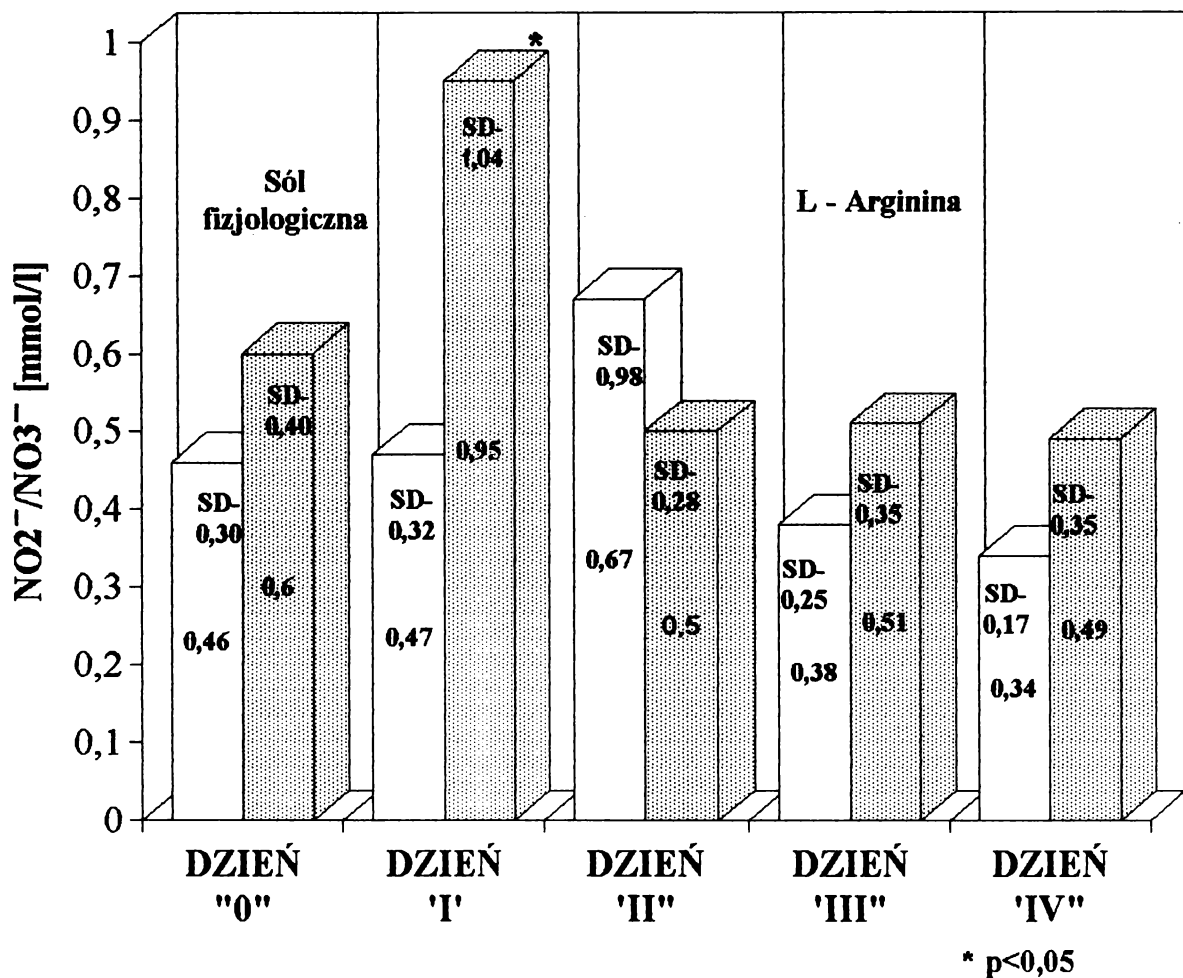
Nie uwidoczono istotnego statystycznie wpływu dożylnych wlewów L-argininy na stężenie cGMP w surowicy krwi (ryc.10). Średnie stężenie cGMP w surowicy krwi badane przed wlewem soli fizjologicznej wynosiło 3.09 pmol/ml (SD=1.53), a po wlewie 3.62 pmol/ml (SD=2.21), ($\Delta=0.528$). Wlew L-argininy powodował niewielki wzrost cGMP w surowicy z 2.79 pmol/ml (SD=1.66) do 3.46 pmol/ml (SD=1.68) ($\Delta=0.678$).

Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na stężenie wydalanych z moczem azotynów/azotanów

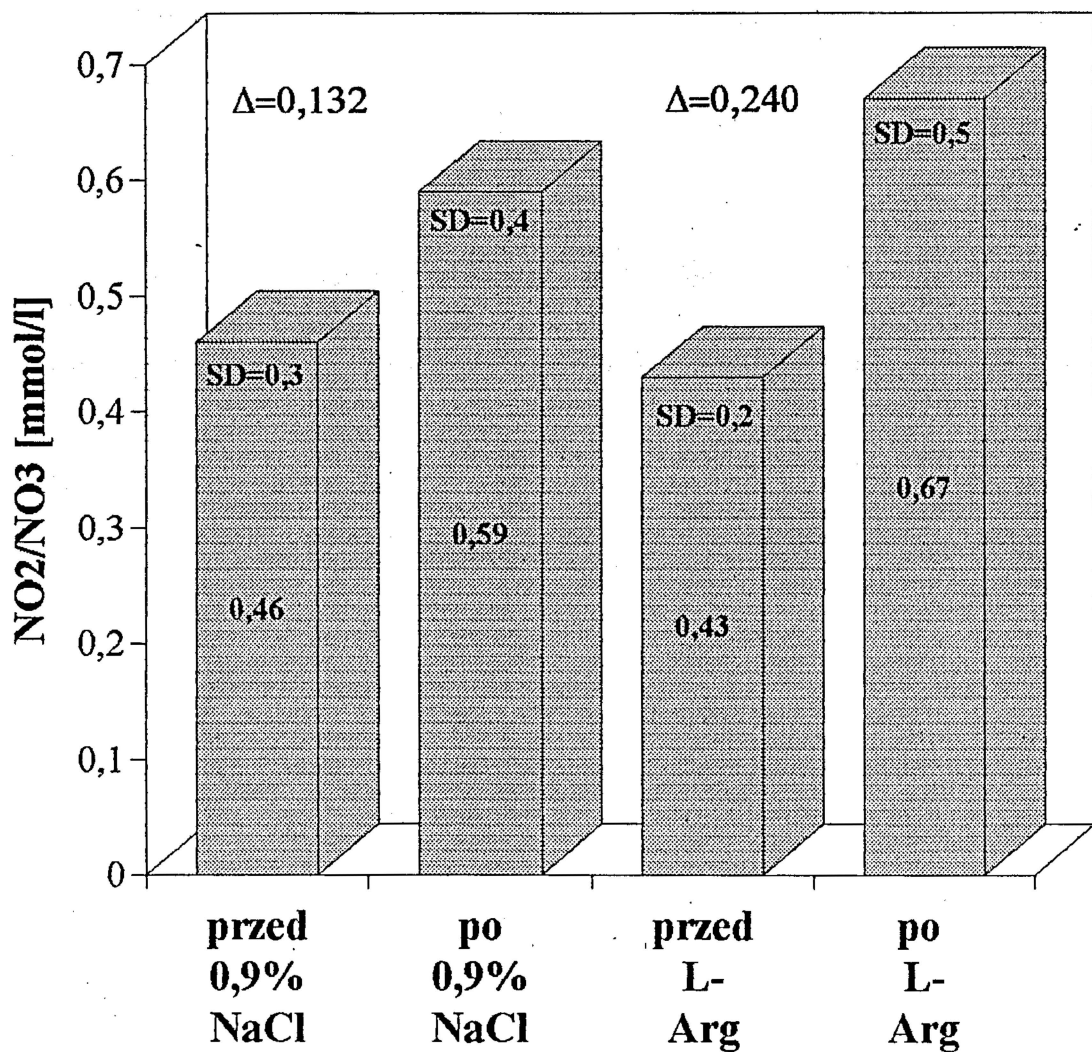
Średnie stężenie azotynów/azotanów w moczu uzyskanym przed wlewem soli fizjologicznej wynosiło 0.46mmol/l (SD=0.30) (ryc 11). W moczu uzyskanym po wlewie odnotowano niewielki wzrost średniego stężenia azotynów/azotanów do 0.59mmol/l (SD=0.40), ($\Delta=0.132$). Pod wpływem podawanej L-argininy w "I" dniu badania zaobserwowano duży, istotny wzrost wydalanych w moczu azotynów/azotanów (ryc.11). Średnie ich stężenie przed wlewem wynosiło 0.47mmol/l (SD=0.32), a po wlewie 0.95mmol/l (SD=1.04). Zmiany stężenia wydalanych z moczem azotynów/azotanów w pozostałych dniach były nieistotne, jakkolwiek z wyjątkiem dnia "III", obserwowano zwiększone ich stężenie w moczu uzyskanym po wlewie L-argininy. Łączna analiza średnich wartości stężenia azotynów/azotanów w moczu pobranym przed wlewami L-argininy i w moczu uzyskanym po infuzjach wykazała zwiększone ich stężenie po L-argininie ($\bar{x}=0.43$ mmol/l przed wlewem, $\bar{x}=0.67$ mmol/l po wlewie, $\Delta=0.240$) (ryc.12). Wzrost ten (w odniesieniu do dnia wlewu soli fizjologicznej) nie miał jednak cech istotności statystycznej.



Ryc. 10 Wpływ dożylnych wlewnych soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i L-argininy (L-arg) na stężenie cGMP w surowicy.



Ryc. 11 Wpływ dożylnych wlewów soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i L-argininy na stężenie azotynów/azotanów ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) w moczu.



Ryc. 12 Wpływ dożylnych wlewów soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i L-argininy (L-arg) na stężenie wydalanych z moczem azotynów/azotanów ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$). Analiza łączna.

Wpływ podawania soli fizjologicznej i L-argininy na stężenia wybranych parametrów biochemicznych we krwi

W tabeli nr 3 przedstawiono średnie stężenia wybranych parametrów biochemicznych badanych przed podaniem wlewów L-argininy i po ich zakończeniu. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w stężeniu wydalanych z moczem: kwasu wanilino-migdałowego, 17-ketosterydów, 17-ketogennych sterydów, potasu i sodu. Nie zmieniło się też istotnie średnie stężenie kreatyniny w surowicy krwi, badane przed i po stosowaniu L-argininy.

TABELA 3. Średnie stężenie wybranych parametrów biochemicznych oznaczonych przed i po wlewach L-argininy.

	Przed wlewami	Po wlewach L-argininy
Kwas wanilino-migdałowy [$\mu\text{mol}/24\text{h}$] - (mocz)	$\bar{x} = 18.91$ SD = 6.82	$\bar{x} = 17.26$ SD = 7.06
17-ketosterydy [$\mu\text{mol}/24\text{h}$] - (mocz)	$\bar{x} = 25.33$ SD = 8.60	$\bar{x} = 28.46$ SD = 9.21
17-ketogenne sterydy [$\mu\text{mol}/24\text{h}$] - (mocz)	$\bar{x} = 35.07$ SD = 11.67	$\bar{x} = 38.22$ SD = 10.08
Kreatynina [$\mu\text{mol}/\text{l}$] - (krew)	$\bar{x} = 108.06$ SD = 10.06	$\bar{x} = 110.20$ SD = 12.52
Dobowe wydalanie sodu w moczu [$\mu\text{mol}/24\text{h}$]	$\bar{x} = 180.62$ SD = 20.60	$\bar{x} = 186.22$ SD = 24.52
Dobowe wydalanie potasu w moczu [$\mu\text{mol}/24\text{h}$]	$\bar{x} = 60.60$ SD = 10.21	$\bar{x} = 64.50$ SD = 11.06

5. DYSKUSJA

Nasze obserwacje wykazały, że podawanie L-argininy w postaci dożylnych wlewów, znamienne obniżało skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze u pacjentów z pierwotnym, opornym na leczenie nadciśnieniem tętniczym.

Śródbłonek naczyniowy uczestniczy w regulacji funkcji naczyń krwionośnych poprzez produkcję i uwalnianie szeregu naczynioaktywnych związków, w tym EDRF/NO [50,185,194,196,231,278,316,333]. W odpowiedzi na krążące we krwi hormony i autakoidy oraz wynikię z przepływu krwi "siły ścinania", uwalniany jest ze śródbłonka tlenek azotu, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu ściany naczyniowej w stanie stałego, aktywnego rozkurczu. Udział EDRF/NO w utrzymaniu podstawowego ciśnienia tętniczego jest dobrze udokumentowany i został omówiony uprzednio (rozdział 1.10) [16,48,113,116, 117,166,181,185,192,193,269,294,315,313]. Wiele badań przemawia za hipotezą, że nieprawidłowości w metabolizmie L-arginina/NO mogą w dużym stopniu przyczyniać się do rozwoju różnych form nadciśnienia tętniczego [2,43,44,185, 269]. Udowodniono to szczególnie dobrze w badaniach doświadczalnych prowadzonych na zwierzętach [2,12,13,43,44,265,270]. Dostarczyły one jednoznacznych dowodów na udział zaburzonej morfologii i funkcji komórek śródbłonka w powstawaniu nadciśnienia tętniczego. [2,16, 94,169,181].

Ponieważ metody oceny czynności śródbłonka i układu L/arginina-NO są w dużym stopniu inwazyjne, wciąż mała jest ilość klinicznych danych wynikających z obserwacji prowadzonych u ludzi. Udział śródbłonka i tlenu azotu w funkcji naczyń krwionośnych u ludzi badano głównie w obrębie krążenia przedramienia u zdrowych ochotników [38,313] i pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [36,171,223, 225], oraz w obrębie krążenia wieńcowego [5,28]. Udowodniły one kluczową rolę EDRF/NO w regulacji napięcia ściany naczyniowej i przepływu, oraz wykazały, że rozkurcz naczyń tętniczego w odpowiedzi na acetylocholinę jest zmniejszony u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym [5,28,225]. Jakkolwiek co do tego poglądu nie istnieje jednomyślność, pojawiły się bowiem ostatnio doniesienia twierdzące, że zależny od śródbłonka rozkurcz naczyń przedramienia, indukowany przez agonistów receptorów muskarynowych jest zachowany u tych pacjentów [49]. Uważa się, że przyczyną rozbieżnych obserwacji może być niejednorodność w patofizjologii nadciśnienia tętniczego i różny stopień zaawansowania i ciężkości choroby badanych grup pacjentów [124,225].

Badania doświadczalne wskazują, że stopień zaburzenia czynności śródbłonna rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia tętniczego i zaawansowaniem choroby [70]. Nie wyjaśnione do końca pozostaje to, czy zaburzona funkcja śródbłonna jest przyczyną, czy raczej konsekwencją nadciśnienia, chociaż większość autorów skłania się do poglądu, że dysfunkcja śródbłonna jest obecna już w bardzo wczesnych stadiach choroby nadciśnieniowej [42,69,124].

Osobną grupę badań dotyczących regulacji napięcia naczyń przez NO u ludzi stanowią próby systemowego, dożylnego podawania inhibitorów NOS. Haynes stosował dożylnie podanie L-NMMA w dawce 3mg/kg/20 minut ośmiu zdrowym ochotnikom i obserwował u nich znaczny wzrost średniego ciśnienia tętniczego, spadek częstości tętna, wzrost całkowitego oporu obwodowego i wzrost wydalania sodu z moczem [116,117]. Podobnie Hansen [113] i Stamler [294] podawali dożylnie L-NMMA zdrowym ochotnikom i obserwowali wzrost ciśnienia tętniczego o około 10-15%. W sprzeczności z tymi spostrzeżeniami pozostają wyniki prezentowane przez Krekels, która nie obserwowała żadnych istotnych zmian w wartościach ciśnienia tętniczego i częstości tętna zarówno po wolnym wlewie, jak i szybkim dożylnym podaniu L-NMMA czterem zdrowym ochotnikom [148].

Badania nad podawaniem L-argininy jako substratu dla syntezy tlenu azotu u ludzi są nieliczne, a ich wyniki niejednoznaczne. Systemowe, dożylnie podanie L-argininy przeprowadzono początkowo u zdrowych ochotników. Badacze japońscy [125,136,204] podawali 30g L-argininy w objętości 300 ml soli fizjologicznej przez 30 minut dziesięciu zdrowym ochotnikom, z prawidłowym ciśnieniem tętniczym. W efekcie przeprowadzonej infuzji zaobserwowali znamienne obniżenie się średniego ciśnienia tętniczego z wartości 79.3 ± 3.9 mmHg przed wlewie, do 68.8 ± 2.2 mmHg po zakończeniu infuzji. Równoległe do spadku ciśnienia tętniczego, obserwowano przyspieszenie tętna (62.3 ± 2.3 uderzeń/min. przed wlewie; 67.5 ± 1.9 uderzeń/min. po wlewie), wzrost objętości wyrzutowej serca do $127.2 \pm 3.9\%$ w stosunku do wartości wyjściowej. Całkowity opór obwodowy obniżył się w wyniku zastosowanego wlewu i stanowił $65.9 \pm 2.0\%$ wartości oporu stwierdzonego przed wlewie [125]. Według podobnego protokołu Böger [21] podawał L-argininę (30g/300ml/30min) lub placebo (300ml. soli fizjologicznej) dziesięciu zdrowym mężczyznom. W czasie infuzji L-argininy obserwował znamienne obniżenie się rozkurczowego ciśnienia tętniczego (-6.7 mmHg; $p < 0.001$) i skurczowego ciśnienia tętniczego (-4.3 mmHg; $p < 0.05$) z równoczesnym wzrostem częstości tętna ($+ 6.4$ uderzeń/min.; $p < 0.005$). Po zakończonym wlewie wartości ciśnienia tętniczego i tętna wróciły do wartości wyjściowych w czasie 5 minut [21]. Badany

w obrębie tętnicy udowej przepływ krwi wzrósł po podaniu L-argininy o 43.5% ($p < 0.02$). Podanie soli fizjologicznej nie powodowało żadnych istotnych zmian w wartościach ciśnienia tętniczego, tętna i wielkości przepływu [21]. Odmienne wyniki otrzymał Baudouin, który zastosował L-argininę dożylnie w dawce 500mg/kg. przez 30 minut pięciu zdrowym mężczyznom i nie obserwował żadnych różnic w wartościach skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, ani w częstości tętna w czasie prowadzonego wlewu [13].

W następnym etapie podjęto próby podawania L-argininy pacjentom z pierwotnym i wtórnym nadciśnieniem tętniczym, a także z nadciśnieniem płucnym. Hishikawa i Nakaki wykonywali jednorazowe, 30-minutowe wlewy L-argininy w dawce 500mg/kg [126,203,204] u 10 pacjentów z nadciśnieniem pierwotnym oraz u 6 z nadciśnieniem wtórnym (3 z nadciśnieniem naczyniowonerkowym i 3 z pierwotnym hiperaldosteronizmem). Również inne nieliczne próby podawania L-argininy w postaci donaczyniowej infuzji były oparte na podobnym schemacie (500 mg/kg/30 min.) [13,21,124,125,126]. Higashi stosował je u 13 pacjentów z łagodnym, pierwotnym nadciśnieniem [124], a Baudouin podawał L-argininę 5 pacjentom bezpośrednio do tętnicy płucnej [13]. Hishikawa w trakcie wlewu obserwował znamienne obniżanie się skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego z równoczesnym wzrostem częstości tętna już w 5 minucie wlewu. Najsilniejszy efekt hipotensyjny odnotował w ostatniej - 30 minucie wlewu i to zarówno przy stosowaniu L-argininy u ludzi zdrowych jak i z nadciśnieniem tętniczym [125,126]. Również Higashi obserwował najsilniejszy, znamienny efekt hipotensyjny w ostatniej - 30 minucie wlewu [124]. W niniejszej pracy wlewy L-argininy stosowane były u większej liczby pacjentów (30 mężczyzn z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym) i według innego protokołu. Czas wlewu był wydłużony do 180 minut, a dawka preparatu o połowę mniejsza (około 250 mg/kg). Niemniej jednak efekty hemodynamiczne podawania L-argininy były zbliżone do tych, jakie zostały opublikowane przez badaczy japońskich. W niniejszej pracy największe obniżenie się ciśnienia, zarówno skurczowego jak i rozkurczowego obserwowano w około 90-120 minucie wlewu, co może wynikać z wydłużenia czasu infuzji do 180 minut. Podawanie L-argininy w postaci powtarzanych, przedłużonych wlewów pozwoliło ponadto na zaobserwowanie tworzenia się tolerancji na stosowany związek. W ostatnich minutach infuzji ciśnienie podwyższało się nieznacznie i efekt hipotensyjny był najsilniejszy w "I" dniu, gdy w kolejnych stopniowo się zmniejszał. Wykazano też, że efekt hipotensyjny L-argininy jest silniejszy u pacjentów z wyjściowo wyższymi wartościami zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia. Wprawdzie Boudouin nie zarejestrował żadnych istotnych zmian

hemodynamicznych przy stosowaniu dożylnym L-argininy nie tylko u zdrowych ochotników, ale także przy infuzji do tętnicy płucnej osobom z nadciśnieniem płucnym [13], lecz badania te przeprowadzono na bardzo małych liczebnie grupach osób i dotyczyły innego (płucne) łóżyska naczyniowego. Krążenie płucne może podlegać innym mechanizmom regulacyjnym niż systemowe lub wieńcowe. Sugerowana jest również możliwość różnic rasowych we wrażliwości na L-argininę (rasa japońska versus rasa kaukaska) [13].

Zastosowanie w niniejszej pracy całodobowego, automatycznego monitorowania ciśnienia tętniczego [106], dostarczyło dodatkowych danych dla oceny wpływu wlewów L-argininy na wartości ciśnienia tętniczego i tętna oraz na zmienność ciśnienia. Zmienność ciśnienia tętniczego stanowi bardzo czuły parametr oceny układu autonomicznego [135,138,176,177]. Wzrasta ilość publikacji, w których podkreśla się znaczenie oceny zmienności ciśnienia, szczególnie w takich chorobach jak cukrzyca lub nadciśnienie tętnicze [138,176]. Pacjenci, u których zastosowano wlewy L-argininy charakteryzowali się dużą zmiennością ciśnienia. Byli to chorzy z długoletnim, opornym na leczenie nadciśnieniem tętniczym. Istnieją sugestie, że duża zmienność ciśnienia, charakterystyczna dla pacjentów z nadciśnieniem może wynikać z obniżonej czułości baroreceptorów lub zaburzonego układu autonomicznego na niekorzyść jego części parasympatycznej [138,176,177,226]. W naszych obserwacjach zwraca uwagę mniejsza zmienność ciśnienia u pacjentów po wlewach L-argininy. Chociaż nadal wysoka, zmienność ciśnienia była jednak wyraźnie mniejsza niż w dniu wlewu soli fizjologicznej.

Dość dobrze zbadany i udokumentowany jest związek nadciśnienia tętniczego z zaburzeniami lipidowymi [285,323]. Zaburzenia metaboliczne, takie jak dyslipoproteinemia, nietolerancja glukozy lub hiperinsulinemia są często stwierdzane jeszcze w początkowych stadiach pierwotnego nadciśnienia tętniczego [323,324]. Duża ilość badań doświadczalnych na zwierzętach, a także badań klinicznych wykazała, że hipercholesterolemii towarzyszy zaburzona funkcja śródbłonna i zmniejszona aktywność tlenku azotu [6,40,317,320]. Połowa pacjentów poddanych wlewom L-argininy wykazywała wysoki poziom cholesterolu całkowitego lub LDL-cholesterolu. Ta grupa chorych miała również wyjściowo wyższe średnie ciśnienie skurczowe w porównaniu do pacjentów z prawidłowym lipidogramem. Zastosowanie wlewów L-argininy wywołało znamienne obniżenie skurczowego ciśnienia tętniczego w obu grupach, aczkolwiek efekt hipotensyjny w grupie pacjentów z wysokim stężeniem LDL-cholesterolu był słabszy. Można więc przypuszczać, że funkcja śródbłonna u tych pacjentów była uszkodzona w większym stopniu i to przez dwa czynniki -

hipercholesterolemię, jak i nadciśnienie tętnicze. Na podstawie danych z piśmiennictwa można wnioskować, że zastosowanie wlewów L-argininy w zaburzonej gospodarce lipoproteinowej może przywracać prawidłową funkcję śródbłonna, co udowodniono na modelu eksperymentalnym u zwierząt [52] i ludzi [73].

Bezpośrednie oznaczanie powstałego w śródbłonku EDRF/NO napotyka na wiele problemów z uwagi na jego bardzo krótki okres półtrwania. Marletta wykazał, że w płynach biologicznych NO bardzo szybko jest metabolizowany do azotanów i azotynów [179]. Zauważono, że w warunkach umiarkowanego przyjmowania azotynów z pokarmami, ich wydalanie z moczem przewyższa spożycie [20]. Uważa się, że ten nadmiar wydalanych związków azotowych ma swoje źródło w produkcji NO przez śródbłonek i neurony [20,219]. Badania przeprowadzone u ludzi z użyciem znakowanej L-[guanidyno-¹⁵N₂]argininy pokazały, że zwiększona *in vivo* produkcja azotynów w surowicy była powodowana wytwarzaniem tlenu azotu ze znakowanej L-argininy [41]. W niniejszej pracy przyjęto dość powszechnie stosowaną, nieinwazyjną metodę oceny generacji EDRF/NO polegającą na oznaczaniu azotanów/azotynów wydalanych z moczem pacjenta jak i oznaczaniu poziomu cGMP we krwi [21, 125,126,174,179,303,327].

Oznaczanie stężenia wydalanych z moczem azotanów/azotynów stosowało większość badaczy do oceny generacji NO w następstwie podawanej L-argininy [21,125,126,141]. W wyniku dożylnego podawania tego związku obserwowano znamienne wzrost wydalanych azotanów/azotynów [21,125,126,141]. Przeprowadzone w niniejszej pracy oznaczenie w moczu azotanów/azotynów wykazało znamienne zwiększone ich stężenie w próbkach moczu pobranych po wlewie L-argininy jedynie w "I" dniu jego stosowania, co może mieć związek z najbardziej w tym dniu wyrażonym efektem hipotensyjnym.

Wykładnikiem generacji NO u pacjentów poddanych terapii L-argininą był ponadto poziom cGMP w surowicy. Wydaje się, że brak wyraźnych różnic w stężeniu cGMP w próbkach krwi pobranych przed i po wlewie L-argininy, może wynikać z przyjętego w tym badaniu protokołu infuzji. L-arginina podawana była w stosunkowo niskiej dawce i w długim okresie czasu. Higashi zauważył, że podanie L-argininy u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym wywoływało znacznie mniejszy wzrost stężenia cGMP w surowicy krwi, niż u normotoników [124]. Natomiast Baudouin nie obserwował żadnych zmian w stężeniu cGMP po podaniu L-argininy zarówno u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym jak i z nadciśnieniem płucnym [13]. Ponadto Bode-Böger pomimo że rejestrowała wyraźny wzrost cGMP w surowicy szczurów po ich kilkumiesięcznym

skarmianiu L-argininą uważa, że cGMP nie może być uznawany za specyficzny wskaźnik syntezy NO *in vivo* [20].

Z danych z piśmiennictwa wynika, że tlenek azotu ma wpływ na produkcję lub uwalnianie wielu substancji hormonalnie czynnych, takich jak: renina, ANP, katecholaminy, wazopresyna, aldosteron czy insulina, które mogą oddziaływać na wielkość oporu obwodowego [70,262,315,321]. Hishikawa w wyniku infuzji L-argininy zdrowym ochotnikom nie obserwował żadnych istotnych zmian w stężeniu noradrenaliny, adrenaliny, dopaminy, wazopresyny i reniny [125]. Odnotował natomiast obniżenie stężenia aldosteronu i wzrost stężenia przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) ($p < 0.05$). Zdaniem autora, obserwowane zmiany były jednak niewielkie i nie mogły istotnie wpłynąć na wielkość oporu obwodowego [125]. Analogiczne obserwacje przeprowadzono po wlewie L-argininy pacjentom z nadciśnieniem tętniczym. Aktywność reninowa osocza, stężenie adrenaliny i noradrenaliny nie zmieniło się istotnie po przeprowadzonej infuzji. Zaobserwowano natomiast obniżenie stężenia aldosteronu, wzrost stężeń wazopresyny i przedsionkowego peptydu natriuretycznego ($p < 0.05$) [126]. Podobnie w niniejszych badaniach nie wykazaliśmy istotnego wpływu podawanej L-argininy na aktywność reninową osocza. Przeprowadzane u części chorych kontrole poziomu glikemii i insuliny w trakcie prowadzonych wlewów nie ujawniły istotnych zmian w stężeniu glukozy i insuliny w surowicy krwi.

Ze względu na stwierdzony udział tlenu azotu w procesach krzepnięcia i fibrynolizy [18,145,146,166,170,192,242], przedmiotem oceny w niniejszej pracy był również wpływ podawania L-argininy na aktywność płytek krwi i aktywność fibrynolityczną osocza. Wydaje się, że zaobserwowana tendencja do zmniejszonej aktywności płytek po wlewach L-argininy może wynikać z antyagregacyjnego działania tworzonego w śródbłonku tlenu azotu. Wykonane przez nas badania "*ex vivo*" nie oddają w pełni rzeczywistego stanu pacjenta, ze względu na krótki okres półtrwania NO. Niewiele przeprowadzono do tej pory badań "*in vivo*" u ludzi, które pozwoliłyby na dokładniejszą ocenę wpływu podawanej L-argininy na stopień aktywności płytek krwi. Prowadzone przez Grodzińską i zespół obserwacje u pacjentów z miażdżycą zarostową kończyn dolnych ujawniły, że stosowane u nich wlewy L-argininy zmniejszały znamienne aktywność płytek krwi [104].

Większe znaczenie kliniczne może mieć natomiast obserwowane silne zwiększenie aktywności fibrynolitycznej osocza pod wpływem infuzji L-argininy, wyrażone znamienym statystycznie skróceniem czasu lizy euglobulin. Podobnie

u pacjentów z chromaniem przestankowym obserwowano istotne skrócenie czasu lizy skrzepu (maksymalnie o ok. 30%) po wlewach L-argininy [104].

Jak wykazano, aktywne płytki krwi uwalniają do krążenia PAI-1, który jest specyficznym inhibitorem tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), oraz PAI-2, inhibitor urokinazy [147]. Zauważono, że już we wczesnych stadiach miażdżycy spada aktywność fibrynolityczna, co wiąże się ze zwiększoną tendencją do powikłań zatorowo-zakrzepowych [147]. Przyczyną tych zmian, zarówno w miażdżycy doświadczalnej jak i ludzi jest prawdopodobnie wzrost aktywności PAI-1 z równoczesnym spadkiem aktywności t-PA. Uaktywnienie procesu fibrynolizy po zastosowaniu L-argininy może być związane z zahamowaniem uwalniania PAI-1 z płytek, co w efekcie powoduje wzrost aktywności t-PA [104,145,146].

6. WNIOSKI

1. Przedłużone, dożylne podawanie L-argininy pacjentom z pierwotnym, opornym na leczenie nadciśnieniem tętniczym wywoływało istotne statystycznie obniżenie zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, z równoczesnym wzrostem częstości tętna.
2. Efekt hipotensyjny był największy w pierwszym dniu stosowania L-argininy i zmniejszał się w kolejnych dniach badania.
3. U pacjentów z wyjściowo wyższymi wartościami skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego obserwowano silniejszą reakcję hipotensyjną w odpowiedzi na wlew L-argininy niż u pacjentów z niższymi wartościami ciśnień.
4. Stopień obniżenia się skurczowego ciśnienia tętniczego w trakcie podawania L-argininy był zależny od poziomu LDL-cholesterolu w surowicy krwi. Pacjenci z LDL-cholesterolem niższym od 3.5 mmol/l mieli niższe średnie wartości ciśnienia tętniczego i efekt hipotensyjny był w tej grupie wyraźniejszy (w porównaniu do pacjentów z cholesterolem LDL>3.5 mmol/l).
5. Po podaniu L-argininy stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie się zmienności ciśnienia tętniczego.
6. Pod wpływem podawanej L-argininy obserwowano istotną statystycznie aktywację fibrynolizy oraz niewielkie, nieznamienne statystycznie, obniżenie aktywności płytek krwi.
7. Wyrazem zwiększonej generacji tlenu azotu pod wpływem podawanej L-argininy był obserwowany wzrost wydalanych z moczem azotynów/azotanów, jakkolwiek znamienne tylko w "I" dniu stosowanej infuzji L-argininy. Nie zaobserwowano natomiast zmian w stężeniu cGMP w surowicy.

7. STRESZCZENIE

Funkcja śródbłonna naczyniowego ulega zaburzeniu w przebiegu nadciśnienia tętniczego i w wyniku zmniejszonej generacji np. tlenku azotu upośledzony jest prawidłowy rozkurcz naczyń. Badania doświadczalne i nieliczne próby kliniczne pokazały, że podawanie L-argininy jako substratu dla produkcji tlenku azotu może częściowo normalizować czynność śródbłonna.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu przedłużonego, dożylnego podawania L-argininy na wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, tętna oraz na wybrane parametry biochemiczne u 30 mężczyzn w wieku od 40 do 67 lat, z pierwotnym, opornym na leczenie nadciśnieniem tętniczym.

Pacjenci ci byli hospitalizowani w I Klinice Kardiologii przez cały okres prowadzonych obserwacji. W pierwszym dniu badania, u chorych tych stosowano dożylny wlew 300 ml soli fizjologicznej przez 180 minut, a w kolejnych czterech dniach podawano dożylnie L-argininę w dawce 16.84 g/300ml/180 minut. W trakcie wlewów rejestrowano w odstępach 30-minutowych wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz tętna. Ponadto dwukrotnie: w dniu wlewu soli fizjologicznej i drugim dniu podawania L-argininy przeprowadzono 24-godzinną, automatyczną rejestrację ciśnienia tętniczego i tętna. Przeprowadzono też ocenę wpływu podawania L-argininy na: zdolność płytek do agregacji, aktywność fibrynolityczną osocza, aktywność reninową osocza, stężenie cGMP w surowicy, stężenie wydalanych z moczem azotanów i azotanów, oraz kwasu wanilino-migdałowego.

Wykazano, że dożylnie podawanie L-argininy wywoływało znamienne statystycznie obniżanie się zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego, z równoczesnym wzrostem częstości tętna. Najsilniejszy efekt hipotensyjny obserwowano w pierwszym dniu stosowania L-argininy. Wlew soli fizjologicznej nie wywoływał żadnych istotnych zmian w wartościach skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego oraz tętna. Średnie, dobowe skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze, wyliczone na podstawie automatycznego rejestrowania ciśnienia było w dniu podawania soli fizjologicznej wyższe niż podczas stosowania L-argininy. Największe różnice zaobserwowano w wartościach średniego rozkurczowego ciśnienia tętniczego rejestrowanego w godzinach od 6 do 22. Stwierdzono też zmniejszenie się zmienności ciśnienia tętniczego podczas podawania L-argininy.

Efekt hipotensyjny, obserwowany w trakcie wlewów był zależny od wyjściowej wielkości zarówno skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia tętniczego. W grupie pacjentów z ciśnieniem skurczowym większym od 140mmHg, jak również w grupie chorych z ciśnieniem rozkurczowym większym od 90mmHg stwierdzono większy procentowy spadek ciśnienia w trakcie podawania L-argininy.

Poziom LDL-cholesterolu w surowicy krwi istotnie wpływał na obniżenie się ciśnienia skurczowego w trakcie wlewów L-argininy, natomiast nie zaobserwowano takiego wpływu dla ciśnienia rozkurczowego. W grupie chorych z wysokim stężeniem LDL-cholesterolu w surowicy, średnie ciśnienie skurczowe rejestrowane przed wlewem było wyższe we wszystkich dniach prowadzonych obserwacji. Pod wpływem L-argininy ciśnienie skurczowe w większym stopniu obniżało się w grupie pacjentów z LDL-cholesterolem niższym od 3.5 mmol/l.

Zaobserwowano, że wlewy L-argininy powodowały wzrost progowego stężenia proagregacyjnego ADP, potrzebnego do wywołania dwustopniowej agregacji płytek krwi, chociaż wzrost ten nie nosił cech znamienności statystycznej. Badany czas lizy euglobulin, odzwierciedlający aktywność fibrynolityczną osocza uległ istotnemu statystycznie skróceniu pod wpływem L-argininy. Nie wykazano natomiast wpływu stosowania tego preparatu na aktywność reninową osocza, ani na wydzielanie kwasu wanilino-migdałowego (uwalnianie amni katecholowych).

Wyrazem zwiększonej generacji tlenu azotu pod wpływem podawanego substratu dla jego syntezy był odnotowany wzrost wydalanych z moczem azotynów i azotanów. Nie wykazano natomiast zwiększenia stężenia cGMP pod wpływem prowadzonych wlewów.

Na podstawie dokonanych obserwacji wydaje się, że podawanie L-argininy może stanowić dodatkową metodę przywracania prawidłowej funkcji śródbłonna u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, szczególnie z towarzyszącymi powikłaniami zakrzepowymi. Jakkolwiek należy się liczyć z występującą w tym przypadku tachyfilaksją na lek.

8. PIŚMIENICTWO

1. Abraham J.S., Bentley F.R., Garrison R.N., Cryer H.M.: Cyclosporine A directly constricts intrarenal arterioles. *Transplant Proc.* 1991, 23:356-359.
2. Alexander R.W.: Hypertension and the Pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. *Hypertension.* 1995, 25:155-161.
3. Amezcua J.L., Palmer R.M.J., de Souza B.M., Moncada S.: Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1988, 97:1119-1124.
4. Anderson T.J., Meredith I.T., Yeung A.C., Frei B., Selwyn A.P., Ganz P.: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion *N Engl J Med.* 1995, 332:488-493.
5. Antony I., Lerebours G., Nitenberg A.: Loss of flow-dependent coronary artery dilatation in patients with hypertension. *Circulation.* 1995, 91:1624-1628.
6. Arcaro G., Zenere B., Travia D., Zenti M.G., Covi G., Lechi A., Muggeo M.: Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis.* 1995, 114:247-254.
7. Azuma H., Ishikawa M., Sekizaki S.: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 1986, 88:411-415.
8. Balligant J.L., Kelly R.A., Marsden P.A., Smith T.W., Michel T.: Control of cardiac muscle function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993, 90:347-351.
9. Barnes P.J.: Non-adrenergic non cholinergic neural control of human airways. *Arch Int Pharmacodyn.* 1986, 280:208-229.
10. Barrett M.L., Willis A.L., Vane J.R.: Inhibition of platelet-derived mitogen release by nitric oxide (EDRF). *Agents Actions.* 1989, 27:488-491.
11. Barrett-Conor E., Bush T.L.: Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA.* 1991, 265:1861-1867.
12. Basu A.K., Ghosh S., Mohanty P.K., Watlington C.O.: Augmented arterial pressure responses to cyclosporine in spontaneously hypertensive rats. Role of cytochrome P-450 3A. *Hypertension.* 1994, 24:480-485.
13. Baudouin S.V., Bath P., Martin J.F., Dubois R., Evans T.W.: L-Arginine infusion has no effect on systemic haemodynamics in normal volunteers, or systemic and pulmonary haemodynamics in patients with elevated pulmonary vascular resistance. *Br J Clin Pharmacol.* 1993, 36:45-49.
14. Baylis C., Mitruka B., Deng A.: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 1992, 90:278-281.
15. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:1620-1624.
16. Belder A.J., Radomski M.W., Martin J.F., Moncada S.: Nitric oxide and the pathogenesis of heart muscle disease. *Eur J Clin Invest.* 1995, 25:1-8.

17. Benyo Z., Kiss G., Szabo C., Csaki C., Kovach A.G.: Importance of basal nitric oxide synthesis in regulation of myocardial blood flow. *Cardiovasc Res.* 1991, 25:700-703.
18. Bhardwaj R., Page C.P., May G.R., Moore P.K.: Endothelium-derived relaxing factor inhibits platelet aggregation in human whole blood *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Pharmacol.* 1988, 157:83-91.
19. Billiar T.R., Ochoa J.B., Curti B.: Increased circulating nitrogen oxides after human tumor immunotherapy correlated with toxic hemodynamic changes. In *Biology of Nitric Oxide*, S.Moncada, MA. Marletta, JB. Higgs, (eds) Amsterdam: Elsevier. 1990, 189-223.
20. Bode-Böger S.M., Böger R.H., Gerecke U., Frölich C.: Effects of chronic oral treatment with L-arginine and N^G-nitro-L-arginine on blood pressure and nitric oxide formation in rats. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London. p.:167-171.
21. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tsikas D., Frölich J.C.: Intravenous L-arginine induces nitric oxide formation and increases peripheral arteriolar blood flow in healthy humans. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:466-470.
22. Born G.R.V.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962, 194:927-929.
23. Brady A.J.B., Poole-Wilson P.A., Harding S.E., Warren J.B.: Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol.* 1992, 263:1963-1966.
24. Brecht D.S., Hwang P.M., Snyder S.H.: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990, 347:768-770
25. Brecht D.S., Snyder S.H.: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:682-685.
26. Brecht D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H.: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature .* 1991, 351:714-718.
27. Brunner H.R., Nussberger J., Waeber B.: Control of vascular tone by renin and angiotensin in cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 1993, 14(suppl.I):149-153.
28. Brush J.E.Jr., Faxon D.P., Salmon S., Jacobs A.K., Ryan T.J.: Abnormal endothelium-dependent coronary vasomotion in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 1992, 19:809-815.
29. Buga G.M., Gold M.E., Fukuto J.M., Ignarro L.J.: Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension.* . 1991, 17:187-193.
30. Bult H., Fret H.R., Herman A.G.: Interaction between SIN-1 and prostacyclin in inhibiting platelet aggregation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989, 14 Suppl 11:S120-S123.
31. Bult H., Boeckstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., van Maercke Y.M., Herman A.G.: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990, 345:346-347.
32. Busse R., Mülsch A.: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1990, 275:87-90.
33. Cachofeiro V., Sakakibara T., Nasjletti A.: Kinins, nitric oxide, and the hypotensive effect of captopril and ramiprilat in hypertension. *Hypertension.* 1992, 19:138-145.

34. Cadwgan T., Benjamin N.: Reduced platelet nitric oxide synthesis in essential hypertension. *J Vasc Biol.* 1991, 3:455A.
35. Califf R.M., Fortin D.F., Frid D.J.: Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J Am Coll Cardiol.* 1991, 17:2B-13B.
36. Calver A., Collier J., Moncada S., Vallance P.: Effect of local infusion of N^G-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension. The nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens.* 1992, 10:1025-1031.
37. Calver A., Collier J., Vallance P.: Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1992, 90:2548-2554.
38. Calver A., Collier J., Leone A., Moncada S., Vallance P.: Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertension.* 1993, 7:193-194.
39. Carey C., Siegfried M.R., Ma X.L., Weyrich A.S., Lefer A.M.: Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia nad reperfusion. *Circ Shock.* 1992, 38:209-216.
40. Casino PR., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A., Hoeg J.M., Panza J.A.: Role of nitric oxide in the endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation.* 1993, 88:2541-2547.
41. Castillo L., Sanchez M., Vogt J., Chapman T.E., de Rojas-Walker T., Tannenbaum S.R., Ajami A.M., Young V.R.: Arginine metabolism in relation to nitric oxide formation during an arginine-free intake in healthy man. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:441-443.
42. Chapell S.P., Lewis M.J., Henderson A.H.: Effect of lipid feeding on endothelium dependent relaxation in rabbit aortic preparations. *Cardiovascular Res.* 1987, 21:34-38.
43. Chen P.Y., Sanders P.W.: The inducible form of nitric oxide synthase may participate in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Am Soc Neph.* 1991, 2:502
44. Chen P.Y., St.John P.L., Abrahamson D.R., Sanders P.W.: Chronic arginine supplementation prevents hypertensive nephrosclerosis and hypertension in Dahl/Rapp salt-sensitive (SS/Jr) rats. *Clin Research.* 1992, 40:353A.
45. Chester A.H., O'Neil G.S., Moncada S., Tadjkarimi S., Yacoub M.H.: Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet.* 1990, 336:897-900.
46. Chin J.H., Azhar S., Hoffman B.B.: Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest.* 1992, 89:10-18.
47. Chlopicki S., Gryglewski R.J.: Nitric oxide is a major mediator in reactive hyperaemia evoked by a brief coronary occlusion in the guinea pig heart. *Eur J Pharmacol.* 1993, 241(1):117-120.
48. Chyu K-Y., Guth P.H., Ross G.: Effect of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester on arterial pressure and on vasodilator and vasoconstrictor responses: influence of initial vascular tone. *Europ J Pharmac.* 1992, 212:159-164.
49. Cockcroft J.R., Chowienczyk P.J., Benjamin N., Ritter J.M.: Preserved endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1994, 330:1036-1040.

50. Collen D., Lijnen H.R.: Tissue-type plasminogen activator. Mechanisms of action and thrombolytic properties. *Haemostasis*. 1986, 16(suppl.) 3:25-32.
51. Collingridge G.L., Singer W.: Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*. 1990, 11:290-296.
52. Cooke J.P., Andon N.A., Girerd X.J., Jirsch A.T., Creager M.A.: Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolaemic rabbit thoracic aorta. *Circulation*. 1991, 83:1057.
53. Cooke J.P., Rossitch E.Jr., Andon N.A., Loscalzo J., Dzau V.J.: Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest*. 1991, 88:1663-1671
54. Cooke J.P., Tsao P.: Cellular mechanisms of atherogenesis and the effects of nitric oxide. *Curr Opin Cardiol*. 1992, 7:799-804.
55. Corbett I.A., Sweetland M.A., Wang I.L., Lancaster I.R.Jr., Mc Daniel M.L.: Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90(5):1731-1735
56. Craven P.A., DeRubertis F.R.: Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem*. 1978, 253:8433-8443.
57. Creager M.A., Gallagher S.J., Girerd X.J., Coleman S.M., Dzau V.J., Cooke J.P.: L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1992, 90:1248-1253.
58. Cunha F.Q., Moncada S., Liew F.Y.: Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Comm*. 1992, 182:1155-1159
59. Curtis J.J., Luke R.G., Jones P.: Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium-dependent. *Am J Med*. 1988, 85:134-138.
60. Daemen M.J.A.P., De Mey J.G.R.: Regional heterogeneity of arterial structural changes. *Hypertension*. 1995, 25(part 1):464-473.
61. Davies M.G., Hagen P.O.: The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg*. 1993, 218:593-609.
62. Davies P.F., Remuzzi A., Gordon E., Dewey C.F.Jr., Gimbrone M.A. Jr.: Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, 83:2114-2117.
63. Dembińska-Kieć A., Żmuda A., Wenhryniewicz O., Stachura J., Peskar B.A., Gryglewski R.J.: Selectin-P mediated adherence of platelets to neutrophils is regulated by prostanooids and nitric oxide. *Tissue Reaction*. 1993, 15:55-64
64. Dembińska-Kieć A., Gościński I., Szczudlik A.: Labile products of vascular endothelium as mediators and modulators of the functions of the central nervous system. *J Physiol Pharmacol*. 1994, 45, 2:191-221.
65. Deng A., Baylis C.: Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient. *Am J Physiol*. 1993, 254:F212-F215.
66. Desai K.M., Zembowicz A., Sessa W.C., Vane J.R.: Nitroxergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88:11490-11494.

67. DiCorleto P.E., Soyombo A.A.: The role of the endothelium in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*. 1993, 4:364-372.
68. Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988, 141:2407-2412.
69. Ding A., Nathan C.F., Graycar J., Derynck R., Stuehr D.J., Srimal S.: Macrophage deactivating factor and transforming growth factors $-\beta_1$, $-\beta_2$ and $-\beta_3$ inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J Immunol*. 1990, 145:940-944
70. Dohi Y., Thiel M.A., Buhler F.R., Lüscher T.F.: Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries: effects of age and hypertension. *Hypertension*. 1990, 15:170-179.
71. Drapier J.C., Hibbs J.B.Jr.: Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells: inhibition involves the iron-sulphur protetic groups and is reversible. *J Clin Invest*. 1986, 78:790-797.
72. Drapier J.C.: Nitric oxide in the cytokine network. In: *Nitric oxide : brain and immune systems*. Moncada S., Nistico G., Higgs E.A., Portland Press, London & Chapel Hill. 1993, 205-212.
73. Drexler H., Zeiher A., Meinzer K., Just H.: Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet*. 1991, 338:1546-1550.
74. Dubois-Rande J.L., Zelinsky R., Roudot F.: Effects of infusion of L-arginine into the left anterior descending coronary artery on acetylcholine-induced vasoconstriction of human atheromatous coronary arteries. *Am J Cardiol*. 1992, 70:1269-1275.
75. Duerksen-Hughes P.J., Day D.B., Laster S.M., Zachariades N.A., Aquino L., Gooding L.R.: Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *J Immunol*. 1992, 149:2112-2114.
76. Egashira K., Hirooka Y., Kai H.: Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*. 1994, 89:2519-2524.
77. Egashira K., Suzuki S., Hirooka Y., Kai H., Sugimachi M., Imaizumi T., Takeshita A.: Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. Different responses to acetylcholine and substance P. *Hypertension*. 1995, 25:201-206.
78. Eriksson S., Appelgren B., Rundgren M., Andersson B.: Vasopressin release in response to intracerebroventricular L-alanine and L-arginine and its dependence upon CSF NaCl concentration. *Acta Physiol Scand*. 1982, 116:75-81.
79. Evans H.G., Lewis M.J., Shah A.M.: Interleukin 1- β modulates myocardial contraction via dexametasone-sensitive production of nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 1993, 27:1486-1490.
80. Fantone J.C., Ward P.A.: Role of oxygen-derived free radical and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol*. 1982, 107:397-427
81. Faraci F.M., Breese K.R.: Nitric oxide mediates vasodilation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circ Res*. 1993, 72:476-480.
82. Fast D.J., Lynch R.C., Leu R.W.: Cyclosporin-A inhibits nitric oxide production by L 929 cells in response to tumor necrosis factor and interferon-gamma. *J Interferon Res*. 1993, 13:235-240.

83. Feelisch M., Bloch W., Addicks K.: Control of intraaxonal catecholamine storage in cardiac sympathetic nerve fibers by endogenous nitric oxide. *J Endothel Cell Res.* 1993, 1, abstract 25.
84. Fehsel K., Jalowy A., Qi S., Burkart V., Hartmann B., Kolb H.: Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes.* 1993, 42(3):496-500.
85. Fickling S.A., Williams D., Vallance P., Nussey S.S., Whitley G.St.J.: Plasma concentration of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet.* 1993, 342.
86. Fineman J.R., Heymann M.A., Saifer S.J.: N-omega-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs. *Am J Physiol.* 1991, 260:H1299-H1306.
87. Finkel M.S., Oddis C.V., Jacob T.D., Watkins S.C., Hattler B.G., Simmons R.L.: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 1992, 257:387-389.
88. Försterman U., Mugge A., Alheid U., Haverich A., Frölich J.C.: Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res.* 1988, 62:185-190
89. Förstermann U., Pollock J., Schmidt H.H.H.W., Heller M., Murad F.: Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88:1788-1792.
90. Fort S., Shah A.M., Evans H.G., Lewis M.J.: Endothelium-derived relaxing factor released from endocardial and coronary vascular endothelium modulates cardiac contraction. *Biology of Nitric Oxide*, London, UK, Portland. 1992, 110-113.
91. Fort S., Lewis M.J.: A factor released from the coronary vascular endothelium inhibits myocardial contractile performance. *Am J Physiol.* 1993, 264:H830-H836.
92. Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980, 288:373-376.
93. Furlong B., Henderson A.H., Lewis M.J., Smith J.A.: Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 1987, 90:687-692.
94. Gardiner S.M., Compton A.M., Bennett T., Palmer R.M.J., Moncada S.: Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension.* 1990, 15:486-492.
95. Garthwaite J., Charles S.L., Chess Williams R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature.* 1988, 336:385-388.
96. Garthwaite J.: Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991, 14:60-67.
97. Gaston B., Reilly J., Fackler J., Ramdev P., Jaraki O., Sugarbaker D., Mullins M.E., Singel D., Loscalzo J., Stamler J.S.: Endogenous bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:444-446
98. Gerzer R., Drummer C., Karrenbrock B., Heim J.M.: Inhibition of platelet activating factor-induced platelet aggregation by molsidomine, SIN-1, and nitrates in vitro and ex vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989, 14 Suppl 11:115-119.
99. Gibbons G.H., Dzau V.J.: The emerging concept of vascular remodelling. *New Engl J Med.* 1994, 20:1431-1438.

100. Gillespie J.S., Liu X.R., Martín W.: The effects of L-arginine and NG-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol.* 1989, 98:1080-1082.
101. Gillespie J.S., Liu X.R., Martin W.: The neurotransmitter of the nonadrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system. In: S. Moncada, E.A. Higgs eds. *Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory Nitric System.* Amsterdam: Elsevier. 1990 pp. 147-164.
102. Gold M.E., Wood K.S., Byrns R.E., Fukuto J., Ignarro L.J.: NG^G -Methyl-L-arginine causes endothelium-dependent contraction and inhibition of cyclic GMP formation in artery and vein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:4430-4434.
103. Graaf de J.C., Banga J.D., Moncada S., Palmer R.M.J., de Groot P.G., Sixma J.J.: Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992, 85:2284-2290
104. Grodzińska L., Kostka-Trąbka E., Slawinski M., Bieroń K., Goszcz A.: Beneficial L-arginine therapy in patients with arteriosclerosis obliterans of the lower limbs. *Österreichische Arbeitsgemeinschaft für Klinische Pharmakologie. 19. Symposium. Teil II: Compliance, G. Hitzenberger.* Blackwell Wissenschafts-Verlag, Wien. 1995, 90-99.
105. Gross S.S., Stuehr D.J., Aisaka K., Jaffe E.A., Levi R., Griffith O.W.: Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, 170:96-103.
106. Grupa Robocza Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego: 24-godzinne automatyczne monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi w diagnostyce i terapii nadciśnienia tętniczego - stan obecny i perspektywy. *Med Prakt.* 1993, 7:11-13.
107. Gryglewski R.J., Bunting S., Moncada S., Flower R.J., Vane J.R.: Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (Prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. *Prostaglandins.* 1976, 12:685-713.
108. Gryglewski R.J., Palmer R.M.J., Moncada S.: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986, 320:454-456.
109. Gryglewski R.J., Korbut R., Trąbka Janik E., Zembowicz A., Trybulec M.: Interaction between NO donors and iloprost in human vascular smooth muscle, platelets and leukocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989, 14 Suppl 11:S124-S128.
110. Gryglewski R.J.: Nitric oxide and atherosclerosis. *Thromb Hemorrh Disorders.* 1990, 2/1:1-9.
111. Haberland M.E., Frong D., Cheung L.: Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipemic rabbits. *Science.* 1988, 241:215-218.
112. Hambræus Jonzon K., Bindeslev L., Hedenstierna G., Frostell C.: Effect of inhaled nitric oxide during selective lung ventilation in anaesthetized humans. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:490-494.
113. Hansen J., Jacobsen T.N., Victor R.G.: Is nitric oxide involved in the tonic inhibition of central sympathetic outflow in humans? *Hypertension.* 1994, 24:439-444.
114. Hansson G.K., Geng Y., Holm J., Hardhammar P., Wennmalm A., Jennische E.: Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med.* 1994, 180:733-738.

115. Hare J.M., Loh E., Creager M.A., Colucci W.S.: Nitric oxide inhibits the contractile response to beta-adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. American Heart Association, Dallas, Texas. 1994, abstract 1035.
116. Haynes W.G., Noon J.P., Walker B.R., Webb D.J.: Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens.* 1993, 11:1375-1380.
117. Haynes W.G., Webb D.J.: Does nitric oxide synthesis really contribute to systemic blood pressure control? Authors' reply. *J Hypertens.* 1995, 13:710.
118. Hecker M., Bara A.T., Busse R.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors unmask endogenous kinin production by bovine coronary artery endothelium. *Eur Heart J.* 1993, 14(suppl.):161-163.
119. Hibbs J.B.J., Vavrin Z., Taintor R.R.: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol.* 1987, 138:550-565.
120. Hibbs J.B.Jr., Taintor R.R., Vavrin Z.: Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987, 235:473-476.
121. Hibbs J.B.J., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M.: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, Jan 31; 158(2):624] *Biochem Biophys Res Commun.* 1988, 157:87-94.
122. Hibbs J.B.Jr., Taintor R.R., Vavrin Z.: Synthesis of nitric oxide from a guanidino nitrogen of L-arginine: a molecular mechanism that targets intercellular iron. In: *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System.* S.Moncada, EA. Higgs, (eds) Amsterdam: Elsevier. 1990, 189-223.
123. Hibbs J.B.J., Westenfelder C., Taintor R.: Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest.* 1992, 89:867-877.
124. Higashi Y., Oshima T., Ozono R., Watanabe M., Matsura H., Kajiyama G.: Effects of L-Arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension. *Hypertension.* 1995, 25(part 2):898-902
125. Hishikawa K., Nakaki T., Tsuda M.: Effect of systemic L-arginine administration on hemodynamics and nitric oxide release in man. *Jpn Heart J.* 1992, 33:41-48.
126. Hishikawa K., Nakaki T., Suzuki H., Kato R., Saruta T.: Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J Hypertens.* 1993, 11:639-645.
127. Hogan J.C., Lewis M.J., Henderson A.H.: *In vivo* EDRF activity influences platelet function. *Br J Pharmacol.* 1988, 94:1020-1022
128. Hotchkiss R.S., Karl I.E., Parker J.L., Adams H.R.: Inhibition of NO synthesis in septic shock. *Lancet.* 1992, 339:434-435.
129. Hsueh W.A., Anderson P.W.: Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension.* 1992, 20:253-263.
130. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K. S., Byrns R.E., Chaudhuri G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987, 84:9265-9269.
131. Ignarro L.J.: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties *FASEB J.* 1989, 3:31-36.

132. Ignarro L.J.: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990, 30:535-560.
133. Imms F.J., London D.R., Neame R.L.B.: The secretion of catecholamines from the adrenal gland following arginine infusion in the rat. *J Physiol (Lond).* 1969, 200:55P-56P.
134. Iwata F., Joh T., Kawai T., Itoh M.: Role of EDRF in splanchnic blood flow of normal and chronic portal hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1992, 263:G149-G154.
135. Kabat M.: Zmienność i rytm dobowy ciśnienia tętniczego krwi, metody oceny, znaczenie kliniczne. *Kardiologia Pol.* 1994, 41-229.
136. Kanno K., Hirata Y., Emori T., Ohta K., Eguchi S., Imai T., Marumo F.: L-arginine infusion induces hypotension and diuresis/natriuresis with concomitant increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMP in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992, 19:619-625.
137. Kaulla von K.N., Schultz R.L.: Method for evaluation of human fibrinolysis. *Am J Clin Pathol.* 1958, 29:104-112.
138. Kawecka-Jaszcz K., Czarnecka D., Królikowski T., Rajzer M.: 24-godzinne automatyczne monitorowanie ciśnienia tętniczego. *Med Prakt.* 1995, 7-8:7-12.
139. Kilbourn R.G., Gross S.S., Jubran A.: N^G-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:3629-3632.
140. Kilbourn R.G., Jubran A., Gross S.S.: Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Comm.* 1990, 172:1132-1138.
141. Koifman B., Wollman Y., Bogomolny N., Chernichowsky T., Finkelstein A., Peer G., Scherez J., Blum M., Laniado S., Iaina A., Keren J.: Improvement of cardiac performance by intravenous infusion of L-arginine in patients with moderate congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1995, 26:1251-1256.
142. Kolb H., Kolb-Bachofen V.: Type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia.* 1992, 35:796-797.
143. Koller A., Huang A., Sun D., Kaley G.: Exercise training augments flow-induced dilation in rat arterioles via increased endothelial synthesis of nitric oxide and prostaglandins. *American Heart Association, Dallas Texas.* 1994, abstract 2766.
144. Kondo K., Mitchell J.A., de Nucci G., Vane J.R.: Simultaneous measurement of endothelium-derived relaxing factor by bioassay and guanylate cyclase stimulation. *Br J Pharmacol.* 1989, 98:630-636.
145. Korbut R., Lidbury P.S., Vane J.R.: Prolongation of fibrinolytic activity of tissue plasminogen activator by nitrovasodilators. *Lancet.* 1990, 335:669-670.
146. Korbut R., Bieroń K., Gryglewski R.J.: Effect of L-arginine on plasminogen-activator inhibitor in hypertensive patients with hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1993, 288-289.
147. Korbut R., Gryglewski R.J.: Fibrynoliza w miażdżycy. *Czynniki Ryzyka.* 1994, 2:22-26.
148. Krekels M.M.E., Huvers F.C., de Leeuw P.W., Schaper N.C.: Does nitric oxide synthesis really contribute to systemic blood pressure control? *J Hypertens.* 1995, 13:709.
149. Kroncke K.D., Kolb Bachofen V., Berschick B., Burkart V., Kolb H.: Activated macrophages kill pancreatic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, 175:752-758.

150. Kuhn M., Forstermann U.: Endothelium-dependence vasodilatation in human epicardial coronary arteries: effect of prolonged exposure to glyceryl trinitrate or SIN-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989, 14 Suppl 11:47-54
151. Kukovetz W.R., Holzmann S., Schmidt K.: Cellular mechanisms of action of therapeutic nitric oxide donors. *Eur Heart J.* 1991, 12(suppl.):16-24.
152. Kwon N.S., Nathan C.F., Stuehr D.J.: Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem.* 1989, 264:20496-20501.
153. Kwon N.S., Stuehr D.J., Nathan C.F.: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage derived nitric oxide. *J Exp Med.* 1991, 174:761-768.
154. Lancaster J.R.: Nitric oxide in cells. *American Scientist.* 1992, 80:248-259.
155. Lapetina E.: The toxic effects of nitric oxide might be due to the nitric oxide-induced S-nitrosylation and ADP-ribosylation of glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Vasc Med Biol.* 1991, 3:442.
156. Lefter D.J., Nakanishi K., Johnston W.E., Vinten-Johansen J.: Antineutrophil and myocardial protecting actions of novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation.* 1993, 88(part1):2337-2350.
157. Lefroy D.C., Crace T., Uren N.G., Davies G.J., Maseri A.: Effects of nitric oxide in the human coronary circulation. *Circulation.* 1992, 86(suppl.1)I-118.
158. Lelchuk R., Radomski M.W., Martin J.F., Moncada S.: Constitutive and inducible nitric oxide synthases in human megakaryoblastic cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992, 262:1220-1224.
159. Lepoivre M., Fieschi F., Coves J., Thelander L., Vontecave M.: Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, 179:442-448.
160. Lieberman E.H., Gerhard M.D., Uehata A.: Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1994, 121:936-941.
161. Linder L., Kiowski W., Büchler F.R., Lüscher T.F.: Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation *in vivo*. *Circulation.* 1990, 81:1762-1767.
162. Lindgren J.A., Edenius C.: Transcellular biosynthesis of leukotriens and lipoxins via leukotriene A4 transfer. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, 14:351-354.
163. Linz W., Wiemer G., Scholkens B.A.: ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1992, 24:909-919.
164. Lorgeril de M., Roussear G., Basmadjian A., Latour J.G.: Neutrophil accumulation in necrotic and viable reperfused ischemic myocardium. *Fed Proc.* 1987, 46:1043-1047.
165. Lowenstein C.J., Allen G., Walker A., Rosse N., Snyder S., Herskowitz A.: Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. *Circulation.* 1993, 88:I-G-I-H.
166. Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H.: Nitric oxide: a physiological messenger. *Ann Intern Med.* 1994, 120:227-237.
167. Lucchesi B.R., Mullane K.M.: Leucocytes and ischaemia-induced myocardial injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1986, 26:201-224.

168. Luke R.G.: Essential hypertension: a renal disease? A review and update of evidence. *Hypertension*. 1993, 21:380-390.
169. Lüscher T.F.: The Endothelium. Target and promoter of hypertension ?. *Hypertension*. 1990, 15:482-485.
170. Lüscher T.F.: Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J*. 1991,12(suppl):2-11.
171. Lyons D., Webster J., Benjamin N.: The effect of antihypertensive therapy on responsiveness to local intra-arterial N^G -monomethyl-L-arginine in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1994, 12:1047-1052.
172. Ma X.L., Weyrich A.S., Lefer D.J., Lefer A.M.: Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*. 1993, 72:403-412.
173. MacDonald P.S., Read M.A., Dusting G.J.: Synergistic inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Thromb Res*. 1988, 49:437-449.
174. Majid D.S.A., Godfrey M., Grisham M.B., Navar G.: Relation between pressure natriuresis and urinary excretion of nitrate/nitrite in anesthetized dogs. *Hypertension*. 1995, 25(part 2):860-865.
175. Malek A.M., Izumo S.: Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. *J Hypertens*. 1994, 12:989-999.
176. Mancia G., Grassi G., Parati G., Pomidossi G., Saino A., Malaspina D., Gregorini L., Zanchetti A.: Control of circulation by arterial baroreceptors and cardiopulmonary receptors in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986, 8(suppl.5):S82-S88.
177. Mancia G., Parati G., Pomidossi G., Casadei R., Di Rienzo M., Zanchetti A.: Arterial baroreflexes and blood pressure and heart rate variabilities in humans. *Hypertension*. 1986, 8:147-153.
178. Maragos C.M., Morley D., Wink D.A., Dunams T.M., Saavedra J.E., Hoffman A., Bove A.A., Isaac L., Hrabic J.A., Keefer L.K.: Complexes of •NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide vasorelaxant effects. *J Med Chem*. 1991, 34(11):3242.
179. Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D., Wishnok J.S.: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*. 1988, 27:8706-8711.
180. Marsden P.A., Shappert K.T., Chen H.S., Flowers M., Sundell C.L., Wilcox J.N., Lamas S., Michel T.: Molecular cloning and characterization of human endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992, 267:15274-15276.
181. Marshall J.J., Kontos H.A.: Endothelium-derived relaxing factors. A perspective from in vivo data. *Hypertension*. 1990, 16:371-386.
182. Martin W.J.: Neutrophils kill pulmonary endothelial cells by a hydrogen peroxide-dependent pathway: an in vitro model of neutrophil-mediated lung injury. *Am Rev Respir Dis*. 1984, 30:109-113..
183. Martin W.J., Villani G.M., Jothianandan D., Furchgott R.F.: Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985, 232:708-716
184. Marumo T., Nakaki T., Hishikawa K., Suzuki H., Kato R., Saruta T.: Cyclosporin A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1995, 25:764-768.

185. Mathew R., Colt S., Gewitz M.H.: Nitric oxide production is impaired in rat pulmonary artery during pulmonary hypertension. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:253-256.
186. McCall T.B., Boughton-Smith N.K., Palmer R.M.J., Whittle B.J.R., Moncada S.: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide ion. *Biochem J.* 1989, 261:293-296.
187. Mellion B.T., Ignarro L.J., Ohlstein E.H., Pontecorvo E.G., Hyman A.L., Kadowitz P.J.: Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood.* 1981, 57:946-955.
188. Mendelsohn M.E., Karas R.H.: Estrogen and the blood vessel wall. *Current Opinion in Cardiol.* 1994, 9:619-626.
189. Meulemans A.L., Sipido K.R., Brutsaert D.L.: Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle. *Circ Res.* 1988, 62:1171-1174.
190. Mollace V., Bagetta G., Nistico G.: Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuroreport.* 1991, 2:269-272.
191. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension.* 1988, 12:365-372.
192. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989, 38:1709-1715.
193. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991, 43:109-142.
194. Morganti Kossmann M.C., Kossmann T., Wahl S.M.: Cytokines and neuropathology. *Trends Pharmacol Sci.* 1992, 13:286-291.
195. Morris S.M., Billiar T.R.: New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol.* 1994, 266:E829-E839.
196. Moutrik van J.A., Lawrance D.A., Loskutoff D.J.: Purification of an inhibitor of plasminogen activator (anti-activator) synthesised by endothelial cells. *J Biol Chem.* 1984, 259:14914-14921.
197. Mügge A., Elwell J.H., Peterson T.E., Harrison D.G.: Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol.* 1991, 260:C219-225.
198. Muhl H., Kunz D., Rob P., Pfeilschifter J.: Cyclosporin derivatives inhibit interleukin-1 β induction of nitric oxide synthase in renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol.* 1993, 249:95-100.
199. Mullane K.M., Kraemer R., Smith B.: Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischaemic myocardium. *J Pharmacol Methods.* 1985, 14(3):157-167.
200. Murad F.: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. *J Clin Invest.* 1986, 78:1-5.
201. Murohara T., Buerke M., Lefer A.M.: Polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. Role of selectins. *Arterioscler Thromb.* 1994, 14:1509-1519.
202. Myers P.R., Webel R.R., Venkata R., Thondapu V.R., Jenkins J.S., Xu X.P., Pollock J.S., Amann J.F.: Vascular nitric oxide synthase activity following coronary artery balloon injury in a porcine restenosis model. American Heart Association, Dallas, Texas. 1994, abstract 741.

203. Nakaki T., Hishikawa T., Suzuki H., Saruta T., Kato R.: L-arginine-induced hypotension. *Lancet*. 1990, 336:696.
204. Nakaki T., Kato R.: Beneficial circulatory effect of L-Arginine. *Jpn J Pharmacol*. 1994, 66:167-171.
205. Nakazono K., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Sato T., Inoue M.: Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88:10045-10048.
206. Naruse K., Shimizu K., Muramatsu M., Toki Y., Myazaki Y., Okumura K., Hashimoto H., Ito T.: Prostaglandin H₂ does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation and long-term inhibition of nitric oxide synthesis promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Atheroscler Thromb*. 1994, 14:746-752.
207. Nathan C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992, 6:3051-3064.
208. Nathan C., Xie Q.W.: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994, 269:13725-13728.
209. Nava E., Palmer R.M.J., Moncada S.: Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet*. 1991, 338:1555-1557.
210. Navab M., Hama S.Y., Nguyen T.B., Fogelman A.E.: Monocyte adhesion and transmigration in atherosclerosis. *Coron Art Dis*. 1994, 5:198-204.
211. Nguyen T., Brunson D., Crespi C.L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tanenbaum S.R.: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89:3030-3034.
212. Nishida K., Harrison D.G., Navas J.P., Fisher A.A., Docjery S.P., Uematsu M.: Molecular cloning and characterization of constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1992, 90:2092-2096.
213. Nozaki K., Moskowitz M. A., Maynard K.I., Koketsu N., Dawson T.M., Bredt D.S.: Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase - containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993, 13:70-79.
214. Nussler A.K., Di Silvio M., Billiar T.R., Hoffman R.A., Geler D.A., Selby R., Madariaga J., Simmons R.L.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med*. 1992, 176:261-266.
215. Ochoa J.B., Udekwu A.O., Billiar T.R.: Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg*. 1991, 214:621-626.
216. Olesen J., Thomsen L.L., Iversen H.: Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *TIPS*. 1994, 15:149-153.
217. Olessen S.P., Clampham D.E., Davies P.E.: Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*. 1998, 331:168-170.
218. Palmer J.P., Walter R.M., Ensnick J.W.: Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion. I. In normal man. *Diabetes*. 1975, 24:735-740.
219. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.: Nitric oxide release from vascular endothelial cells accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987, 327:524-526.

220. Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988, 333:664-666.
221. Palmer R.M.J., Rees D.D., Ashton D.S., Moncada S.: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988, 153:1251-1256.
222. Palmer R.M.J., Moncada S.: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989, 158:348-352.
223. Panza J.A., Quyyumi A.A., Brush J.E., Epstein S.E.: Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990, 323:22-27.
224. Panza J.A., Casino P.R., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993, 87:1468-1474.
225. Panza J.A., Garcia C.E., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A., Cannon R.O.III: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*. 1995, 91:1732-1738.
226. Parati G., Mutti E., Frattola A., Castiglioni P., di Rienzo M., Mancia G.: β -Adrenergic blocking treatment and 24-hour baroreflex sensitivity in essential hypertensive patients. *Hypertension*. 1994, 23[part 2]:992-996.
227. Patel V.C., Yellon D.M., Singh K.J., Neild G.H., Woolfson R.G.: Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the situ rabbit heart. *Bioch Biof Research Communications*. 1993, 1:234-238.
228. Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.: Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans. American Heart Association, Dallas Texas. 1994, abstract 80.
229. Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.: Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility. *Circulation*. 1994, 89:2070-2078.
230. Petros A., Bennett D., Vallance P.: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*. 1991, 338:1557-1558.
231. Peiro C., Redondo J., Rodriguez-Martinez M.A., Angulo J., Marin J., Sanchez-Ferrer C.F.: Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension*. 1995, 25[part 2]:748-751.
232. Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., et al.: Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88:10480-10484.
233. Przewłocki R., Machelska H., Przewłocka B.: Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in rat spinal cord. *Life Sciences*. 1993, 53:1-5.
234. Quyyumi A.A., Dakak N., Andrews N.P., Husain S., Arora S., Gilligan D.M., Panza J.A., Cannon III R.O.: Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1995, 95:1747-1755.
235. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*. 1987, 92:181-187.

236. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987, 2(8567):1057-1058.
237. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: The anti-aggregatory properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987, 92:639-646.
238. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: The role of nitric oxide and cyclic GMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987, 148:1482-1489.
239. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:10043-10047
240. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87:5193-5197.
241. Radomski M.W., Rees D.D., Dutra A., Moncada S.: S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*. 1992, 107:745-749.
242. Radomski M.W., Moncada S.: Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost*. 1993, 70(1):36-41.
243. Rakoff J.S., Siler T.M., Sinha Y.N., Yen S.S.C.: Prolactin and growth hormone release in response to sequential stimulation by arginine and TRF. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973, 37:641-644.
244. Ramacciotti C., Sharkey A., McClellan G., Winegrad S.: Endothelial cells regulate cardiac contractility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89:4033-4036.
245. Rapoport R.M., Draznin M.B., Murad F.: Endothelium-dependent vasodilator-and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Assoc Am Physicians*. 1983, 96:19-30.
246. Rapoport R.M., Murad F.: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in the rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983, 52:352-357.
247. Rees D.D., Palmer R.M.J., Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, 86:3375-3378.
248. Rees D.D., Celtek S., Palmer R.M.J., Moncada S.: Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990, 173:541-547.
249. Rees D.D., Moncada S.: Induction by endotoxin of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the vasculature and its pathological role in endotoxin shock. In: *Clinical Relevance of Nitric Oxide in the Cardiovascular System*. Moncada S., Higgs E.A., Berrazueta J.R.(eds). EDICOMPLET SA. Madrid. 1991, pp.69-87.
250. Refsum H., Ueland M.: Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *TIPS Reviews*. 1990, 11:411-416.
251. Ribeiro M.O., de Nucci G., Zatz R.: Persistent arterial hypertension by chronic blockade of nitric oxide synthesis. *J Am Soc Neph*. 1991, 2:512-515.
252. Ribeiro M.O., Antunes E., de Nucci G., Lovisolo S.M., Zatz R.: Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992, 20:298-303.

253. Roberts A.B., Vodovotz Y., Roche N.S., Sporn M.B., Nathan C.F.: Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor- β and interleukin-1- β on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *Mol Endocrinol.* 1992, 6:1921-1930.
254. Roberts J.D., Polaner D.M., Lang P., Zapol W.M.: Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet.* 1992, 340:818-819.
255. Romero J.C., Lahera V., Salom M.G., Biondi M.L.: Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol.* 1992, 2:1371-1387.
256. Rosenfeld M.E.: Oxidized LDL affects multiple atherogenic cellular responses (editorial comment). *Circulation.* 1991, 83:2137-2020.
257. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993, 362:801-809.
258. Rossaint R., Falke K.J., Lopez F., Slama K., Pison U., Zapol W.M.: Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1993, 328:399-405.
259. Rossaint R., Pison U., Gerlach H., Falke K.J.: Inhaled nitric oxide: its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. *Eur Heart J.* 1993, 14(suppl.I):133-140.
260. Rossen R.D., Swain J.L., Michael L.H., Weakley S., Gianini E.: Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischaemic canine heart muscles. *Circ Res.* 1985, 97:119-130.
261. Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M.: Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986, 250:H822-H827.
262. Ruilope L.M., Lahera V., Rodicio J.L., Romero J.C.: Participation of nitric oxide in the regulation of renal function: possible role in the genesis of arterial hypertension. *J Hypertens.* 1994, 12:625-631.
263. Sacks T., Moldow C.F., Craddock P.R., Bowers T.K., Jacob H.A.: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes: an in vitro model of immune complex vasculitis. *J Clin Invest.* 1978, 61:1161-1167.
264. Sakuma I., Stuehr D.J., Gross S.S., Nathan C., Levi R.: Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, 85:8664-8667.
265. Sakuma I., Shudo H., Togashi H., Yoshioka M., Saito H., Nakamura T., Kitabatake A., Levi R.: A new model of ischemic cardiomyopathy in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *J Endothel Cell Res.* 1993, 1(suppl), abstract 253.
266. Sakuma I., Shudo H., Togashi H., Yoshioka M., Saito H., Nakamura T., Fujioka Y., Kitabatake A., Levi R.: A chronic model of hypertension with increased sympathetic drive in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:245-248.
267. Salter M., Knowles R.G., Moncada S.: Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1992, 291:145-149.
268. Salvemini D., de Nucci G., Gryglewski R.J., Vane J.R.: Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86:6328-6332

269. Sanders P.W.: Role of nitric oxide in regulation of blood pressure. *J Nephrol.* 1992, 5:23-30.
270. Scanlon P.H.Jr., Dzielak D.J., Hester R.L., Kirchner K.A.: Effect of L-arginine on blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. *Clin Research* . 1991, 39:807A.
271. Schmidt.H.H.H.W., Nau H., Wittfoht W., Gerlach J., Prescher K-E., Klein M.M., Niroomand F., Bohme E.: Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1988, 154:213-216.
272. Schmidt.H.H.H.W., Seifert R., Böhme E.: Formation and release of nitric oxide by human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B₄. *FEBS Lett.* 1989, 244:357-360.
273. Schmidt H.H.H.W., Murad F.: Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, 181:1372-1377.
274. Schmidt H.H.H.W., Warner T.D., Ishii K., Sheng H., Murad F.: Insulin secretion from pancreatic β -cells caused by L-Arg derived nitric oxides. *Science.* 1991, 255:721-723.
275. Schroder H., Noack E., Muller R.: Evidence for a correlation between nitric oxide formation by cleavage of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *J Mol Cell Cardiol.* 1985, 17:931-934.
276. Schultz P.J., Tolins J.P.: Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest.* 1993, 91:642-650.
277. Schultz R., Nava E., Moncada S.: Induction and potential biological relevance of Ca⁺²-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol.* 1992, 105:575-580.
278. Schulz R., Triggle C.R.: Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *TIPS.* 1994, 15:255-259.
279. Scott-Burden T., Vanhoutte P.M.: Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation: Role of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide). *J Vasc Biol.* 1991, 3:445-446.
280. Sessa W.V., Harrison J.K., Barber C.M., Zeng D., Durieux M.E., D'Angelo D.D., Lynch K.R., Peach M.J.: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992, 267:15274-15276.
281. Shah A.M., Lewis M.J.: Modulation of myocardial contraction by endocardial and coronary vascular endothelium. *Trends Cardiovasc Med.* 1993, 3:98-103.
282. Shah A.M., Spurgeon H.A., Sollot S.J., Talo A., Lakatta E.G.: 8-bromo cyclic GMP reduces the myofilament response to calcium in intact cardiac myocytes. *Circ Res.* 1994, 74.
283. Shappel S.B., Toman C., Anderson D.C., Taylor A.A., Entman M.L., Smith C.W.: Mac-1 (CD 11b/CD 18) mediated adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J Immun.* 1990, 144:2720-2711.
284. Siegfried M.R., Erhardt J., Rider T., Ma X.L., Lefler A.M.: Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992, 260:668-675.
285. Sieradzki J.: Zespół metaboliczny (Zespół X). *Diagn. Lab.* 1993, 29:247-254.
286. Smith J.A., Shah A.M., Lewis M.J.: Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol (Lond.).* 1991, 439:1-14.

287. Sneddon J.M., Vane J.R.: Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, 85:2800-2804.
288. Snyder S.H., Brecht D.S.: Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci*. 1991, 12:125-128.
289. Snyder S.H., Brecht D.S.: Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 1992, 266:68-71.
290. Sprengers E.D., Jansen B.G.A.: A fast plasminogen activator inhibitor from human blood platelets. *Thromb Haemost*. 1985, 54:277.
291. Srivatsa S.S., Pollock J.S., Edwards W.D., Simari R.D., Schwartz R.S.: Nitric oxide synthase is prominently expressed in neointimal hyperplasia following experimental vascular injury. American Heart Association, Dallas, Texas. 1994, abstract 1603.
292. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R., Loscalzo J.: Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89:7674-7677.
293. Stamler J.S., Osborne J.A., Jaraki O., Rabbani L.E., Mullins M., Singel D., Loscalzo J.: Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993, 91:308-318.
294. Stamler J.S., Loh E., Roddy M.A., Currie K., Creager M.: Nitric oxide regulates systemic arterial blood pressure and pulmonary vascular tone in normal subjects. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994, Portland Press, London, p.:447.
295. Stampfer M.J., Colditz G.A.: Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med*. 1991, 20:47-63.
296. Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., Nathan C.F.: Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88:7773-7777.
297. Stuehr D.J., Faschun O.A., Kwon N.S.: Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J*. 1991, 5:98-103.
298. Stuehr D.J., Griffith O.W.: Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Related Areas Mol Biol*. 1992, 656:287-346.
299. Stuehr D.J., Marletta M.A.: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . *J Immunol*. 1987, 139:518-525.
300. Stuehr D.J., Nathan C.F.: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. 1989, 169:1543-1555.
301. Sturrock N.D.C., Lang C.C., MacFarlane L.J., Dockrell E.C., Ryan M., Webb D.J., Struthers A.D.: Serial changes in blood pressure, renal function, endothelin and lipoprotein (a) during the first 9 days of cyclosporin therapy in males. *J Hypertens*. 1995, 13:667-673.
302. Sufferendini A.F., Fromm R.E., Parker M.M.: The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Eng J Med*. 1989, 321:280-287.
303. Suzuki H., Ikenaga H., Hishikawa K., Nakaki T., Kato R., Saruta T.: Increases in NO₂ /NO₃- excretion in the urine as an indicator of the release of endothelium-derived relaxing factor during elevation of blood pressure. *Clin Sci*. 1992, 82:631-634.

304. Tanaka K., Gotoh F., Gomi S., Takashima S., Mihara B., Shirai I.: Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Lett.* 1991, 127:129-132.
305. Tanner F.C., Noll G., Boulanger C.M., Luscher T.F.: Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide [see comments]. *Circulation.* 1991, 83:2012-2020.
306. Tayeh M.A., Marletta M.A.: tetrahydrobiopterin is required for the oxidation of arginine to nitric oxide by macrophages. *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System* (Moncada S, Higgs E.A. eds) Elsevier Excerpta Medica, Amsterdam. 1990, 257-265.
307. Thiemermann C., Vane J.: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1990, 182: 591-595.
308. Thomas G., Mostaghim R., Ramwell P.W.: Endothelium dependent vascular relaxation by arginine containing polypeptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986, 141:446-451.
309. Thompson M.E., Shapiro A.P., Johnsen A.M.: New onset of hypertension following cardiac transplantation: a preliminary report and analysis. *Transplant Proc.* 1983, 15(suppl 1):2573-2577.
310. Toda N., Okamura T.: Mechanism underlying the response to vasodilation nerve stimulation in isolated dog and monkey cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1990, 259:H1511-H1517.
311. Treasure C., Klein J.L., Weintraub W.S.: Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1995, 332:481-487.
312. Utsumi M., Makimura H., Ishihara K., Morita S., Baba S.: Determination of immunoreactive somatostatin in rat plasma and responses to arginine, glucose and glucagon infusion. *Diabetologia.* 1979, 17:319-323.
313. Vallance P., Collier J., Moncada S.: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989, 2:997-1000.
314. Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moncada S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992, 339:572-575.
315. Vallance P., Collier J.: Znaczenie biologiczne i kliniczne tlenku azotu. *Br Med J* (wydanie polskie specjalne) Trzeci Międzynarodowy Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą oraz Sekcji Badań nad Miażdżycą Polskiego Towarzystwa Angiologicznego: "Postępy w badaniach naukowych, diagnostyce i terapii miażdżycy". Kraków 5-8 października 1995, 25-30.
316. Vane J.R., Ånggård E.E., Botting R.M.: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990, 323:27-36.
317. Vanhoutte P.M.: Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxing factor by aggregating platelets. *Eur Heart J.* 1991, 12(suppl.):25-32.
318. Varani J., Fligiel S.E.G., Till G.O., Kunkel R.G., Ryan U.S., Ward P.A.: Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophil: possible involvement of hydroxyl radical. *Lab Invest.* 1985, 53:656-663.
319. Vekshtein V.I., Yeung A.C., Vita J.A., Nabel E.G., Fish R.D., Bittl J.A., Selwyn A.P., Ganz P.: Fish oil improves endothelium-dependent relaxation in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1989, 80(suppl II):434.

320. Verbeuren T.J., Jordaens F.H., Zonnekeyn L.L., Van Hove C.E., Coene M.C., Herman A.G.: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res.* 1986, 58:552-564.
321. Vidal M.J., Romero J.C., Vanhoutte P.M.: Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol.* 1988, 149:401-402.
322. Wall R.T., Harlan J.M., Harker L.A., Striker G.E.: Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro a model for the study of vascular injury. *Thromb Res.* 1980, 18:113-121.
323. Waters D.D.: Stabilisation of coronary atherosclerosis. Science Press Ltd London. 1994, 134-135.
324. Weber M.A., Smith D.H.G., Neutel J.M., Graettinger W.F.: Cardiovascular and metabolic characteristics of hypertension. *Am J Med.* 1991, 91:4S-10S.
325. Weir G.C., Samols E., Loo S., Patel Y.C., Gabbay K.H.: Somatostatin and pancreatic polypeptide secretion: Effects of glucagon, insulin and arginine. *Diabetes.* 1979, 28:35-40.
326. Weiss S.J., Young J., LoBugilo A.F., Slivka A., Nimeh N.F.: Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest.* 1981, 68:714-720.
327. Wennmalm A., Benthin G., Jungersten L., Edlund A., Petersson A.S.: Nitric oxide formation in man as reflected by plasma levels of nitrate, with special focus on kinetics, confounding factors, and response to immunological challenge. *The Biology of Nitric Oxide. 3 Physiological and Clinical Aspects*, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:474-475.
328. Wiemer G., Schölkens B.A., Becker R.H.A., Busse R.: Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension.* 1991, 18:558-563.
329. Williams S.B., Cusco J.A., Roddy M.A., Johnstone M.T., Creager M.A.: Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in Non-Insulin-Dependent Diabetes. *AHA abstracts.* 1994 (2763).
330. Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M.: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* 1991, 254:1001-1003.
331. Wisseman C.L.J., Waddell A.: Interferon like factors from antigen- and mitogen-stimulated human leukocytes with antirickettsial and cytolytic actions on *Rickettsia prowazekii*. Infected human endothelial cells, fibroblasts and macrophages. *J Exp Med.* 1983, 157:1780-1793.
332. Witzum J.L., Steinberg D.: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1990, 144:2343-2350.
333. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell. *Nature.* 1988, 332:411-415.
334. Yokoyama M., Hirata K., Miyake R., Akita H., Ishikawa Y., Fakazuki H.: Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, 168:301-308.
335. Yoshizumi M., Perrella M.A., Burnett J.C., Lee M.N.: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life.
336. Zembowicz A., Hatchett R.J., Radziszewski W., Jakubowski A.M., Gryglewski R.J.: Ebselen: a novel, irreversible inhibitor of nitric oxide synthase targeting an essential thiol of the enzyme. *The*

Biology of Nitric Oxide. 4 Enzymology, Biochemistry and Immunology, editors: Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A. 1994 Portland Press, London, p.:11-14.

337. Zhang J., Su Y., Oury T.D., Piantadosi C.A.: Cerebral amino acid, norepinephrine and nitric oxide metabolism in CNS oxygen toxicity. Brain Res. 1993, 606:56-62.