



**Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski**

**Andrzej Jopek**

**Doświadczalna ocena funkcji śródbłonna  
w samoistnym nadciśnieniu tętniczym.**

**Rozprawa doktorska**

Promotor: Prof.dr hab.n.med. Ryszard Korbut

Katedra Farmakologii CMUJ  
Kierownik: Prof.dr hab.n.med. Ryszard Korbut

Kraków 2007

*Składam serdeczne podziękowania  
Panu Profesorowi Ryszardowi Korbutowi  
za cenne wskazówki i pomoc w realizacji pracy*

*Wyrazy wdzięczności składam również  
Pani Profesor Teresie Adamek-Guzik  
i mojemu koledze Tomaszowi Guzikowi  
za wprowadzenie mnie w „świat nauki”*

<b>I. WSTĘP.....</b>	<b>8</b>
I.1. Śródbłonek naczyniowy.....	8
I.1.1. Funkcja śródbłonka w utrzymaniu homeostazy naczyniowej.....	8
I.1.1.1. Tlenek azotu (NO).....	9
I.1.1.2. Prostacyklina (PGI <sub>2</sub> ).....	12
I.1.1.3. Śródbłonkowo-zależny czynnik hiperpolaryzujący. (EDHF).....	13
I.2. Dysfunkcja śródbłonka.....	13
I.2.1. Znaczenie dysfunkcji śródbłonka.....	14
I.2.2. Udział stresu oksydacyjnego w dysfunkcji śródbłonka.....	15
I.2.2.1. Pojęcie stresu oksydacyjnego.....	15
I.2.2.2. Źródła wolnych rodników tlenowych w naczyniach krwionośnych.....	16
I.2.2.3. Naczyniowe oksydazy NAD(P)H.....	16
I.2.2.4. Rola stresu oksydacyjnego w patofizjologii naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska dysfunkcji śródbłonka.....	18
I.3. Dysfunkcja śródbłonka w nadciśnieniu tętniczym.....	20
I.3.1. Pojęcie i rodzaje nadciśnienia tętniczego.....	20
I.3.1.1. Budowa i funkcja naczyń w nadciśnieniu tętniczym.....	20
I.3.2. Modele zwierzęce nadciśnienia.....	22
I.3.2.1. Szczury z nadciśnieniem samoistnym typu SHR.....	23
I.3.3. Nadciśnienie tętnicze u pacjentów operowanych metodą pomostowania tętnic wieńcowych.....	24
I.4. Dysfunkcja śródbłonka a nadciśnienie tętnicze.....	26
<b>II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY.....</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIAŁY I METODY.....</b>	<b>34</b>
III.1. Materiały.....	34
III.1.1. Materiały biologiczne.....	34
III.1.1.1. Ludzkie naczynia krwionośne.....	34
III.1.1.1.a. Żyły odpiszczelowe.....	34
III.1.1.1.b. Tętnice piersiowe wewnętrzne.....	34
III.1.1.2. Aorty szczurze.....	35
III.1.2. Leki i odczynniki.....	36
III. 2. Metody.....	36

III.2.1. Badania na izolowanych naczyniach.....	36
III.2.2. Pomiary produkcji anionu nadadtlenkowego.....	40
III.2.3. Analiza statystyczna.....	43
<b>IV. WYNIKI.....</b>	<b>44</b>
IV.1. Określenie źródeł i znaczenia czynnościowego anionu nadadtlenkowego w aortach uzyskanych od szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym i od szczurów normotensyjnych.....	44
IV.1.1. Charakterystyka szczurów biorących udział w doświadczeniach.....	44
IV.1.2. Produkcja anionu nadadtlenkowego w aortach szczurzych.....	45
IV.1.2.1. Źródła anionu nadadtlenkowego w aortach szczurzych.....	47
IV.1.2.2. Produkcja anionu nadadtlenkowego w warunkach stresu oksydacyjnego.....	48
IV.1.2.3. Źródła anionu nadadtlenkowego w aortach szczurzych, w warunkach stresu oksydacyjnego.....	50
IV.1.3 Reakcje naczyniowe w odpowiedzi na stres oksydacyjny badane w aortach zwierząt z nadciśnieniem tętniczym.....	53
IV.1.3.1 Ocena reakcji naczyniowych w tętnicach przed podaniem NAD(P)H.....	53
IV.1.3.2 Ocena reakcji tętnic na stres oksydacyjny.....	56
IV.1.4. Wpływ wieku zwierząt na odpowiedzi naczyniowe w modelu samoistnego nadciśnienia tętniczego.....	62
IV.2. Określenie źródeł i znaczenia produkcji anionu nadadtlenkowego w naczyniach ludzkich.....	64
IV.2.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów biorących udział w doświadczeniach.....	64
IV.2.2. Produkcja anionu nadadtlenkowego w naczyniach ludzkich.....	66
IV.2.2.1. Źródła anionu nadadtlenkowego w naczyniach ludzkich.....	67
IV.2.2.2. Produkcja anionu nadadtlenkowego w warunkach stresu oksydacyjnego.....	70
IV.2.2.3. Źródła anionu nadadtlenkowego w naczyniach ludzkich podczas stresu oksydacyjnego.....	72
IV.2.3 Ocena stopnia dysfunkcji śródbłonna w tętnicach piersiowych wewnętrznych oraz żyłach odpiszczelowych.....	74

IV.2.4 Badanie reakcji naczyń ludzkich na doświadczalny stres oksydacyjny.....	76
IV.3 Ocena odpowiedzi naczyń ludzkich na powszechnie stosowane antyoksydanty – wpływ dysfunkcji śródbłonna.....	81
IV.3.1. Współzależność stopnia uszkodzenia śródbłonna i naczyń i efektów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD).....	82
IV.3.2. Współzależność stopnia uszkodzenia śródbłonna i naczyń i efektów N-acetylocysteiny.....	83
IV.4. Związki współzależności pomiędzy dysfunkcją śródbłonna a stresem oksydacyjnym i aktywnością NAD(P)H oksydazy.....	94
IV.5. Czynniki ryzyka miażdżycy a funkcja śródbłonna i produkcja anionu ponadtlenkowego.....	98
<b>V. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....</b>	<b>103</b>
<b>VI. Dyskusja.....</b>	<b>106</b>
VI.1. Badania naczyń od szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym.....	106
VI.1.1. Generacja anionów ponadtlenkowych w warunkach podstawowych.....	106
VI.1.2. Generacja anionów ponadtlenkowych w warunkach aktywacji (stres oksydacyjny).....	107
VI.1.3. Reakcje naczynioruchowe in vitro w samoistnym nadciśnieniu tętniczym.....	109
VI.1.4. Wpływ wieku zwierząt na odpowiedzi naczyniowe w modelu samoistnego nadciśnienia tętniczego.....	112
VI.2. Badania naczyń ludzkich.....	113
VI.2.1. Produkcja podstawowa anionów ponadtlenkowych w naczyniach ludzkich.....	113
VI.2.2. Produkcja ponadtlenków w warunkach aktywacji (stres oksydacyjny).....	114
VI.2.3. Badanie odpowiedzi naczynioruchowych naczyń ludzkich.....	115
VI.3. Przeciwtleniacze w badaniach naczyń in vitro .....	117
VI.4. Współzależność pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H a produkcją ponadtlenków i dysfunkcją śródbłonna.....	121
VI.5. Czynniki ryzyka miażdżycy a funkcja śródbłonna i produkcja ponadtlenków.....	123
VI.6. Nadciśnienie tętnicze a stopień dysfunkcji śródbłonna - porównanie	

wyników w naczyniach szczurzych i ludzkich.....	125
<b>VII. WNIOSKI.....</b>	<b>128</b>
<b>VIII. STRESZCZENIE.....</b>	<b>129</b>
<b>IX. SUMMARY.....</b>	<b>131</b>
<b>X. SPIS SKRÓTÓW.....</b>	<b>133</b>
<b>XI. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>135</b>

# I. WSTĘP

## I.1. Śródbłonek naczyniowy

### I.1.1. Funkcja śródbłonka w utrzymaniu homeostazy naczyniowej

Śródbłonek naczyniowy, stanowiący pojedynczą warstwę komórek, wyścielającą każde naczynie krwionośne, odgrywa zasadniczą rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej. Z jednej strony tworzy barierę filtracyjną naczyń włosowatych, odpowiedzialną za prawidłowe odżywianie i oczyszczanie z produktów przemiany materii wszystkich tkanek ustroju. Z drugiej (i to stanowi o jego wyjątkowym znaczeniu w utrzymaniu homeostazy naczyniowej) wytwarza substancje o charakterze hormonów tkankowych (Tab.1), które decydują o średnicy, przebudowie oraz hemostazie naczyń krwionośnych(1,2,3,4).

1	Czynniki naczyniorozszerzające	NO, prostacyklina (PGI <sub>2</sub> ) śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF), bradykinina, adrenomodulina, natriuretyczny peptyd C
2	Czynniki naczyniozężające	endotelina 1, angiotensyna II, tromboksan A <sub>2</sub> , wolne rodniki, prostaglandyna H <sub>2</sub>
3	Czynniki przeciwprzerostowe	NO, prostacyklina (PGI <sub>2</sub> ) , tranformujący czynnik wzrostu β (TGF β), siarczan heparanu
4	Czynniki sprzyjające rozrostowi	endotelina 1, angiotensyna II, wolne rodniki, płytkopochodny czynnik wzrostu, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, insulinopodobny czynnik wzrostu, interleukiny
5	Czynniki przeciwzakrzepowe	NO, prostacyklina (PGI <sub>2</sub> ), aktywator plazminogenu, białko C, inhibitor czynnika tkankowego, czynnik von Willebrandta
6	Czynniki sprzyjające zakrzepom	endotelina 1, wolne rodniki, PAI-1, tromboksan A <sub>2</sub> , fibrynogen , czynniki tkankowe



7	Markery stanu zapalnego	CAMs (P i E selektyny, ICAM, VCAM), chemokiny, czynnik jądrowy $\kappa$ - $\beta$
8	Przepuszczalność	Receptor dla zaawansowanych produktów końcowych glikozylacji
9	Angiogeneza	śródbłonkowy naczyniowy czynnik wzrostu

Tab.1 Substancje uwalniane ze śródbłonka autokrynnie i parakrynnie (1).

Z wyżej wymienionych substancji na szczególną uwagę, ze względu na ich wielotorowe działanie protekcyjne w stosunku do patologicznej przebudowy naczyń krwionośnych, zasługują: tlenek azotu, prostacyklina oraz śródbłonkowo-zależny czynnik hiperpolaryzujący.

#### I.1.1.1. Tlenek azotu (NO)

Odkryty w 1980 roku przez Furchotta i Zawadzkiego związek rozszerzający naczynia krwionośne (EDRF) (5) został w kilka lat później określony jako tlenek azotu (NO) (6). Od tej pory szereg badań potwierdził wyjątkową rolę tej cząsteczki w fizjologii i patofizjologii organizmów żywych, zapewniając jej już dzisiaj (czyli w około 25 lat od jej odkrycia) naczelną rolę w biologii naczyń krwionośnych.

Tlenek azotu jest w organizmie produkowany z zasadowego aminokwasu L-argininy przez grupę izoenzymów zwanych syntazami NO (tzw. NOS). NOS jest dioksygenazą wymagającą do prawidłowego funkcjonowania formy dimerycznej złożonej z enzymu, substratu l-argininy i kofaktora tetrahydrobiopteryny (7,8). W sytuacji niespełnienia jednego z tych warunków NOS zaczyna funkcjonować jak reduktaza, redukując cząsteczkę tlenu do anionu nadtlenkowego (tzw. efekt rozprężenia syntazy) (9,10,11,12). Ten ostatni reaguje z wolnorodnikowym tlenkiem azotu, w wyniku czego powstaje toksyczny nadadtlenoazotyn. Produkty rozpadu nadadtlenoazotynu mają działanie rakotwórcze. On sam zaś uszkadza DNA, utlenia LDL, prowadzi do powstania izoprostanów, hamuje akonitazę oraz upośledza funkcję poly-ADP-rybozo-syntazy, doprowadzając do dezorganizacji komórki i w rezultacie jej śmierci (13,14,15,16).

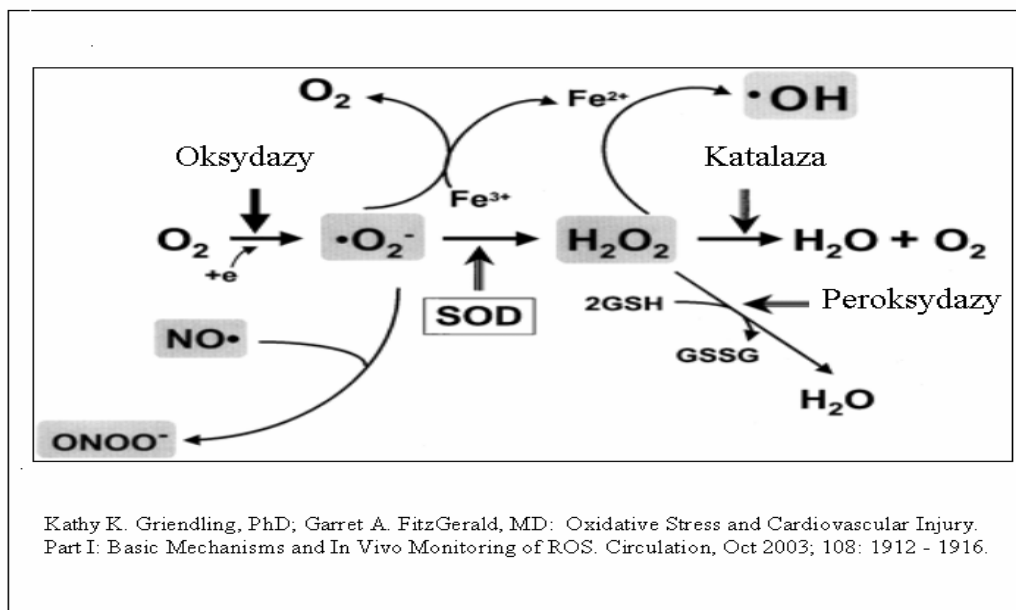
Występują trzy izoformy NOS: dwie z nich to formy konstytutywne jak neuronalna NOS (NOS1, nNOS) i śródbłonkowa NOS (NOS3, eNOS). Jedną stanowi forma indukowalna, tj. indukowalna NOS (NOS2, iNOS) (7,17,18). Enzymy konstytutywne wymagają do swej aktywacji jonów wapnia, których stężenie w komórce narasta na skutek pobudzenia: w przypadku nNOS receptorów NMDA w układzie nerwowym, a w przypadku eNOS poprzez pobudzenie śródbłonkowych receptorów muskarynowych, purynergicznym, kininowym, trombinowym oraz wpływ sił tarcia związanych z przepływem krwi (17,19). Aktywacja indukowalnej formy NOS nie wymaga obecności jonów wapnia. Dokonuje się pod wpływem czynników prozapalnych (IFN-gamma, TNF- $\alpha$ , IL-1, lipopolisacharyd (LPS)) i występuje w komórkach odpowiedzi zapalnej (makrofagi, monocyty, neutrofile). Wszystkie izoformy syntazy NO możemy spotkać w naczyniach krwionośnych. O ile obecność śródbłonkowej NOS jest powszechna w komórkach śródbłonka, o tyle występowanie indukowalnej NOS wymaga obecności w naczyniach komórek zapalnych. Neuronalną NOS odnaleziono na razie jedynie w kardiomiocytach oraz w miejscach zakończeń nerwowych NANC (nie-adrenergicznych i nie-acetylocholinergicznym).

Cechą wspólną wszystkich izoform NOS jest powstanie w trakcie ich aktywacji tlenku azotu (NO). NO jako mała obojętna cząsteczka może bezpiecznie dyfundować do sąsiadujących tkanek, działając nie tylko autokrynnie, ale również parakrynnie. Dlatego tlenek azotu, fizjologicznie produkowany w komórkach śródbłonka, może powodować rozszerzenie naczyń poprzez dyfuzję do sąsiadujących ze śródbłonkiem komórek mięśniówki gładkiej. Tlenek azotu (NO) we wszystkich komórkach działa poprzez aktywację cykazy guanylowej, w wyniku której dochodzi do powstania cyklicznego GMP (cGMP) (13). Wzrost komórkowego poziomu cGMP prowadzi bezpośrednio do aktywacji kinazy białkowej G (PKG). Za pośrednictwem cGMP tlenek azotu zwiększa perfuzję tkankową oraz zmniejsza opory naczyniowe (poprzez rozkurcz mięśniówki gładkiej) (3,13).

Tlenek azotu wykazuje działanie kardioprotekcyjne, przeciwprzerostowe (zahamowanie produkcji kolagenu) i antyproliferacyjne (hamowanie mitoz). Ponadto pobudza apoptozę miocytów. Produkowany w śródbłonku i w płytkach krwi NO hamuje przyleganie płytek i ich agregację.

Podstawową kwestią dla prawidłowego funkcjonowania śródbłonka i całych naczyń krwionośnych wydaje się równowaga w powstawaniu tlenku azotu i jego naturalnego antagonisty tj. anionu ponadtlenkowego (zestaw przemian zachodzących

między tlenkiem azotu, anionem nadtlenkowym i nadtlenkiem wodoru przedstawia rycina 1).



Ryc.1. Zakres wzajemnych relacji pomiędzy głównymi „rywalami” walki o zdrowe naczynie. NO – tlenek azotu,  $O_2^-$  - anion nadtlenkowy,  $H_2O_2$  – nadtlenek wodoru,  $ONOO^-$  – anion podtenoazotynu, SOD - dysmutaza nadtlenkowa.

Tlenek azotu jest wychwytywany i unieczynniany we krwi przez hemoglobinę oraz osoczowy kompleks haptoglobina-hemoglobina (20). Indukowalna forma NOS jest hamowana poprzez glukokortykosteroidy. Wszystkie formy NOS są kompetytywne hamowane poprzez analogi L-argininy jak L-N-monometyloarginina (L-NMMA), L-N-nitroarginina (L-NNA) oraz jej metylowy ester (L-NAME). Związki te poprzez swoje niespecyficzne działanie (oprócz pożądanego zahamowania iNOS powodują także szkodliwe zahamowanie eNOS) nie znalazły jak dotychczas zastosowania w klinice chorób przebiegających z nadmierną aktywacją iNOS (wstrząs septyczny). Spełniają jednak istotną rolę w laboratoryjnych oraz klinicznych badaniach naukowych. Co ciekawe istnieją w organizmie związki pokrewne stanowiące endogenne inhibitory NOS. W mózgu, wątrobie, nerkach i śródbłonku stwierdzono obecność L-dimetyloargininy (L-DMA), która może występować w dwóch postaciach: symetrycznej L-SDMA i asymetrycznej L-ADMA. Wykazano, że asymetryczna cząsteczka analogu argininy jest endogennym inhibitorem NOS, którego osoczowe stężenie koreluje ujemnie z NO zależnym rozkurczem naczyniowym. Istnieje szereg badań dowodzących zwiększony

poziom ADMA we krwi pacjentów z czynnikami ryzyka choroby miażdżycowej (21,22,23,24).

#### I.1.1.2. Prostacyklina (PGI<sub>2</sub>)

Istnieje polski wątek w odkrywaniu znaczenia śróbłonkowej regulacji homeostazy naczyniowej. Dzięki pracy zespołu wybitnych naukowców (w tym Ryszarda Gryglewskiego) odkryto związek mający podobnie jak tlenek azotu fundamentalne znaczenie w zachowaniu homeostazy naczyniowej - prostacyklinę (25). Substancja ta, będąca jednym z produktów kaskady kwasu arachidonowego, powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych na skutek wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP (receptor IP). Innymi fizjologicznie istotnymi funkcjami prostacykliny są jej działania: fibrynolityczne, supresyjne w stosunku do leukocytów oraz cytoprotekcyjne. (26).

Istnieją możliwości sztucznego zablokowania produkcji prostanoidów za pomocą nieodwracalnych blokerów cyklooksygenazy. Związki te stanowią bodajże najbardziej liczną grupę leków stosowanych w klinice (niesteroidowe leki przeciwzapalne). Wyróżniają się one między sobą długością działania, występowaniem działań niepożądanych, skutecznością w leczeniu poszczególnych schorzeń, ale wszystkie operują w ten sam sposób: hamując cyklooksygenazę.

Ostatnie lata przynoszą informacje, o istnieniu co najmniej trzech izoform cyklooksygenazy (27). Analiza ich funkcji oraz występowania dostarczyła istotnych klinicznie wiadomości. Okazało się, że za fizjologiczną odpowiedź naczyniową, nerkową czy żołądkową organizmu odpowiadają produkty stymulacji konstytutywnej cyklooksygenazy 1 (COX-1). Nasiloną produkcją prostanoidów, zachodzącą w warunkach stanu zapalnego, a wywołaną stymulacją indukowalnej formy cyklooksygenazy 2 (COX-2), odpowiada za większość niekorzystnych, prozapalnych działań tych związków - nadmierne rozszerzenie oraz wzrost przepuszczalności naczyń, potęgowanie działania mediatorów bólowych i prozapalnych. Potrzeba zatem wybiórczego zahamowania COX2 bez ograniczenia aktywności jej konstytutywnego odpowiednika. Istnieją dzisiaj leki spełniające takie założenie (koksyby). Do niedawna wydawało się, że otwierają one perspektywy bezpiecznego kontrolowania przewlekłych chorób zapalnych. Doświadczenia z Rofekoksybem (wykazano, że długotrwałe

zażywanie tego preparatu znamienne zwiększa ryzyko występowania ostrych incydentów sercowych) każą wątpić w bliżej określony przełom w terapii chorób reumatycznych, jednocześnie wskazując na niedocenioną dotychczas rolę COX-2 w utrzymaniu homeostazy naczyniowej.

#### I.1.1.3. Śródbłonkowo-zależny czynnik hiperpolaryzujący (EDHF)

„Najmłodszy” związek z grupy śródbłonkowo-zależnych czynników rozszerzających naczynia kryje przed nami jeszcze wiele tajemnic. Niejasna jest nawet jego natura. Większość dostępnych źródeł wskazuje, że czynnikiem tym może być nadtlenek wodoru. (28,29,30). Inne doniesienia upatrują EDHF w peptydzie natriuretycznym C (CNP) (31).

### I.2. Dysfunkcja śródbłonka

Dysfunkcja śródbłonka to ubytek jakiegokolwiek z jego funkcji, z odczynową dekompensacją naczynia. Dla celów praktycznych dysfunkcję śródbłonka definiuje się jako upośledzenie rozkurczów naczyniowych wynikające z niedoboru tlenu azotu (1,2). Samo pojęcie nie ogranicza się jednak do występowania lub braku tej biologicznie czynnej cząsteczki. Wielu autorów donosi o pozytywnej ocenie funkcji śródbłonka za pomocą innych związków (ADMA (21,22,23,24), prostacyklina (32), anion ponadtlenkowy(33), czynnik von Willebrandta (34), endotelina-1 (35), selektyny, adhezyny (36), białko CRP (36,37,38). Ciągły rozwój diagnostycznych metod laboratoryjnych pozwala mieć nadzieję na szybkie rozszerzenie dostępnych metod stwierdzania upośledzonej funkcji śródbłonka (być może bardziej czułych od niedoboru tlenu azotu).

W przedstawionej pracy jako wyznacznik funkcji śródbłonka w naczyniach ludzkich przyjęto poziom rozszerzenia się naczyń w odpowiedzi na wzrastające dawki acetylocholino (acetylocholina działa poprzez uwalnianie tlenu azotu). W przypadku naczyń szczurzych dotychczasowe publikacje niejednoznacznie oceniają możliwości

diagnozowania dysfunkcji śródbłonna za pomocą acetylocholiny (patrz rozdział I.IV.) Dlatego, pragnąc bardziej jednoznacznie ocenić funkcję śródbłonna (jeden z celów niniejszej pracy), próbowano opracować metodę wykorzystującą pomiar aktywności oksydazy NAD(P)H w naczyniach szczurzych.

### I.2.1. Znaczenie dysfunkcji śródbłonna

Dysfunkcję śródbłonna zdiagnozowano i opisano w typowych chorobach układu krążenia – w miażdżycy, nadciśnieniu systemowym i płucnym, niewydolności krążenia, ale także w ARDS, cukrzycy, reumatoidalnym zapaleniu stawów, rzucawce, zespole Stein-Leventhala, anemii sierpowatej, neuropatii jaskrowej czy niewydolności nerek (1,39,40,41). Ponadto patologię tę podejrzewa się w przypadku wielu innych chorób. Co więcej, przynajmniej jeśli chodzi o choroby z kręgu miażdżycowych, dysfunkcja śródbłonna wyprzedza, na długo przedtem, morfologicznie zmiany naczyniowe (42). Częstotliwość występowania poważnych incydentów kardiologicznych (w tym zawał, PTCA, CABG, udar, rewaskularyzacja naczyń obwodowych) była istotnie wyższa u pacjentów, u których 10 lat wcześniej wykryto paradoksalną, kurczącą odpowiedź na dowieńcowe podanie acetylocholiny (zabieg polegał na angiograficznym pomiarze tętnic wieńcowych w odpowiedzi na podanie acetylocholiny) (42). Przeprowadzone ostatnio badania prospektywne wykazały, że dysfunkcja śródbłonna jest silnym, niezależnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia ostrych incydentów sercowych (43,44). Co więcej, wielokrotnie zaobserwowano zależność nasilenia stopnia dysfunkcji śródbłonna od ilości czynników ryzyka choroby miażdżycowej (1,42,45,46,47).

Istnieją leki o udowodnionym działaniu terapeutycznym, korygującym dysfunkcję śródbłonna. Należą do nich: inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE-I) oraz inhibitory reduktazy HMG-CoA (statyny) (48,49,50,51).

Należy zauważyć, że niektóre prace nakazują bardziej ostrożną ocenę rzeczywistej roli terapii śródbłonna w uzyskiwanych efektach klinicznych. Autorzy ich przekonują, że wyniki dotychczasowych eksperymentów bywają sprzeczne. Ponadto brak leków o udowodnionym wybiórczym działaniu mającym odwracać dysfunkcję śródbłonna. Zatem skuteczność terapii lekami o udowodnionym, dodatkowym działaniu

śródbłonkowo-protekcynym może wynikać z ich podstawowego, niezależnego od śródbłonka, działania (52).

## I.2.2. Udział stresu oksydacyjnego w dysfunkcji śródbłonka

### I.2.2.1. Pojęcie stresu oksydacyjnego

Obecność związków o charakterze utleniaczy i przeciwnie działających do nich substancji determinuje powstanie odpowiedniego potencjału oksydoredukcyjnego w tkankach. Stres oksydacyjny nazywamy stan zaburzonej równowagi pomiędzy substancjami silnie utleniającymi a ich biologicznymi antagonistami, z wyraźną przewagą aktywności tych pierwszych (53), co powoduje upośledzenie prawidłowego potencjału oksydacyjnego.

Stres oksydacyjny wywołuje w komórkach szereg zaburzeń metabolicznych: obniżenie stężenia ATP, peroksydację lipidów, wzrost przepuszczalności błon (zahamowanie kanału K<sup>+</sup>), zmianę morfologii błon, zmniejszenie odkształcalności erytrocytów, zahamowanie syntezy NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>, uszkodzenie DNA, inaktywację enzymów (np. akonitazy, dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej). Wszystkie one powodują trwałe uszkodzenia wewnątrzkomórkowe i w rezultacie śmierć komórek.

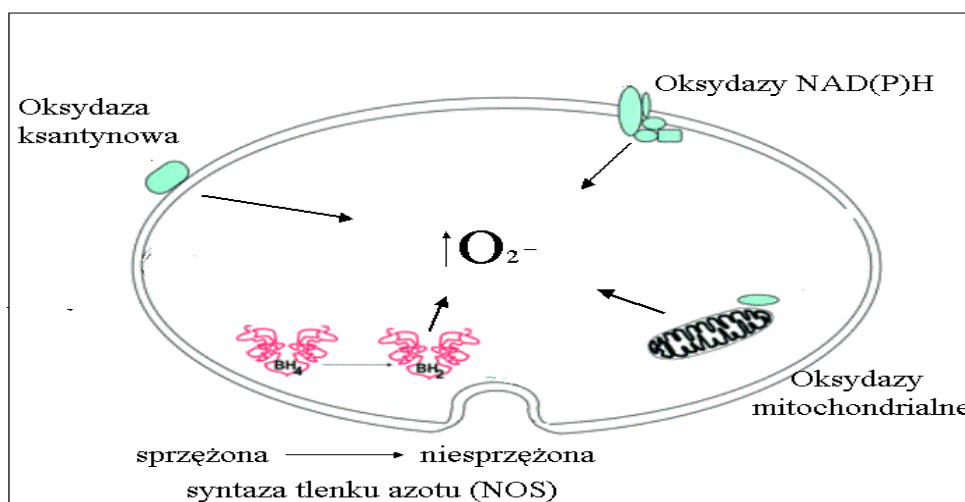
Istnieją w organizmie mechanizmy zapobiegające występowaniu stresu oksydacyjnego. Wywołują je: substancje, które po połączeniu z aktywnymi wolnymi rodnikami tlenowymi eliminują je ze środowiska (czasami z wytworzeniem bardziej lub mniej reaktywnych pochodnych) oraz enzymy, które takie reakcje katalizują. Do pierwszej grupy, czyli do antyoksydantów należą glutation, tlenek azotu, kwas askorbinowy, tokoferol. Do drugiej zaś dysmutaza ponadtlenkowa (katalizująca reakcje anionu ponadtlenkowego z wodą z wytworzeniem nadtlenku wodoru) oraz szereg różnych peroksydaz (53).

Zestaw przemian zachodzących pomiędzy tlenkiem azotu, anionem ponadtlenkowym i wodą utlenioną przedstawia rycina 1.

### I.2.2.2. Źródła wolnych rodników tlenowych w naczyniach krwionośnych

Źródłem wolnych rodników w naczyniach krwionośnych mogą być z jednej strony łańcuch transportu elektronowego w mitochondriach, z drugiej zaś enzymy: lipo i cyklooksygenaza, cytochrom P450, oksydaza ksantynowa, NADPH oksydazy, syntazy tlenku azotu, peroksydazy i inne hemoproteiny (54). Jednoelektronowa redukcja tlenu prowadzi do powstania anionu nadadtlenkowego, który jest podstawowym prekursorem innych wolnych rodników.

Chociaż każdy z wyżej wspomnianych enzymów może produkować wolne rodniki w ścianie naczyniowej, jest ogólnie przyjęte, że NADPH oksydazy są podstawowym źródłem wolnych rodników. Część autorów uważa za równie ważne w produkcji wolnych rodników: oksydazę ksantynową i „niesprzężoną” syntazę tlenku azotu (NOS) (54,55). Ryc.2.



Ryc. 2. Udział komórkowych struktur enzymatycznych w naczyniowej produkcji anionu nadadtlenkowego.

### I.2.2.3. Naczyniowe oksydazy NAD(P)H.

Początkowo struktura i funkcja oksydazy NADPH została zbadana i opisana w neutrofilach. Wykazano tam, że zbudowana jest ona z dwóch błonowych (p22phox i gp91phox) oraz kilku cytoplazmatycznych podjednostek (p47phox, p40phox, p67phox,



małego białka GTP-przyłączającego Rac). O aktywacji NADPH oksydazy i następczej produkcji anionu nadtlenkowego decyduje przyłączenie się cytoplazmatycznych podjednostek do ich odpowiedników błonowych.

Wiele z komponentów neutrofilowej oksydazy w tym p22phox, p47phox, p40phox, gp91phox i Rac są obecne w śródbłonku i w komórkach mięśniówki naczyń (56,57,58). Ponadto podjednostka p67phox została odnaleziona w fibroblastach aorty (59).

Naczyniowe NADPH oksydazy pomimo podobnej budowy strukturalnej różnią się od swoich odpowiedników neutrofilowych. Neutrofilowa oksydaza uwalnia ogromną ilość  $O_2^-$  w postaci jednokrotnego wybuchu tlenowego, podczas gdy naczyniowa forma stale produkuje niskie stężenia anionu nadtlenkowego.

Aktywność oksydaz NADPH może być modulowana przez naczyniowoaktywne hormony i niskiej wagi cząsteczkowej białka G (rac-1) (60). Angiotensyna II, TNF alfa, trombina i płytkowy czynnik wzrostu zwiększają aktywność NADPH oksydaz oraz produkcję  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  w mięśniówce gładkiej naczyń. Siły fizyczne, włączając w to rozciąganie, siły tarcia, zaburzenia oscylacji przepływu zachodzące w rozgałęzieniach naczyń, są również potencjalnym aktywatorem produkcji  $O_2^-$  w komórkach śródbłonka. Szczególnie oktapeptyd angiotensyna II jest ważnym stymulantem aktywności tej oksydazy.

Aktywacja NADPH oksydazy przez angiotensynę II (Ang II) została po raz pierwszy zademonstrowana przez Griendling i wsp. (94). Ostatnio, kilka niezależnych grup dostarczyło informacji ukazujących, w jaki sposób działa angiotensyna II na oksydazę NAD(P)H. I tak w komórkach mięśniówki gładkiej aktywacja receptorów angiotensyny typu I prowadzi do fosforylacji p47phox. Fosforylacja ta umożliwia przyłączenie się podjednostek cytoplazmatycznych do podjednostek błonowych i aktywację oksydazy NAD(P)H. Dodatkowo, kiedy angiotensyna II jest podawana w czasie kilku dni (lub nawet kilku godzin), wzmacnia ekspresję podjednostek oksydaz NAD(P)H. Przewlekła infuzja angiotensyny II pobudza ekspresję mRNA dla p22phox w aorcie szczurów (62,63,64). W hodowlach komórkowych angiotensyna II reguluje ekspresję podjednostek NADPH oksydazy: gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox (komórki mięśniówki gładkiej izolowane z ludzkich tętnic oporowych). (56)

Wpływ wielu innych układów biochemicznych na aktywność oksydazy NAD(P)H wydaje się wynikać z ich oddziaływania na p47phox. Aktywacja fosfolipazy D (65) lub kinazy C (66) prawdopodobnie wywiera efekt na aktywność oksydazy NAD(P)H poprzez fosforylację p47phox.

#### I.2.2.4. Rola stresu oksydacyjnego w patofizjologii naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska dysfunkcji śródbłónka

Istnieje szereg mechanizmów, za pomocą których wolne rodniki przyczyniają się do powstawania patologii układu krążenia. Podstawowe znaczenie w tym zakresie ma fuzja anionu ponadtlenkowego z tlenkiem azotu (powstaje toksyczny ponadtlenoazotyn), eliminująca NO z „walki o zdrowe naczynie”.

Co ważne, anion ponadtlenkowy posiada zdolność utleniania, a w rezultacie unieczynniania tetrahydrobiopteryny. Związek ten jest niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania enzymu kofaktorem syntazy tlenku azotu. W razie jego niedoboru produkcja tlenku azotu spada, a sama syntaza wytwarza dodatkowo anion ponadtlenkowy (11,12). Reakcja ta w konsekwencji prowadzi do dalszego unieczynniania tetrahydrobiopteryny i tym samym do pogłębiania się patologii (mechanizm błędnego koła).

Możliwość biodegradacji czynnego tlenku azotu w obecności nadmiernej produkcji anionu ponadtlenkowego tłumaczy fakt często występującej w modelach dysfunkcji śródbłónka zwiększonej ekspresji syntazy tlenku azotu (67). Obserwowany wzrost produkcji NO zazwyczaj nie wystarcza do przełamania bariery, jaką stanowi ogromna ilość, uwalnianego w tych warunkach anionu ponadtlenkowego. Dochodzi zatem do paradoksalnego, sumarycznego zmniejszenia aktywnej formy tlenku azotu.

Zjawisko spadku biodostępności tlenku azotu, wtórne do nadprodukcji anionu ponadtlenkowego, było wielokrotnie opisywane w chorobach miażdżycowych u zwierząt i ludzi. Zauważono, iż eliminacja podstawowego czynnika naturalnej równowagi naczyniowej (NO) musi w konsekwencji doprowadzić poprzez jej zaburzenie do supremacji mediatorów skurczu, przebudowy, zakrzepicy czy zapalenia.

Wolne rodniki regulują kilka podstawowych klas genów, w tym czynników chemotaktycznych, cząstek adhezyjnych, enzymów antyoksydacyjnych czy czynników wazoaktywnych. I tak na przykład wzmożona produkcja cząstek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1) oraz czynników chemotaktycznych (MCP-1), zachodząca poprzez oksydacyjnie-czułe mechanizmy, może odgrywać istotną rolę w naczyniowej patologii (68). Te molekuly sprzyjają adhezji i migracji monocytów do ściany naczyniowej. W jej wyniku dochodzi do potencjalizacji niekorzystnego działania wolnych rodników. Przeciwnie działające, zależne od donorów NO, hamowanie transkrypcyjnej indukcji molekuł adhezyjnych przez cytokiny zapalne, zostaje upośledzone poprzez zmniejszoną biodostępność tlenu azotu (69), wywołaną właśnie przez wolne rodniki.

Peroksydacja lipidów i nitrowanie białek indukowane przez nadadtlenoazotyn należą do wczesnych procesów miażdżycowych. Ponieważ makrofagi uwalniają wolne rodniki zewnątrzkomórkowo, aktywują w ten sposób metaloproteinazy (MMPs) przestrzeni zewnątrzkomórkowej: MMP-2, MMP-9. Raz zaaktywowane MMPs mogą degradować zewnątrzkomórkową, opartą na kolagenie macierz, doprowadzając do osłabienia czopu włóknikowego i rozerwania/pęknięcia blaszki miażdżycowej (70).

O klinicznej doniosłości stresu oksydacyjnego w mechanizmie dysfunkcji naczyniowej mogą świadczyć doświadczenia, w których oceniano wartość prognostyczną tego zjawiska na występowanie incydentów sercowo-naczyniowych. W celu identyfikacji pacjentów o zwiększonym poziomie stresu oksydacyjnego mierzono standardowe odpowiedzi śródbłonkowe przed i po podaniu naturalnych antyoksydantów (witaminy C i  $\beta$ -karotenu). Następnie obserwowano występowanie incydentów sercowo-naczyniowych (śmierci, zawałów mięśnia sercowego, udarów niedokrwiennych) u tych pacjentów przez okres 4,5 roku. Wykazano, że dysfunkcja śródbłonka związana ze stresem oksydacyjnym jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych (33).

Ponadto badania genetyczne nad genem kodującym podjednostkę p22phox oksydazy NAD(P)H (enzymu odpowiedzialnego za nadmierną produkcję anionu nadadtlenkowego) wykazały, że w obrębie sekwencji kodującej centrum aktywne enzymu (tzw. CYBA) istnieje polimorfizm C242T, którego występowanie wiąże się ze zmniejszoną aktywnością NAD(P)H oksydazy (71). Stwierdzono, że pacjenci z chorobą niedokrwienną serca posiadający ten polimorfizm (allel 242T) mają mniej nasiloną dysfunkcję śródbłonka w obrębie tętnic wieńcowych (72).

### I.3. Dysfunkcja śródbłonna w nadciśnieniu tętniczym

#### I.3.1. Pojęcie i rodzaje nadciśnienia tętniczego

Nadciśnienie tętnicze u ludzi wyznaczają zmierzone wartości ciśnienia tętniczego: wyższe lub równe 140 mmHg dla ciśnienia skurczowego lub/i wartości wyższe lub równe 90 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego (73).

Wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje nadciśnienia tętniczego: nadciśnienie pierwotne (inaczej zwane samoistnym) i nadciśnienie wtórne. Pierwsze z nich, według różnej oceny, może występować nawet w 95% przypadków nadciśnienia tętniczego. Pomimo zastosowania wszystkich dostępnych metod diagnostycznych jego etiologii nie udaje się do końca ustalić. Aktualnie próbuje się je definiować jako złożony zespół chorobowy, w którym wskutek interakcji czynników genetycznych i środowiskowych zakłócona zostaje fizjologiczna homeostaza ustroju. Klinicznie manifestuje się to wzrostem ciśnienia krwi i najczęściej zmianami strukturalnymi w układzie sercowo-naczyniowym, zaburzeniami neurohumoralnymi, metabolicznymi oraz zaburzeniami w obrębie nerek (74). W chwili, kiedy możliwym jest jednoznaczne wyjaśnienie przyczyny nadciśnienia tętniczego, uzyskuje ono status nadciśnienia wtórnego i zostaje zakwalifikowane do jednej z jego klas (75).

#### I.3.1.1. Budowa i funkcja naczyń w nadciśnieniu tętniczym

Ściana naczyniowa (z wyjątkiem naczyń włosowatych) składa się z trzech warstw: wewnętrznej (*intima*), środkowej (*media*) i zewnętrznej (*adventitia*). Warstwa wewnętrzna składa się ze śródbłonna, odgrywającego podstawową rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej. Pomiedzy warstwą wewnętrzną a środkową znajduje się warstwa włókien łącznotkankowych, tworzących blaszkę elastyczną wewnętrzną. Warstwa środkowa to przestrzeń wypełniona miocytami, których skurcz bezpośrednio reguluje wielkość światła naczynia. W warstwie tej występują również włókna tkanki łącznej zbudowane z kolagenu czy elastyny. Warstwa zewnętrzna, zwana również

przydanką, to grupa łącznotkankowych włókien, spełniających rolę podporową. Przerost każdej z tych warstw może skutkować zmniejszeniem światła naczynia, a co za tym idzie zwiększonym oporem naczyniowym. Predysponowane do takiej reakcji są warstwy wewnętrzna i środkowa. Ponieważ opór jest odwrotnie proporcjonalny do czwartej potęgi światła naczynia, już niewielkie zmiany promienia powodują duże zmiany oporu naczyniowego (76).

W nadciśnieniu tętniczym podstawowym zaburzeniem, determinującym podwyższone wartości ciśnienia krwi, wydaje się być zwiększony opór naczyniowy (77). Taką sytuację niemal powszechnie obserwujemy w różnych formach nadciśnienia tętniczego.

I tak zwiększony opór naczyniowy jest wypadkową nie tylko zwiększonego napięcia mięśniówki gładkiej, ale jak się okazało, również trwałych zmian anatomicznych, związanych z przerostem odpowiednich warstw naczyniowych. Panuje pogląd, że w nadciśnieniu samoistnym występuje przemodelowanie eutroficzne dośrodkowe naczyń oporowych (zmniejszenie średnicy światła bez przerostu warstwy środkowej), a w nadciśnieniu typu nerkowego przemodelowanie hipertroficzne dośrodkowe (zmniejszenie średnicy światła naczynia z przerostem warstwy środkowej) (74). Takiej prostej zależności przemodelowania naczyniowego od etiologii nadciśnienia tętniczego wydają się przeczyć niektóre badania, wykazujące, że jest ono (przemodelowanie) raczej wynikiem panujących w naczyniach warunków hemodynamicznych (76). Wydaje się, że na skutek różnego typu defektów naczyniowych (spadek NO (78), wzrost ET-1, TXA-2) w różnych modelach nadciśnienia tętniczego dochodzi do trwałego przerostu mięśniówki gładkiej, co w następstwie powoduje utrwalenie nadciśnienia (79).

Zaburzenie funkcji naczyń w pierwotnym i wtórnym nadciśnieniu tętniczym zachodzi na etapie śródbłonna naczyniowego i mięśniówki gładkiej.

W śródbłoku główną rolę odgrywa niedobór tlenu azotu (patrz 1.1.1), nadprodukcja anionu nadotlenkowego (2.1.1), niedobór prostacykliny (1.1.2) oraz zmiany w obrębie układu endoteliny.

Wśród innych związków, które podejrzewa się o wpływ na rozwój nadciśnienia tętniczego wymienia się produkowane w śródbłoku: płytkowy czynnik wzrostowy (PDGF), insulinopodobny czynnik wzrostowy 1 (IGF-1) oraz zapalną interleukinę (74).

W badaniach mięśniówki gładkiej donoszono o zwiększonej aktywacji kanałów wapniowych typu L w nadciśnieniu samoistnym oraz nerkopochodnym. Opisywano również zwiększenie wrażliwości kanałów potasowych ATP-zależnych na hamujące działanie tego związku (silniejsze hamowanie tych kanałów przez ATP powoduje

zmniejszenie ich aktywności, wywołując tendencje depolaryzujące). U osób z samoistnym nadciśnieniem w komórkach mięśniówki gładkiej stwierdzono podwyższoną ekspresję układu renina – angiotensyna. Ponadto w nadciśnieniu naczyniowo-nerkowym stwierdzono znacznie podwyższoną aktywność reninową (80).

Kolejnym związkiem opisywanym, mogącym mieć związek z nadciśnieniem tętniczym jest wazopresyna (81). Zwiększone stężenie wazopresyny (AVP) odkryto u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym, nadciśnieniem zależnym od sodu oraz nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym. W nadciśnieniu samoistnym wykazano również zwiększenie liczby receptorów wazopresyny typu V1 w komórkach mięśni gładkich naczyń oraz zwiększoną wrażliwość na jej działanie presyjne.

### I.3.2. Modele zwierzęce nadciśnienia

Istnieją trzy podstawowe, a zarazem naturalne modele genetycznego nadciśnienia tętniczego: szczep SHR i jego pochodne (3.2.1), szczep mediolański oraz szczep Dahla. Nadciśnienie u szczurów szczepu mediolańskiego wykazuje zależność od diety bogatosodowej i zależy od mutacji punktowej genu  $\alpha$ -adducyny (kodującego podjednostkę białka cytoszkieletu komórek kanalika nerkowego). Białko to reguluje translokację pompy sodowo-potasowej do błony komórkowej i zwiększa jej aktywność. Co ciekawe, wykazano związek między genem  $\alpha$ -adducyny i występowaniem nadciśnienia samoistnego u ludzi (również sodozależnego) (74). Model Dahla zawiera w sobie właściwie dwa całkowicie odmienne szczepy (82). W pierwszym z nich tzw. Dahl-S (*sensitive*) nadciśnienie rozwija się pod wpływem diety bogatosodowej, podczas gdy szczury typu Dahl-R (*resistant*) nie wykazują takiej reakcji. Krytyczną rolę w rozwoju nadciśnienia u szczurów Dahl-S odgrywają zaburzenia funkcji nerek, uniemożliwiające proporcjonalne do spożycia zwiększenie wydalania sodu. Za to zaburzenie odpowiadają nadmierna aktywacja układu współczulnego (83) oraz nieprawidłowe działanie czynników humoralnych (dopaminy, ANP, spadek NO, nadmierna sekrecja endogenego inhibitora ATP-azy Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) (84).

Dzięki metodom inżynierii genetycznej możliwa jest sztuczna regulacja ekspresji genów. Dzięki niej można wyprodukować szczep o nadmiernej ekspresji, bądź też z pełnym wyeliminowaniem jakiegoś genu, doprowadzając do powstania tzw. szczepu

transgenicznego. Oczywiście, wysiłki badaczy idą w kierunku regulacji genów, które podejrzewa się o udział w jakichś patologiach. Istnieją zwierzęta transgeniczne, których powstanie potwierdziło rolę pewnych związków w powstawaniu nadciśnienia tętniczego (85). Przykładami mogą być myszy wyposażone w dodatkowy ludzki gen angiotensynogenu, u których dochodzi do rozwoju nadciśnienia (wyniku takiego nie zaobserwowano u szczurów – różnice gatunkowe!), a także myszy heterozygotyczne pod względem genu dla ANP, u których nadciśnienie rozwija się w odpowiedzi na dietę bogatosodową.

#### I.3.2.1. Szczury z nadciśnieniem samoistnym typu SHR

Na początku lat 70 grupa naukowców z Uniwersytetu w Kioto za pomocą wielopokoleniowego wsobnego kojarzenia szczurów i szczurzy, wykazujących wyższe niż przeciętne wartości ciśnienia, wyhodowała szczep szczurów z nadciśnieniem samoistnym (*spontaneously hypertensive rats* – SHR). W czasie rejestracji szczepu (1969r.) ciśnienie skurczowe u szczurów SHR wynosiło średnio 180 mmHg. Udowodniono, że bezpośrednio po urodzeniu szczury SHR mają większą masę serca i nerek niż odpowiadające im szczury kontrolne (tzw. Wistard Kyoto – WKY). W dalszych badaniach wykazano zmiany czasu trwania cyklu komórkowego u szczurów SHR. I tak przejście komórek mięśni gładkich z fazy G0 do fazy S trwa znacznie krócej niż u szczurów WKY.

Istotnym wnioskiem z obserwacji było to, że powyżej 3 miesiąca życia szczury SHR wykazują podobne powikłania (zawały, hipertrofia i zwłóknienie mięśnia sercowego, wylewy domózgowe, stwardnienie nerek) do tych opisanych u ludzi z nadciśnieniem (86).

Szereg badań wskazywał na różne zaburzenia mogące doprowadzić do podwyższonego ciśnienia u tych szczurów. Wykazano ważną, w tym zakresie, rolę wzmożonej aktywności układu renina-angiotensyna i układu wazopresynergicznego. Doniesiono również o zaburzeniach regulacji ciśnienia u szczurów SHR przez peptydy natriuretyczne (87), gospodarkę tlenu azotu (w tym nadprodukcję anionu ponadtlenkowego) (88) czy endoteliny (89). W przypadku zaburzeń na tle spadku biodostępności tlenu azotu warto nadmienić, iż o ile występują różnice w poglądach na

wielkość produkcji NO u szczurów SHR (jedni uważają, że jest zwiększona (90), drudzy zmniejszona (91), wreszcie inni, że taka sama jak u szczurów kontrolnych (92)), o tyle panuje względna zgodność co do występującej w ich naczyniach nadprodukcji anionu nadadtlenkowego.

Dodatkowo, istnieją prace wskazujące na częstszą kosegregację poszczególnych genów z występowaniem nadciśnienia u szczurów SHR. Miejsce genomu, w którym doszło do zmian ilościowych związanych z fenotypem podwyższonego ciśnienia tętniczego, jest w chromosomach 1(- Sa),2(- Gca),10 (BP/SP-1), X i Y(Tty). Mimo wielu badań podstawowych jednoznaczny, a zarazem decydujący defekt genetyczny odpowiedzialny za tę chorobę nie został jeszcze odkryty(93).

Jak dotąd nie istnieje żadne przekonywujące wyjaśnienie dotyczące rozwoju nadciśnienia tętniczego u szczurów rasy SHR.

### I.3.3. Nadciśnienie tętnicze u pacjentów operowanych metodą pomostowania tętnic wieńcowych

Od 40 lat uznaną metodą leczenia w chorobie niedokrwiennej serca jest operacja pomostowania tętnic wieńcowych (94). Zabieg ten polega na ominięciu krytycznie zwężonego miejsca tętnicy wieńcowej za pomocą wcześniej wyselekcjonowanego naczynia pacjenta. Naczyniem tym może być zarówno żyła (żyła odpiszczelowa), jak i tętnica (tętnica piersiowa wewnętrzna, tętnica promieniowa). Istnieje szereg prac wykazujących wyższość przeszczepionych naczyń tętniczych nad naczyniami żylnymi. Wskazuje na to chociażby mniejsze występowanie w tej grupie (pomosty tętniczo-tętnicze) zjawiska restenozy, a co za tym idzie ponownych rewaskularyzacji. Autorzy kilku prac dowodzą, że odpowiedzialnym za to zjawisko pozostaje lepsze funkcjonowanie tętniczego śródbłonna (95,96).

W badaniach prospektywnych, przeprowadzanych na pacjentach z klasycznymi czynnikami ryzyka, dowiedziono występowania ostrych incydentów wieńcowych przede wszystkim u chorych z upośledzoną czynnością śródbłonna. Badania USG pacjentów, które wykazały zaburzone przepływy naczyniowe, wtórne do choroby śródbłonna (FMD), udowodniły znamienne częstszą potrzebę wykonania operacji pomostowania tętnic wieńcowych (44,97). W toku badań wykazano ponadto powstawanie zmian



miażdżycowych (zweżenia naczyń w koronarografii) w rejonach tętnic wieńcowych, w których wiele lat wcześniej występowały nieprawidłowe odpowiedzi śródbłonkowe (42). W badaniach *in vitro*, w których oporowe tętniczki wieńcowe zostały uzyskane od pacjentów przechodzących zabieg CABG, udowodniono upośledzoną odpowiedź śródbłonkową, zmniejszającą się po substytucji tetrahydrobiopteryny. W naczyniach kontrolnych, uzyskanych od chorych przechodzących zabieg wymiany zastawki sercowej, wykazano zaś znacznie lepsze odpowiedzi śródbłonkowe (98). Zarówno doświadczenia *in vivo*, jak i *in vitro* jednoznacznie wskazują na występowanie dysfunkcji śródbłonka u pacjentów przechodzących zabieg CABG. Wyniki te nie powinny dziwić, zważając na fakt, że podstawowym czynnikiem rozwoju miażdżycy, a zatem schorzenia mogącego w konsekwencji doprowadzić do konieczności wykonania CABG jest właśnie dysfunkcja śródbłonka.

Jedną z podstawowych przyczyn upośledzenia funkcji śródbłonka jest nadciśnienie tętnicze. Z naszych (99) i innych (100) obserwacji wynika, że częstość występowania nadciśnienia u pacjentów poddanych operacji pomostowania naczyń wieńcowych dotyczy około 70 % chorych. Istnieje wiele dowodów na to, że choroba ta wywołuje spadek biodostępności tlenu azotu, pozbawiając naczynia jego protekcyjnego działania (rozdział I.1.1.1). Jest to niezwykle istotne w wypadku pomostów wieńcowych. Brak zdolności autoregulacyjnych pomostu, zależnych od tlenu azotu, może ograniczać dostęp krwi, gdy zwiększa się na nią zapotrzebowanie. Ponadto może prowadzić do zastoju krwi w pomoście, szczególnie gdy jego średnica jest większa niż możliwości odbioru krwi przez łożysko wieńcowe. Obie sytuacje są wielce niekorzystne i przyczyniają się do progresji choroby miażdżycowej w pomoście. Dodatkowo w sytuacji ciężkiego nadciśnienia tętniczego dochodzi do przerostu lewej komory serca, co niezależnie od spadku wydolności śródbłonka pogarsza rokowanie (101). Wykazano, że przerost lewej komory serca wyznacza całą sekwencję patologicznych zmian. Prowadzi do zmniejszenia perfuzji mięśnia sercowego, zmniejszenia jego rezerwy wieńcowej, do groźnych zaburzeń rytmu i przewodzenia, wreszcie do procesów strukturalnej przebudowy z następczym zanikiem drobnych naczyń tętniczych.

W pracach, oceniających zależność występowania nadciśnienia tętniczego i odległych wyników pomostowania tętnic wieńcowych, wykazano istotny wzrost śmiertelności w tej grupie chorych (względem chorych bez nadciśnienia). W opublikowanym niedawno dużym, retrospektywnym badaniu oceniającym 20-letnie przeżycie po zabiegu CABG wykazano, że przeżycie w grupie z nadciśnieniem wynosiło

27%, gdy w grupie bez nadciśnienia 41%. Świadczy to dobitnie o gorszym rokowaniu u pacjentów obciążonych nadciśnieniem tętniczym(102). W innym, już polskim, badaniu potwierdzono powyższe niekorzystne statystyki. Jednocześnie nie zaobserwowano w obu grupach różnic pomiędzy częstością pozostałych komplikacji sercowo-naczyniowych, w tym epizodów niestabilnej dławicy piersiowej, zawałów serca, częstości hospitalizacji czy ponownej rewaskularyzacji (100). W jeszcze innej pracy wykazano znamienne korelację pomiędzy nadciśnieniem tętniczym a występującym po zabiegu udarze mózgowym. Wiązał się z tym zarówno przedłużony pobyt w szpitalu, jak i zwiększona śmiertelność pooperacyjna(103). W badaniach *in vitro* fragmentów tętnic piersiowych wewnętrznych, wykorzystywanych do wykonywania zespołów tętniczo-tętnicznych, wykazano upośledzenie śródbłonkowo-zależnych rozkurczów naczyniowych. Ponadto stopień upośledzenia odpowiedzi śródbłonkowych wyraźnie korelował z występowaniem przed operacją nadciśnienia tętniczego (104). Może to pośrednio tłumaczyć zwiększoną śmiertelność u pacjentów nadciśnieniowych, przechodzących operację pomostowania tętnic wieńcowych.

#### I.4. Dysfunkcja śródbłonka a nadciśnienie tętnicze

Od wielu lat wiadomo, że nadciśnieniu tętniczemu towarzyszy wzrost oporów przepływu w naczyniach obwodowych (77). Ponieważ tlenek azotu odpowiada za rozszerzanie naczyń, każda przyczyna zmniejszająca jego biodostępność powinna (przynajmniej teoretycznie) zwiększać obwodowy opór naczyniowy. I rzeczywiście, tlenek azotu wydaje się głównym regulatorem tonusu naczyniowego (105). Dodatkowo, jak wykazało kilka badań, powoduje rozszerzenie naczyń nerkowych, co w rezultacie doprowadza do zwiększonej diurezy i natriurezy (106). Tym samym spadek biodostępności tlenu azotu powinien pociągać za sobą podwyższone ciśnienie przepływu w naczyniach tętniczych, a zatem doprowadzać do nadciśnienia tętniczego. W szeregu badań związanych z problematyką nadciśnienia tętniczego wielokrotnie wykazywano dysfunkcję śródbłonka, wyrażającą się spadkiem uwalniania tlenu azotu w odpowiedzi na różne zastosowane stymulanty (głównie acetylocholina i siły tarcia). W eksperymentach *in vitro* na wyizolowanych naczyniach od szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (SHR) dowiedziono upośledzoną odpowiedź

naczyniorozkurczową zależną od tlenu azotu (90). Kontrowersje mogą dotyczyć faktu, iż kilku autorów nie zaobserwowało powyższej reakcji (107,108), część z kolei zanotowała ją, ale tylko u szczurów starszych (109). Aktualnie trwają badania nad odkryciem metody mogącej w sposób bardziej jednoznaczny wykazać u tych szczurów dysfunkcję śródbłonna.

Interesującej obserwacji dostarczyły doświadczenia z wprowadzeniem genu dla ludzkiej syntazy tlenu azotu (110) do komórek szczurów SHR. W wyniku takiej manipulacji otrzymano spadek ciśnienia tętniczego, co pośrednio świadczy o udziale spadku biodostępności tlenu azotu w patomechanizmie nadciśnienia u tych zwierząt. Dodatkowo, u szczurów SHR za różnice płciowe (faworyzujące samice) oraz niekorzystne zmiany naczyniowe związane z wiekiem może odpowiadać spadek biodostępności tlenu azotu, wtórny do nasilonej produkcji anionu nadadtlenkowego (111,112). Dzieje się tak pomimo zwiększonej aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu u szczurów nadciśnieniowych względem szczurów kontrolnych. Jest ona jednak niewystarczająca do zniwelowania nadmiaru wolnych rodników i w ten sposób bilans tlenu azotu / anion nadadtlenkowy przechyla się na korzyść szczurów normotensyjnych (111).

W innym badaniu, wykonanym dla oceny ochronnego wpływu płci na funkcjonowanie naczyń w nadciśnieniu tętnicznym, męskie szczury SHR poddano terapii modulatorem receptorów estrogenowych (Raloxifen). Po upływie 10 tygodni uzyskano poprawę śródbłonkowo-zależnej reakcji rozkurczowej naczyń. Był to efekt zależnej od leku zwiększonej ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu i zahamowanej produkcji wolnych rodników (113).

Istnieje jednak praca (114), której autorzy sugerują, że za podwyższone ciśnienie wśród szczurów SHR odpowiada raczej zaburzony układ sygnalizacyjny (związany ze śródbłonkowym receptorem  $\beta_2$  adrenergicznym) niż układ związany z tlenkiem azotu. Mniej kontrowersji wzbudza zjawisko upośledzonej odpowiedzi rozkurczowej naczyń u szczurów z nadciśnieniem uwarunkowanym nadmiarem mineralokortykoidów (DOCA-salt) oraz u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym (115,116). W obu przypadkach wielokrotnie obserwowano zmniejszoną biodostępność tlenu azotu (np. w teście uwalniania przez acetylocholinę) i tym właśnie tłumaczy się występującą u nich zaburzoną odpowiedź naczyniową. Donoszono również, że u tych szczurów zaobserwowano zwiększoną produkcję wolnych rodników (głównie anionu nadadtlenkowego), co mogłoby powodować powyższy spadek NO, a już na pewno go

po głębiać. Dodatkowo, przynajmniej jeśli chodzi o szczury z rodziny DOCA-salt, wykazano, że istniejąca dysfunkcja śródbłonka może zależeć od podwyższonej aktywności naczyniowej oksygenazy hemowej (enzym katabolizuje powstawanie tlenku węgla, który *per se* hamuje syntazę tlenku azotu) (107).

Ciekawych obserwacji dostarczyły obserwacje szczurów z nadciśnieniem indukowanym wysokosolną dietą (szczury Sprague-Dawley). Pomimo znamienne podwyższonego ciśnienia u szczurów w ten sposób karmionych (kontrolę stanowiły szczury karmione dietą niskosolną) nie wykazano pomiędzy nimi a grupą kontrolną istotnych różnic w odpowiedziach rozkurczowych na acetylocholinę i zewnątrzpochodny donor tlenku azotu. Zaobserwowano za to różnicę we wrażliwości naczyń na kurczące działanie noradrenaliny. Powodowała ona zwiększony skurcz po stronie naczyń uzyskanych od zwierząt z solo-wrażliwym nadciśnieniem i tym autorzy pracy próbowali wyjaśnić patomechanizm schorzenia (117). Natomiast badacze obserwujący solo-wrażliwe i solo-oporne szczury Dahla wykazali, że podwyższone ciśnienie u tych pierwszych było związane z upośledzoną odpowiedzią śródbłonkową na acetylocholinę oraz towarzyszyły mu podwyższone wskaźniki stresu oksydacyjnego (118). Nie istnieje zatem proste przełożenie pomiędzy rodzajem nadciśnienia tętniczego a charakterem wywołujących go zmian.

Badania na zwierzętach dały wystarczająco zachęcające wyniki, aby rozpocząć badania nad wyjaśnieniem patomechanizmu nadciśnienia w organizmie człowieka. Istnieje szereg badań klinicznych, potwierdzających istotną rolę dysfunkcji śródbłonka w patologii naczyniowych związanych z ludzkim nadciśnieniem. W doświadczeniach z dotętnicznym wlewem inhibitorów syntazy NO w naczyniach pacjentów nadciśnieniowych uzyskano zmniejszony skurcz w stosunku do naczyń pacjentów normotensyjnych. Wskazuje to na spadek biodostępności tlenku azotu w naczyniach chorych na nadciśnienie. Dodać należy, że odpowiedź taką uzyskano zarówno w naczyniach obwodowych (tętnica ramienna), jak i w krążeniu wieńcowym (119,120,121). Wiele innych prac, również zorientowanych na ocenę udziału tlenku azotu w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego, wykazało zmniejszenie odpowiedzi naczyniorozkurczającej tętnic przedramienia u pacjentów nadciśnieniowych w odpowiedzi na zwiększone siły tarcia (122,123), acetylocholinę (124,125,126), metacholinę (127), bradykininę (128) czy substancję P (129). Ponadto w przypadku badań klinicznych (w przeciwieństwie do niektórych doświadczeń przeprowadzonych

na zwierzętach) udało się jednoznacznie wykazać zależność nadciśnienia indukowanego wysokosolną dietą z dysfunkcją śródbłonna zależną od spadku biodostępności NO (117).

Co ważne, spadek rozkurczającej odpowiedzi na acetylocholiny u pacjentów nadciśnieniowych zaobserwowano w naczyniach wielu, niezależnych od siebie obszarów. A mianowicie w krążeniu wieńcowym (130), w tętnicach skóry (131), tkanki podskórnej (132), w krążeniu nerkowym (133). Dodatkowo u osób z nadciśnieniem tętniczym stwierdzono zmniejszenie stężenia produktów metabolizmu NO w porównaniu do osób z prawidłowym ciśnieniem (134). Nieco kontrowersji dostarczają doświadczenia, w których podanie L-argininy czy inhibitora syntazy tlenu azotu nie wpływało znacząco na odpowiedź rozszerzającą naczyń po acetylocholiny (134,135).

Zaburzona funkcja śródbłonna wydaje się być schorzeniem uwarunkowanym genetycznie. Wskazują na to doświadczenia, w których mierzono efekt rozszerzający naczyń (na acetylocholiny) u osób normotensyjnych z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku nadciśnienia. U takich osób wykazano znamienne słabszą odpowiedź od obserwowanej u osób z ujemnym wywiadem (136). Dodatkowo, u osób obciążonych dodatnim wywiadem w kierunku nadciśnienia zaobserwowano zaburzony transport argininy (prekursora NO) w naczyniach (137).

Badając pacjentów z nieleczonym dotychczas nadciśnieniem, dowiedziono znamienne częstsze występowanie ostrych incydentów sercowych u chorych, u których wcześniej zaobserwowano gorsze odpowiedzi śródbłonne na wewnątrz tętnicze podanie acetylocholiny (138). Ponadto pewne doświadczenia wykazują, że nasilenie dysfunkcji nie zależy bezpośrednio od wysokości ciśnienia tętniczego, a samo jego obniżenie nie prowadzi w prosty sposób do poprawy funkcji śródbłonna (127,139,140). Skłania to do stwierdzenia, że leczenie pacjentów nadciśnieniowych nie może się ograniczać do korekcy patologicznie podwyższonego ciśnienia, ale powinno zawierać w sobie również farmakoterapię śródbłonna.

Chociaż większość publikowanych badań dotyczy nadciśnienia samoistnego również w nadciśnieniu wtórnym mamy do czynienia z dysfunkcją śródbłonna zależną od niedoboru tlenu azotu (132). Istnieje praca, w której autorzy porównali zmiany naczyniowe w pierwotnym i wtórnym nadciśnieniu tętniczym (76). We wszystkich przypadkach nadciśnienia tętniczego wykazano upośledzoną funkcję śródbłonna zależną od uwalniania NO. Nie udowodniono jednak związków pomiędzy zmianami strukturalnymi naczyń i etiologią nadciśnienia. Również inna praca, poświęcona badaniom odpowiedzi naczyniowych w samoistnym i wtórnym nadciśnieniu tętniczym,

wykazała powszechnie upośledzone śródbłonkowo-zależne rozszerzanie naczyń (126). Autorzy tej ostatniej opisali ponadto wpływ prostaglandyno-pochodnych substancji kurczących w zaburzonej relaksacji w nadciśnieniu samoistnym.

Można przyjąć wiele innych (poza zmniejszoną biodostępnością NO) przyczyn dysfunkcji śródbłonka w nadciśnieniu tętniczym. Przynajmniej trzy z nich znalazły szersze zainteresowanie w kręgach naukowców. Są to : nadmierna produkcja endoteliny, spadek produkcji prostacykliny oraz wzmożona generacja wolnych rodników.

Za pierwszą tezę przemawia fakt znacznie podwyższonego stężenia endoteliny w ciężkim nadciśnieniu tętniczym i w przebiegu nadciśnienia złośliwego (141). Stwierdzono zwiększoną ekspresję genu kodującego receptory dla endoteliny typu 1 (ET1) w tętnicach oporowych u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Opisano również u nich zwiększoną wrażliwość naczyń na ten związek (79). Ponadto dowiedziono, że na skutek zahamowania produkcji tlenu azotu endotelina może w warunkach patologicznych pośrednio wpływać na zmiany przerostowe naczyń (142). Szczególnie przekonujące były doświadczenia z użyciem blokera receptorów dla endoteliny (bosantan). W ich wyniku uzyskano spadek ciśnienia tętniczego u pacjentów z łagodnym i średnim nadciśnieniem (143,144). W doświadczeniach na szczurach z mineralokortykoidowym nadciśnieniem (DOCA-salt) wykazano, że przynajmniej za część niekorzystnych efektów odpowiada endotelino-zależna nadmierna produkcja wolnych rodników (116). Wreszcie zarówno w obrębie ras szczurów (145) jak i ras ludzkich istnieją spore różnice w zakresie odpowiedzialności endoteliny za występowanie nadciśnienia (146). Dalsze badania wydają się zatem niezbędne do rzetelnej oceny endoteliny w aspekcie zmian naczyniowych w tej jednostce chorobowej.

Druga teza, chociaż równie łatwa do racjonalnego wytłumaczenia zmian w nadciśnieniu tętniczym, nie znalazła jak dotychczas potwierdzenia w badaniach klinicznych. Wyjątkiem są chorzy z genotypem SS syntazy prostacykliny, u których zaobserwowano podwyższone ciśnienie tętnicze (147). Jednoznaczna ocena udziału prostacykliny w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego nie może być przeprowadzona do końca. Utrudnia ją wpływ związków o podobnym pochodzeniu, ale o przeciwnym działaniu naczyniowym (np. przeciwnie działająca do prostacykliny naczyniokurcząca  $PGH_2$ ). Nie znamy na razie związków o wybiórczym hamowaniu produkcji prostacykliny. Inhibitory COX z jednej strony zmniejszają jej produkcję, z drugiej jednak hamują powstawanie naczyniokurczących prostaglandyn. Bez względu na to, jaki jest udział prostacykliny w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego, samo

podanie inhibitorów COX u pacjentów z rozwiniętą chorobą nadciśnieniową wydaje się niekiedy przywracać prawidłową funkcję śródbłonna (118,148). Próbuje się to tłumaczyć występującą w dysfunkcji śródbłonna nadmierną aktywnością indukowalnej cyklooksygenazy 2, odpowiedzialnej za wzrost produkcji naczyniokurczących prostaglandyn i generację wolnych rodników.

Trzecia teza (obok teorii z udziałem tlenu azotu) wydaje się najbardziej prawdopodobna w rozważaniach nad patogenezą dysfunkcji śródbłonna w nadciśnieniu tętniczym. Wielu badaczy uważa wręcz, że nie sam niedobór tlenu azotu czy nadmiar anionu ponadtlenkowego jest decydujący dla powstania patologii naczyniowych. Wartość sprawczą mają, ich zdaniem, zaburzone relacje ilościowe pomiędzy tymi związkami. Wydaje się to uzasadnione, biorąc pod uwagę występujące zależności (1.1.1) oraz przeciwstawne działania obu związków. Za niekorzystnym wpływem zwiększonej produkcji wolnych rodników na funkcję naczyniową w tym schorzeniu przemawiają z jednej strony powszechne występowanie tego zjawiska w większości modeli nadciśnienia (badania na zwierzętach i ludziach (54,117,149-159)), jak również możliwość odwrócenia patologicznej odpowiedzi naczyniowej po zastosowaniu genetycznych wektorów o działaniu antyoksydacyjnym. Przykładem takiej obserwacji jest doświadczenie, w którym zastosowanie genetycznej delecji oksydazy NAD(P)H częściowo normalizuje ciśnienie szczurów (159). Normalizacji tej towarzyszyła poprawa odpowiedzi śródbłonkowych. Podobny wynik dało zastosowanie cząsteczek dysmutazy ponadtlenkowej z możliwością przyłączania się do śródbłonna (tzw. heparin-binding SOD) (62,158). Pewne kontrowersje wzbudza natomiast nadciśnienie indukowane wlewami norepinefryny, w którym nie dochodzi do wzrostu anionu ponadtlenkowego, czy też wzrost ekspresji oksydazy NAD(P)H (151). Sugeruje to, że wolne rodniki mogą być w różny sposób zaangażowane w patomechanizm ludzkiego nadciśnienia.

Pomimo mnogości badań nad patomechanizmem nadciśnienia tętniczego w ostatnich latach nadal wiele zagadnień pozostaje nie rozstrzygniętych. Pozostają pytania:

- a) czy dysfunkcja śródbłonna poprzez zaburzenia równowagi naczyniowej doprowadza do przewagi czynników presyjnych i przebudowy naczyniowej skutkujących podwyższonym ciśnieniem tętniczym,

b) czy też podwyższone ciśnienie tętnicze, powstające na skutek nieznanych dotąd mechanizmów, zaburzając równowagę naczyniową, powoduje upośledzoną odpowiedź śródbłonkową, przebudowę naczyniową, utrwalającą i nasilającą progresję zmian naczyniowych.

Każda z przedstawionych tez znajdzie swoich obrońców. Pierwsza, bo istnieją sposoby przywracania prawidłowego ciśnienia za pomocą genetycznej terapii skierowanej na poprawę wydolności śródbłonka (158). Pewne znaczenie ma tu również fakt występowania dysfunkcji śródbłonka u młodych, klinicznie zdrowych osób z wywiadem rodzinnym dotyczącym nadciśnienia, u których z czasem rozwija się nadciśnienie (136,137). Druga, ponieważ sztucznie wywołane nadciśnienie tętnicze np. długotrwałymi wlewami substancji presyjnych doprowadza w rezultacie do spazmowanej odpowiedzi śródbłonkowej (160). Każda z tez ma swoje racje i być może obie istnieją obok siebie w przyrodzie. Jedno wydaje się niepodważalne: niezależnie od roli, jaką w etiopatogenezie nadciśnienia tętniczego spełnia dysfunkcja śródbłonka pozostaje ona zasadniczym celem terapii dla tej jednostki chorobowej.



## **II. CELE PRACY.**

- Opracowanie metody oceny dysfunkcji śródbłonna naczyniowego z użyciem NADPH jako aktywatora naczyniowej oksydazy NAD(P)H w izolowanych naczyniach krwionośnych szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym. Poszukiwanie źródeł naczyniowej produkcji anionów nadadtlenkowych w nadciśnieniu tętniczym
  
- Zdyskontowanie metody do oceny dysfunkcji śródbłonna ludzkich naczyń krwionośnych. Ustalenie korelacji pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna a czynnikami ryzyka miażdżycy

### **III. MATERIAŁY I METODY**

#### III.1. Materiały

##### III.1.1. Materiały biologiczne

###### III.1.1.1. Ludzkie naczynia krwionośne

Naczynia krwionośne pozyskano od 180 pacjentów poddanych zabiegowi pomostowania aortalno – wieńcowego w Klinice Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii CM UJ. Były to pozostałości tętnic piersiowych wewnętrznych oraz żył odpiszczelowych nie wykorzystane przez chirurgów podczas tych operacji.

###### III.1.1.1.a Żył odpiszczelowe (HSV- *Human saphenous veins*)

Nadmiar żyły (średnio 1-4 cm.) odcinano przed opracowaniem chirurgicznym i natychmiast przekładano do naczynia ze schłodzonym roztworem Krebsa-Henseleita. Aby zapobiec wewnątrznacyniowemu wykrzepianiu krwi, światło żyły przepłukiwano wyżej wymienionym buforem. Następnie, w możliwie najszybszy sposób transportowano naczynia do laboratorium i tam do przechowywano je w lodzie do momentu rozpoczęcia eksperymentów. Średni czas od pobrania naczynia do rozpoczęcia eksperymentów wynosił 1 godzinę.

###### III.1.1.1.b Tętnice piersiowe wewnętrzne (IMA- *Internal mammary arteries*)

W doświadczeniu wykorzystano dystalny fragment naczynia, odcinany przez chirurga jako bezużyteczny. Tętnice piersiowe wewnętrzne pobierano przed nasączeniem ich papaweryną lub innymi środkami rozkurczającymi. Naczynie pozostawiono w powięzi, ale podobnie jak w przypadku żył, przepłukiwano delikatnie światło tętnicy buforem Krebsa-Henseleita. W laboratorium następowała dalsza obróbka naczynia, polegająca na odseparowaniu otaczających tkanek. W tym celu wykorzystywano mikronarzędzia, niejednokrotnie używając mikroskopu.

Do momentu rozpoczęcia doświadczenia tętnice były zanurzone w schłodzonym buforze Krebsa - Henseleita. Średni czas od pobrania do rozpoczęcia eksperymentu również wynosił 1 godzinę.

Zarówno tętnice, jak i żyły po wstępnym wyżej opisanym przygotowaniu zostały pocięte na 3- mm pierścienie.

### III.1.1.2. Aorty szczurze

W badaniach wykorzystano fragmenty aorty piersiowej uzyskanej od 120 szczurów samców (250-400 g). Parę stanowiły naczynia szczura szczepu SHR (*Supra Hypertensive Rats*) oraz WKY (*Wistard-Kyoto Rats*). Oba szczepy pochodziły z hodowli za barierą sanitarno - epidemiologiczną (Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź). Bezpośrednio przed doświadczeniami zwierzęta przetrzymywano w zwierzętarni Katedry Farmakologii Collegium Medium UJ w konwencjonalnych warunkach, z zachowaniem stałej temperatury otoczenia (22,1st. C), przy cyklu oświetlenia i ciemności 12/12 godzin. Zwierzęta miały swobodny dostęp do karmy i wody.

Szczury znieczulano pentobarbitem (50 mg/kg.i.p.), a następnie zabijano uderzeniem w podstawę czaszki. Po nacięciu klatki piersiowej (środkowa sternotomia z szerokim rozwarciem ścian klatki piersiowej) i dojściu do aorty piersiowej odcinano serce i płuca, a następnie wykonywano nacięcie w nadprzeponowym odcinku aorty piersiowej, otoczonej mięśniami przykręgosłupowymi. Po kaniulacji aorty przepłukiwano ją buforem Krebsa-Henseleita schłodzonym do temperatury 4°C. Kolejno wycięto tętnicę, którą przeniesiono na szalki Petriego ze specjalnie przygotowaną silikonową powierzchnią, umożliwiającą umocowanie wyizolowanej aorty. Czynności wykonywano z ostrożnością, by nie uszkodzić komórek śródbłonna.

Szalkę wypełnioną schłodzonym do temperatury 4° C buforem KH umieszczano w styropianowym pojemniku z lodem. Wszystkie naczynia pod mikroskopem (Nikon, Japan) dokładnie oczyszczano z mięśni i tkanki tłuszczowej. Następnie cięto je na pierścienie szerokości ok. 3 mm.

Ponadto aby uzyskać pierścienie naczyniowe pozbawione komórek śródbłonna, przez światło wyizolowanych i oczyszczonych naczyń, przed ich pocięciem na pierścienie, kilkakrotnie przeciągano stalowy drucik owinięty watą.

### III.1.2. Leki i odczynniki

W pracy wykorzystano następujące środki farmakologiczne: acetylocholina (ach, Sigma Chemical Company, UK), fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (NADPH, Sigma Chemical Company, UK), di-N-metyloakrydyna (lucygenina, Sigma Chemical Company, UK), dysmutaza ponadtlenkowa (PEG-SOD, Sigma Chemical Company, UK), Tiron (Sigma Chemical Company, UK), apocynina (Sigma Chemical Company, UK), oksypurynol (Sigma Chemical Company, UK), dietylokarbamid (DETC, Sigma Chemical Company, UK), tetraetylamonu (TEA, Sigma Chemical Company, UK), N-acetylocysteina (Sigma Chemical Company, UK), nadtlenek wodoru (Sigma Chemical Company, UK), chelerytryna (Sigma Chemical Company, UK), katalaza (Sigma Chemical Company, UK), chlorek potasu (KCl), fenylefryna (Sigma Chemical Company, UK), dwumetylosulfotlenek (DMSO, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), ester metylowy L-N<sup>G</sup>-nitro-L-argininy (L-name, Sigma Chemical Company, UK), indometacyna (Sigma Chemical Company, UK).

Do badań przeprowadzonych z wykorzystaniem izolowanych naczyń w modelu łaźni wodnej (łaźni naczyniowej) zastosowano zmodyfikowany bufor Krebsa-Henseleita (bufor KH) o składzie w mM: NaCl 118,0, CaCl<sub>2</sub> 2,52, KCl, 4,7, MgSO<sub>4</sub> 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, glukoza 10,0 wzbogacony mieszanką powietrza o składzie: CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 21%, N<sub>2</sub> 74% (lub karbogenem o składzie CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 95%).

## III. 2. Metody

### III.2.1. Badania na izolowanych naczyniach

#### Krótki opis metody

Badania przeprowadzono na izolowanych pierścieniach naczyniowych, wyciętych z fragmentów naczyń ludzkich lub aorty szczurzej i umieszczonych w łaźni wodnej typu „organ-bath”. Jest to szeroko stosowana technika pomiarów reaktywności naczyniowej. Metoda ta opiera się na pomiarze zmian izometrycznego napięcia pierścieni naczyniowych, umieszczonych w wypełnionych buforem i utrzymujących

stałą temperaturę łaźniach. Łaźnie te posiadają parę stalowych drobnych drucików, na które nawleka się badany pierścień naczyniowy. Druciki połączone są ze specjalnym czujnikiem mechanicznym, rejestrującym zmiany napięcia obserwowane pod wpływem podawania różnych środków farmakologicznych. Ten sygnał po wzmocnieniu zapisywany jest na taśmie rejestratora w postaci krzywej, której ramię wznoszące odpowiada skurczowi pierścienia naczyniowego, natomiast ramię opadające informuje o jego rozkurczu.

#### Protokół doświadczeń przeprowadzonych na izolowanych naczyniach

Pierścienie z naczyń ludzkich oraz z aort szczurzych po umieszczeniu w łaźni pozostawiono do spontanicznej stabilizacji przez okres do 90 minut. Następnie stabilizowano je w napięciu izometrycznym przez kolejne 90 minut. Wartość napięcia wstępnego, jakiemu poddawano naczynia, odpowiadała rodzajowi naczynia. I tak dla żył odpiszczelowych była to wartość 4g, dla tętnic piersiowych wewnętrznych oraz aort szczurzych - 2g. Po ustabilizowaniu się naczyń przykurczano je trzykrotnie przez wzrastające stężenie KCl (60-120 mM). Następnie, po dokładnym wypłukaniu naczynia przykurczano przy pomocy kumulatywnie wzrastających dawek fenylefryny (w stężeniu 10-30 $\mu$ M), aż do osiągnięcia ich maksymalnego przykurczu. Po kolejnym wypłukaniu pierścienie przykurczano fenylefryną w takim stężeniu (1-3  $\mu$ M), aby uzyskać 50-80% maksymalnego przykurczu uzyskiwanego po podaniu KCl (60-120 mM).

Przykurczone pierścienie naczyniowe poddawano działaniu NADPH (100  $\mu$ M), N-acetylocysteiny (10 $\mu$ M-10mM) czy też acetylocholinie (10nM-100 $\mu$ M). Po zastosowaniu każdej testowanej substancji i uzyskaniu odpowiedzi krążka naczyniowego trzykrotnie płukano każdą łaźnię ogrzanym buforem KH i pozwalano na stabilizację przez kolejne 20 minut.

W przypadku prowadzenia doświadczeń z inhibitorem syntazy tlenu azotu (L-NAME 300  $\mu$ M), inhibitorem cyklooksygenazy (indometacyna 10  $\mu$ M), dysmutazą ponadtlenkową (SOD 500U/ml), tironem (SOD mimetyk 10mM) czy też katalazą (1200U/ml) naczynia inkubowano przez minimum 20 minut. W przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano maksymalnie skuteczne stężenia inhibitorów oraz działających enzymów, wybrane w oparciu o dane opisywane w literaturze.

Równolegle wykonywano doświadczenia na pierścieniach naczyniowych pozbawionych śródbłoka. Skuteczność usunięcia śródbłoka potwierdzono

eksperymentalnie na naczyniach przykurczonych wcześniej fenylefryną, przez podanie acetylocholino.

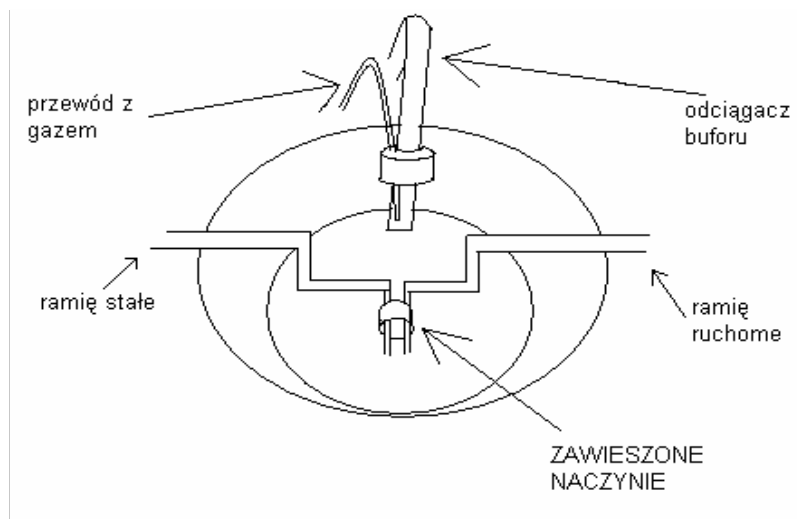
### Rejestracja czynności izolowanych naczyń

Wykorzystywany w Katedrze Farmakologii model łaźni naczyniowej jest złożony z 4 metalowych, cylindrycznych naczyń (łaźni) o pojemności 5ml, w których umieszcza się pierścienie naczyniowe, a łaźnie wypełnia buforem inkubacyjnym.

Łaźnie zbudowane są tak, aby zapewnić w części zewnętrznej, obecność płaszczki wodnego, warunkującego stałe ogrzewanie płynu inkubacyjnego do temperatury 37 °C, a także by umożliwić odpływ zużytego i napływ świeżego płynu inkubacyjnego (zwykle bufor KH). Pierścienie naczyniowe są rozpięte pomiędzy dwoma stalowymi drucikami, z których jeden jest połączony z tensometrem. Skurcz lub rozkurcz pierścieni wywołuje ruchy dźwigni tensometru (Ryc.III.1). Tak uzyskany sygnał jest przetwarzany i wzmacniany przez układ mechanicznych przetworników.

W prowadzonych doświadczeniach rejestracja wszystkich reakcji naczyniowych odbywała się przy udziale elektronicznych przekaźników (Hugo Sachs, Niemcy). Następnie dane te wzmacniano oraz przetwarzano z analogowych na cyfrowe przy pomocy układu akwizycji danych Biopac MP 100 i programu Acqknowledge TM dla MacintoshOS. Pomiarów dokonywano równolegle dla czterech pierścieni naczyniowych. Czas doświadczeń wynosił 8-12 godzin.

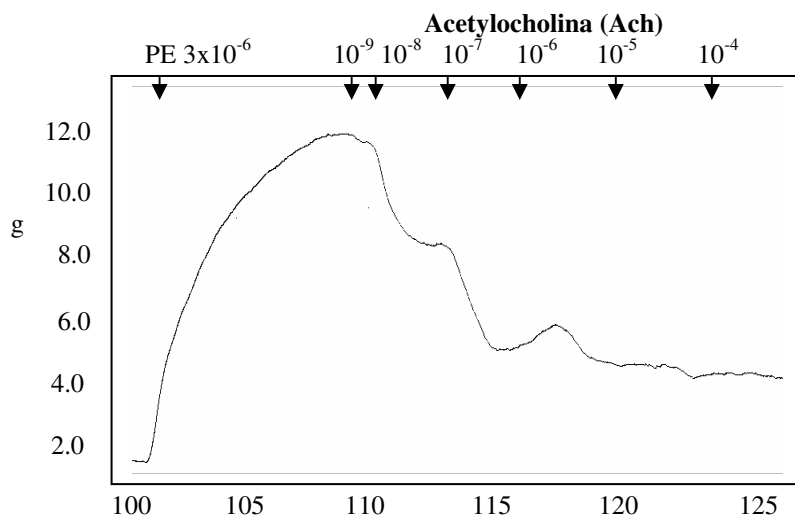


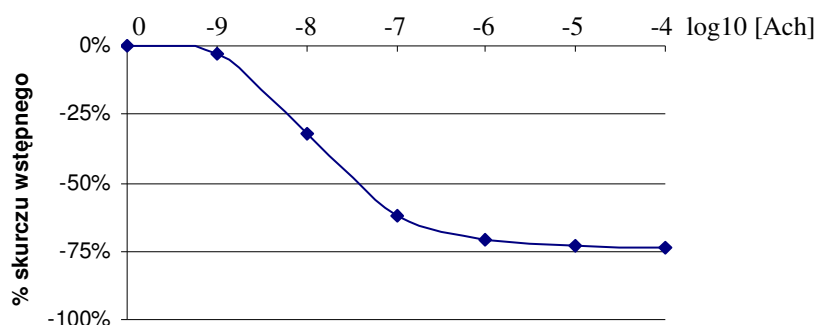


Ryc.III.1. Łaźnia naczyniowa z umieszczonym wewnątrz pierścieniem naczyniowym.

### Zasada obliczania wielkości skurczu lub rozkurczu naczyń

Aktywność skurczową i rozkurczową pierścieni naczyniowych rejestrowano na bieżąco na ekranie monitora oraz w pamięci komputera. Skurcz obrazowany był poprzez ramię wstępujące krzywej, zaś rozkurcz - ramię zstępujące. Długość odpowiednich odcinków analizowano przy pomocy programu Acqknowledge™. I tak np. dla KCl wywołującego maksymalny skurcz, długość odcinka wznoszącego krzywej od podstawy do punktu plateau wyrażano jako różnicę w mN (miliniutonach) i określano jako 100%. Podobnie rzecz się miała w przypadku skurczu wywołanego przez fenylefrynę. Wielkość rozkurczu lub skurczu wywołanego przez NADPH, NAC albo np. przez acetylocholiny określano jako procent odpowiedzi skurczowej wywoływanej przez fenylefrynę (Ryc.III.2).





Ryc.III.2. Przykładowy zapis rozkurczów wywołanych acetylocholiną. Naczynia przykurczano wstępnie fenylefryną (PE, typowo  $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ), a następnie podawano wzrastające dawki agonistów (acetylocholiny lub N-acetylocysteiny). Odpowiedzi naczyń analizowano jako procent(y) wstępnego skurczu (wykres poniżej przykładowej krzywej).

### Kalibracja układu pomiarowego

W każdym tygodniu doświadczeń dokonywano kalibracji aparatury względem odważnika 2g. Zarówno w badaniach na naczyniach ludzkich (charakteryzujących się dużą zmiennością), jak i na naczyniach szczurzych (potencjalnie niewielka zmienność) używano tej samej aparatury i tych samych odczynników. Nie wykazano różnic w czułości aparatury lub jakości odczynników.

### III.2.2. Pomiary produkcji anionu ponadtlenkowego

#### Krótki opis metody

Pomiaru produkcji anionu ponadtlenkowego dokonano za pomocą chemiluminescencji zależnej od lucygeniny. Lucygenina (bis-N-methylacridinum) jest przenikającą przez błony biologiczne substancją chemiluminescencyjną, wykorzystywaną do wykrywania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej produkcji anionu ponadtlenkowego (161). Metoda ta jest również szeroko stosowana do pomiaru aktywności oksydazy NAD(P)H (162), oksydazy ksantynowej (162) jak też oksydaz mitochondrialnych (163). Wykrywanie anionu ponadtlenkowego przez lucygeninę umożliwia reakcja tego związku z anionem ponadtlenkowym, w wyniku której wytwarzany jest foton światła. Ze względu na opisywaną przez niektórych (164)



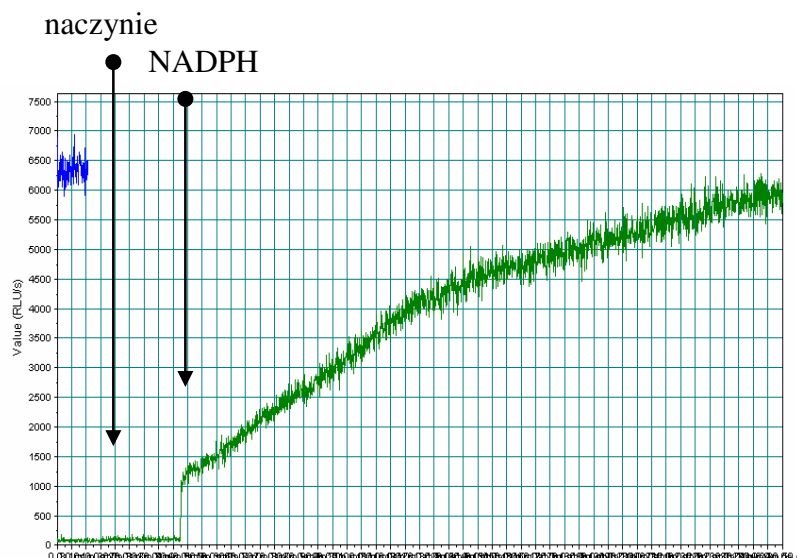
możliwość sztucznego wzmacniania sygnału chemiluminescencyjnego na drodze tzw. redoks-cyklowania lucygeniny, powstrzymano się od próby bezwzględnej ilościowej oceny produkcji anionu ponadtlenkowego, stosując jedynie wartości porównawcze [RLU-*relative light units*]. Przy pomocy urządzenia będącego w stanie rejestrować uwalnianie się fotonów, a także ich pomiar (luminometr) udaje się pośrednio ustalić poziom produkcji anionu ponadtlenkowego.

### Protokół doświadczeń

Naczynia krwionośne (o rozmiarach odpowiadających średnio 1-3 mg suchej masy) rozcinano podłużnie w celu odsłonięcia śródbłonna. Następnie inkubowano je około 30 minut w nadtlenowym buforze Krebs-HEPES, w temperaturze 37°C. Chemiluminescencję zależną od lucygeniny mierzono w 2 ml buforu Krebs-HEPES, zawierającego 5 μM stężenie lucygeniny. Pomiarów dokonywano w 18 ml naczynkach scyntylicyjnych (Beckmann). Naczyńko z roztworem lucygeniny umieszczano w luminometrze, gdzie w początkowej fazie zachodziła adaptacja do ciemności. Następnie zapisywano chemiluminescencję dla samego naczynka - pomiar tła (średnio 5 min.).

W drugiej fazie umieszczano rozcięty pierścień naczyniowy w naczynku i mierzono chemiluminescencję przez kolejne 10-15min. W celu zmierzenia maksymalnej aktywności NAD(P)H oksydazy czy też innych oksydaz dodawano do naczynka aktywatorów lub substratów tych oksydaz (np. NADPH). Pomiar prowadzono przez następne 20 min. lub do osiągnięcia plateau (Ryc.III.3.). Swoistość chemiluminescencji wobec anionu ponadtlenkowego sprawdzano, obserwując zahamowanie sygnału po preinkubacji naczynia z dysmutazą ponadtlenkową (SOD-500U/ml) lub tironem (10mM). Po zakończeniu pomiarów pierścień naczyniowy suszono w 50°C przez 24h, a następnie ważono na wadze miligramowej. W doświadczeniach, mających na celu określenie źródeł anionu ponadtlenkowego, naczynia przed pomiarem zostały poddane inkubacji (30min.) z inhibitorami potencjalnych oksydaz naczyniowych. Stosowano: inhibitor NAD(P)H oksydazy-apocyninę (300μM-1mM), inhibitor oksydazy ksantynowej-oksypurynol (100μM-1mM), inhibitor cyklooksygenaz-indometacynę (10μM), inhibitor NOS-L-NAME (100μM-1mM). Inhibitory te były obecne zarówno w czasie inkubacji, jak i przez cały okres pomiaru (były dodawane do naczyniek).

W przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano maksymalnie skuteczne stężenia inhibitorów oraz działających enzymów, wybrane w oparciu o dane opisywane w literaturze.



Ryc.III.3. Przykład zapisu chemiluminescencji zależnej od lucygeniny ( $5\mu\text{M}$ ) z naczyń krwionośnych. Najpierw zapisano poziom chemiluminescencji tła, następnie chemiluminescencję pochodzącą z naczyń krwionośnych, wreszcie chemiluminescencję po dodaniu substratu ( $100\mu\text{M}$  NADPH w tym przypadku).

### Rejestracja pomiaru anionu ponadtlenkowego.

Pomiary wykonywano przy pomocy luminometru Berthold FB12, zmodyfikowanego do utrzymania stałej temperatury  $37^{\circ}\text{C}$ . Rejestracji i oceny poziomu anionu ponadtlenkowego dokonywano przy pomocy programu FB12. Czas trwania pojedynczego doświadczenia wynosił 1-2 godziny.

### Zasada obliczania produkcji anionu ponadtlenkowego

Poziom powstającego anionu ponadtlenkowego był na bieżąco rejestrowany na ekranie monitora oraz zapisywany w pamięci komputera. Po ustaleniu się plateau odpowiedzi naczyniowej odczytywano jej wartość. Wartość ta, po odjęciu chemiluminescencji tła i po przeliczeniu na miligram suchej masy naczyń, stanowiła właściwy pomiar powstałego anionu ponadtlenkowego. W przypadku zastosowania preinkubacji naczyń z inhibitorami oksydaz lub innymi enzymami, wartość powstałego

anionu nadtlenkowego porównywano do wartości uzyskanej od naczynia nie poddanego inkubacji i wyrażano ją jako procent tamtej.

Zarówno część badań dotycząca ludzi, jak i ta dotycząca szczurów uzyskały zgodę Komisji Etycznej Collegium Medicum UJ.

### III.2.3. Analiza statystyczna

Dane z wszystkich przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych  $\pm$  błąd standardowy średniej ( $M \pm SEM$ ).

Analizę korelacji prowadzono przy pomocy testów korelacji Pearsona i Spearmana. W sytuacji normalnego rozkładu zmiennych stosowano test t-Studenta dla zmiennych nie związanych lub związanych (odpowiednio dla średnich w próbach powiązanych i nie). W przypadku rozkładu różnego od normalnego, dla porównania średnich w próbach powiązanych stosowano test Wicoxona, do porównania zaś różnic pomiędzy próbkami populacji, w których stwierdzono rozkład różny od normalnego stosowano test U Mann-Whitney'a. Do porównania średnich w więcej niż dwóch grupach stosowano analizę wariancji (ANOVA). Równość wariancji oceniano testem Fishera. W każdym przypadku za statystycznie znamienne uznano wartości  $p < 0.05$ .

Ponieważ celem pracy było zbadanie dysfunkcji śródbłonna poprzez pomiar zaburzonej interakcji pomiędzy anionem nadtlenkowym i tlenkiem azotu, za każdym razem dodawano inhibitor cyklooksygenaz – indometacynę ( $10 \mu M$ ). Postępowanie takie, w wyniku usunięcia produktów aktywacji COX (tj. prostacykliny, tromboksanu i prostaglandyn), umożliwiło dokładniejszą ocenę wpływu wzajemnych relacji  $NO/O_2^-$  na biologię naczyń krwionośnych.

## IV. WYNIKI

IV.1. Określenie źródeł i znaczenia czynnościowego anionu ponadtlenkowego w aortach uzyskanych od szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (szczury rasy SHR) i od szczurów normotensyjnych (szczury rasy WKY)

*W podrozdziale tym opisano wyniki doświadczalnej analizy mechanizmów leżących u podstaw dysfunkcji śródbłonna oraz stresu oksydacyjnego w aortach objętych procesem nadciśnienia tętniczego. Użyto, wielokrotnie stosowany w celach badawczych, zwierzęcy model genetycznie uwarunkowanego nadciśnienia tętniczego (szczury SHR/WKY). W modelu tym aorty uzyskane od szczurów rasy SHR są przykładem tętnic nadciśnieniowo zmienionych, a aorty uzyskane od szczurów normotensyjnych (szczury rasy WKY) przykładem tętnic nie dotkniętych tą patologią. Wyniki uzyskane z doświadczeń na aortach szczurów rasy WKY mogą zatem stanowić kontrolę dla analogicznych wyników uzyskanych od szczurów SHR.*

### IV.1.1. Charakterystyka szczurów biorących udział w doświadczeniach

Większość doświadczeń przeprowadzono na naczyniach uzyskanych od szczurów 3-4 miesięcznych.

Rasa szczura	SHR	WKY
Wiek	3-4 miesiące	3-4 miesiące
Ciężar ciała	305-359 g	275-360 g
Ciśnienie skurczowe	180-200 mmHg	110-140 mmHg
Liczba zwierząt	40	40

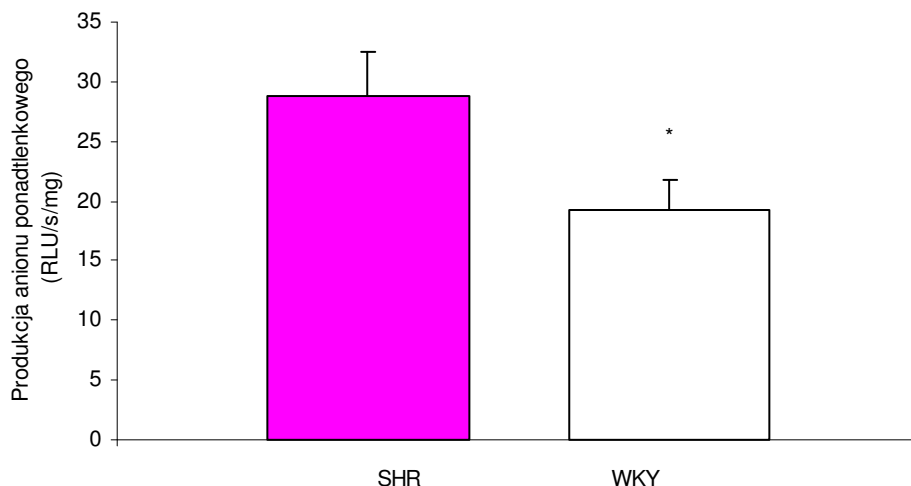
Część eksperymentów wykonano na aortach uzyskanych od zwierząt starszych tj. 6 oraz 12 miesięcznych (są to eksperymenty specjalnie wyszczególnione).

Rasa szczura	SHR	WKY
Wiek	6 miesięcy	6 miesięcy
Ciężar ciała	370-430	360-420
Ciśnienie skurczowe	180-205	110-140
Liczba zwierząt	10	10

Rasa szczura	SHR	WKY
Wiek	12 miesięcy	12 miesięcy
Ciężar ciała	380-445 g	390-442
Ciśnienie skurczowe	180-200 mmHg	115-145
Liczba zwierząt	10	10

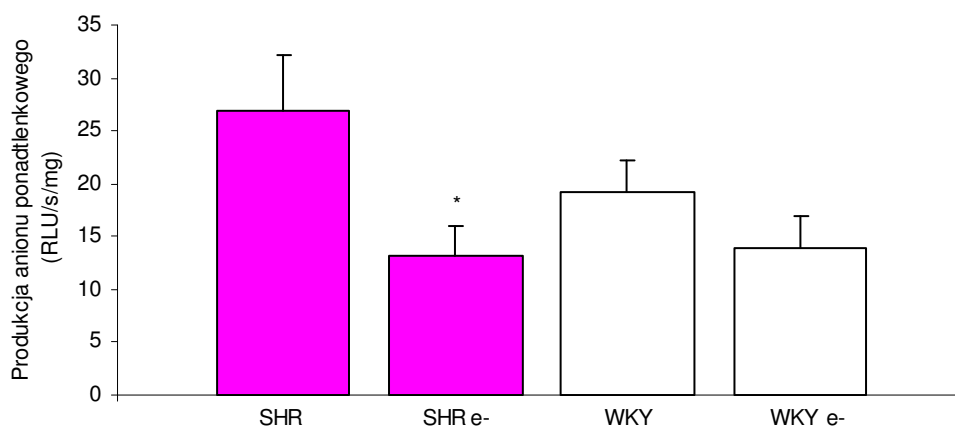
#### IV.1.2. Produkcja anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych

Podstawowa produkcja anionu ponadtlenkowego mierzona za pomocą chemiluminescencji była znamienne wyższa w aortach szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym – SHR ( $28,8 \pm 3,61$ ) w porównaniu do aort uzyskanych od szczurów normotensyjnych – WKY ( $19,2 \pm 2,52$ ) (Ryc. IV.1). Tożsamość anionu ponadtlenkowego stwierdzano poprzez hamowanie sygnałów chemiluminescencyjnych przez dysmutazę ponadtlenkową (PEG-SOD; 500U/ml) oraz Tiron (10 mM).



Ryc. IV.1. **Produkcja anionu nadtlenkowego w aortach szczurzych.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 40 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs WKY.

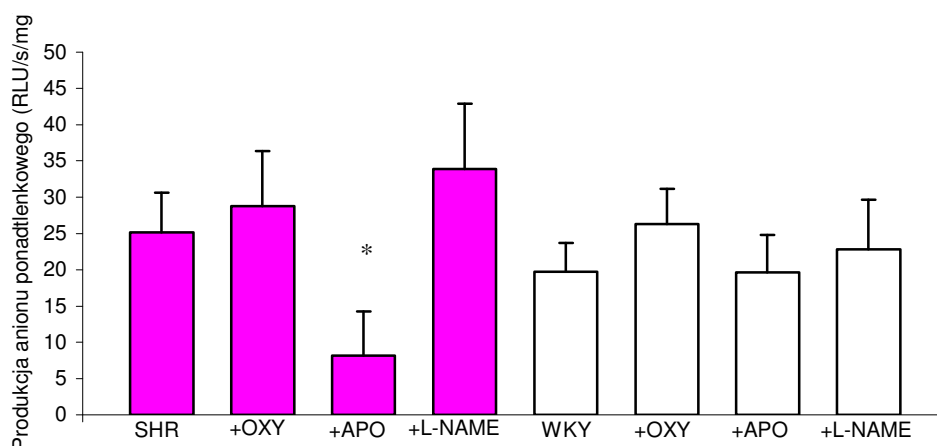
Usunięcie śródbłonka w aortach szczurów rasy SHR skutkowało zmniejszeniem produkcji anionu nadtlenkowego (o ok. 50 %). Sugeruje to, że u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem produkcja anionu nadtlenkowego w znacznym stopniu zależy od obecności śródbłonka. W przypadku naczyń uzyskanych od szczurów WKY odpowiedź była statystycznie nieznamienne (Ryc. IV.2).



Ryc. IV.2. **Zależność produkcji anionu nadtlenkowego od obecności nienaruszonego śródbłonka.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia sztucznie pozbawiono śródbłonka (e-). Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 9 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs SHR e-.

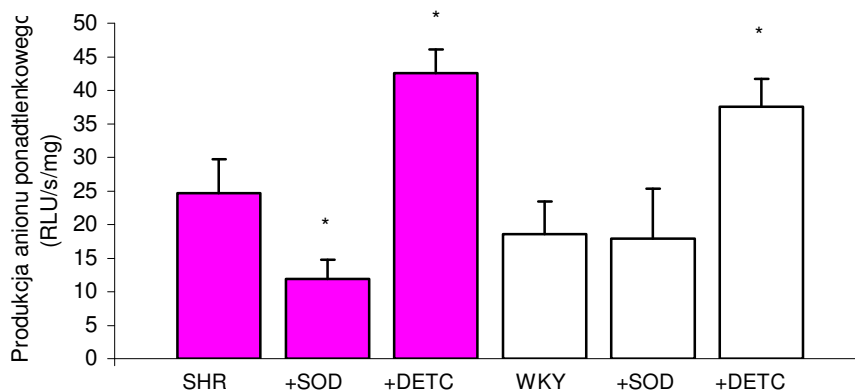
#### IV.1.2.1. Źródła anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych

W celu określenia źródeł anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych (zarówno szczurów rasy SHR, jak i WKY) mierzono produkcję anionu ponadtlenkowego po preinkubacji naczyń z inhibitorami oksydaz naczyniowych. Jedynie u szczurów SHR i tylko po zahamowaniu oksydazy NAD(P)H zaobserwowano istotną różnicę w produkcji anionu ponadtlenkowego (Ryc. IV.3).



Ryc. IV.3. Źródła anionu ponadtlenkowego w aortach. Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5 uM). Pierwsze cztery słupki przedstawiają wyniki uzyskane z aort szczurów SHR, a cztery następne z aort szczurów WKY. Część naczyń poddawano wstępnej preinkubacji z oxypurynolem (inhibitorem oksydazy ksantynowej; 100µM), apocyniną (inhibitorem oksydazy NAD(P)H; 100µM) oraz L-NAME (inhibitorem syntaz NO; 300µM). Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 9-10 doświadczeń.

Dokonano również oceny możliwości zahamowania produkcji anionu ponadtlenkowego przy udziale substancji wchodzących w bezpośrednią reakcję z  $O_2^-$ . Wykorzystano w tym celu dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz antagonistę dysmutazy ponadtlenkowej (DETC). SOD jest enzymem katalizującym reakcję syntezy nadtlenku wodoru. Reakcja ta, zużytkowując anion ponadtlenkowy i cząsteczkę wody, w naturalny sposób usuwa  $O_2^-$  z ustroju. Produkcja anionu ponadtlenkowego była istotnie hamowana przy użyciu dysmutazy ponadtlenkowej (o ok. 50%) tylko w przypadku szczurów SHR. Znamienne wzrost produkcji  $O_2^-$  zachodził w obecności DETC zarówno u szczurów SHR (wzrost 43%) jak i WKY (52%) (Ryc. IV.4). Może to świadczyć o istotnej roli występującej w naczyniach krwionośnych dysmutazy ponadtlenkowej w utrzymaniu prawidłowego potencjału oksydoredukcyjnego.



Ryc IV.4. Źródła anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych. Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z inhibitorem dysmutazy ponadtlenkowej (DETC; 100 $\mu$ M), lub z dysmutazą ponadtlenkową (SOD; 100 $\mu$ M) przez 30-45 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 9-10 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiedź bez inhibitora.

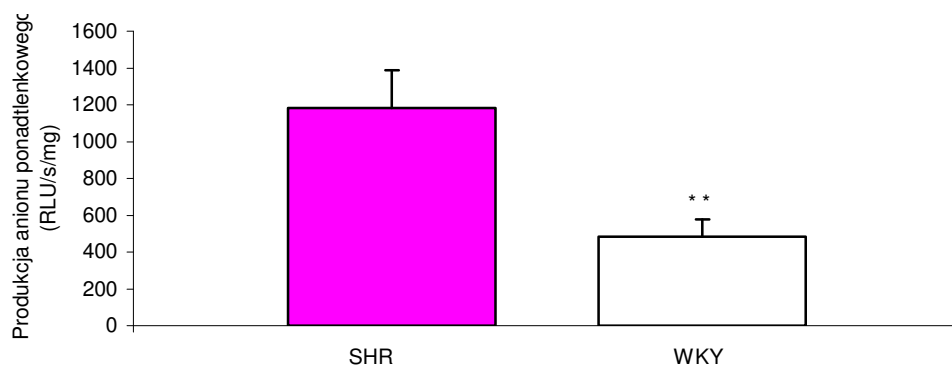
#### IV.1.2.2. Produkcja anionu ponadtlenkowego w warunkach stresu oksydacyjnego

*Stres oksydacyjny indukowano eksperymentalnie poprzez podanie NAD(P)H (100  $\mu$ M) do buforu, w którym znajdowały się badane naczynia. NAD(P)H jest substratem i aktywatorem oksydazy NAD(P)H.*

Wytworzenie stresu oksydacyjnego spowodowało przyrost produkcji anionu ponadtlenkowego w stosunku do kontroli. W przypadku SHR był to 40-krotny wzrost, a w przypadku WKY ok. 25-krotny (porównanie danych Ryc.IV.1 i Ryc.IV.5).

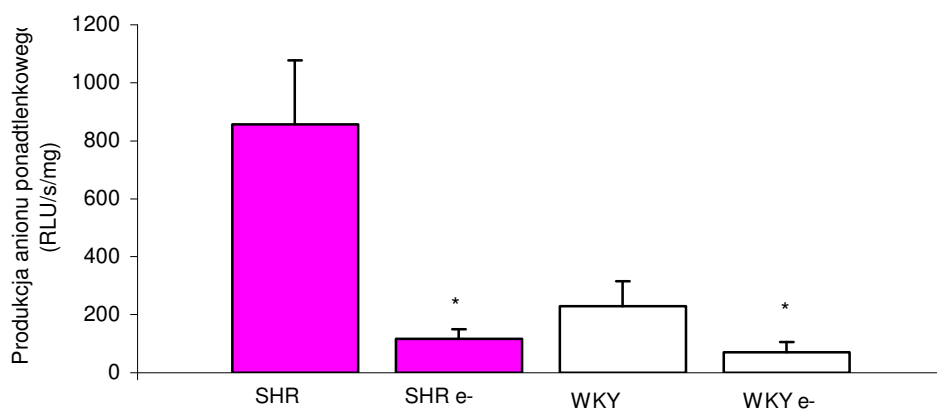
Produkcja anionu ponadtlenkowego była 2,5-krotnie wyższa w aortach uzyskanych od szczurów SHR (1182,1 $\pm$ 206,1) w porównaniu do aort szczurów WKY (484,4 $\pm$ 91,5) (Ryc.IV.5). Swoistość wobec anionu ponadtlenkowego stwierdzano poprzez hamowanie sygnałów chemiluminescencyjnych przez dysmutazę ponadtlenkową (PEG-SOD; 500U/ml) oraz Tiron (10 mM).





Ryc. IV. 5. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych po aktywacji oksydazy NAD(P)H za pomocą NADPH.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu\text{M}$ ). NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu\text{M}$  tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 40 doświadczeń, \*\* p<0,01 SHR vs WKY.

Usunięcie śródbłonna w aortach szczurzych skutkowało znacznym zahamowaniem stymulowanej produkcji anionu ponadtlenkowego (spadek  $\text{O}_2^-$  wynosił odpowiednio: u SHR 87%, a u WKY 70%). Sugeruje to, że w warunkach stresu oksydacyjnego zarówno u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem, jak i u szczurów normotensyjnych, obserwowany nadmiar produkcji anionu ponadtlenkowego w dużym stopniu zależy od obecności śródbłonna (Ryc. IV.6).

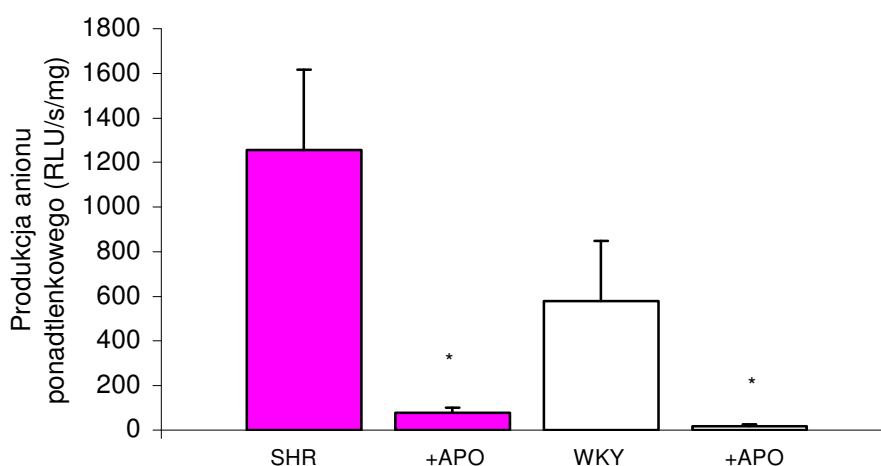


Ryc. IV.6. **Zależność produkcji anionu ponadtlenkowego indukowanego NAD(P)H od obecności śródbłonna.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu\text{M}$ ). Niektóre naczynia pozbawiono śródbłonna (e-). NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu\text{M}$  tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 7 doświadczeń. \* p<0,05 SHR vs SHRe- oraz WKY vs WKYe-.

#### IV.1.2.3. Źródła anionu nadtlenkowego w aortach szczurzych, w warunkach stresu oksydacyjnego

W celu określenia źródeł nadmiaru anionu nadtlenkowego powstającego w warunkach stresu oksydacyjnego, mierzono produkcję anionu nadtlenkowego po preinkubacji naczyń z inhibitorami oksydaz naczyniowych.

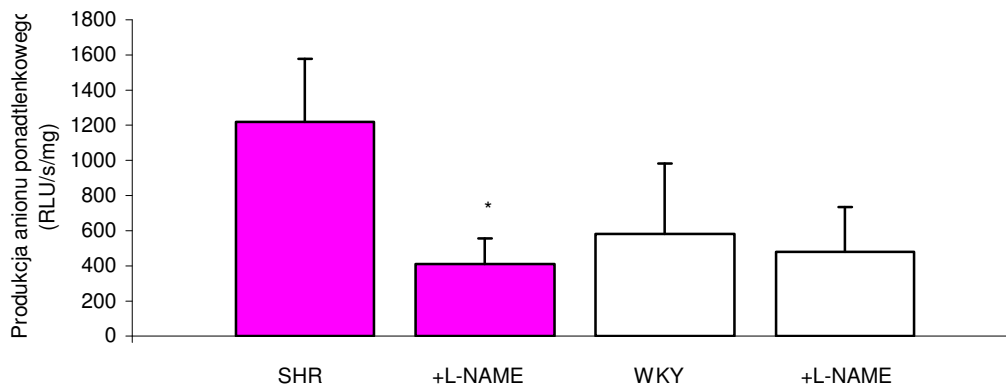
Poprzez poddanie naczyń preinkubacji z inhibitorem oksydazy NAD(P)H (apocynina) uzyskano niemal całkowite zahamowanie produkcji anionu nadtlenkowego indukowanego NAD(P)H (u SHR spadek sięgał 95 %, a u WKY 98%). Wydaje się zatem, że w warunkach stresu oksydacyjnego nadmierna produkcja anionu nadtlenkowego jest w decydującym stopniu zależna od aktywności oksydazy NAD(P)H (Ryc.IV.7).



Ryc. IV.7. Źródła anionu nadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H w aortach szczurzych – wpływ zablokowania NADPH oksydazy (apocynina). Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z apocyniną (100 $\mu$ M) przez 30-45 min, NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 6-7 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs SHR+APO oraz WKY vs WKY+APO.

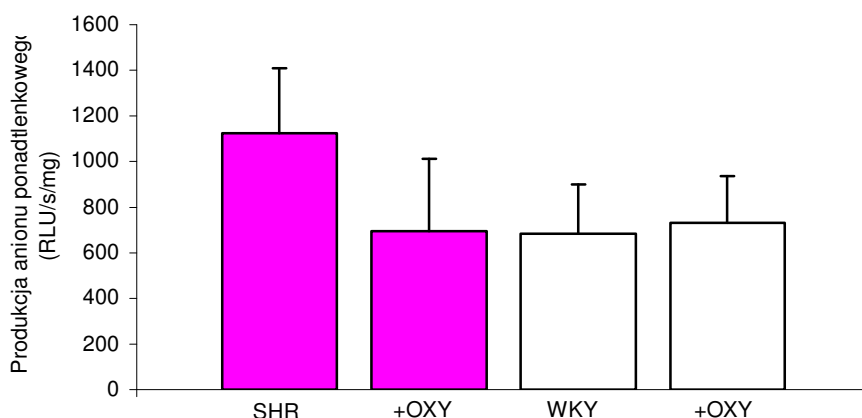
W przypadku zahamowania syntaz tlenu azotu przy pomocy L-NAME uzyskano znaczne zmniejszenie (o 67%) produkcji anionu nadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, ale tylko u SHR. Sugeruje to, że w przypadku szczurów SHR syntaza tlenu azotu może być w warunkach stresu oksydacyjnego jednym ze źródeł anionu nadtlenkowego (Ryc.IV.8). Interesujące, że produkcja anionów nadtlenkowych

przez NOS zachodzi także na drodze tzw. efektu rozprężenia syntazy (patrz wstęp) w przypadku niedoboru tetrahydrobiopteryny.



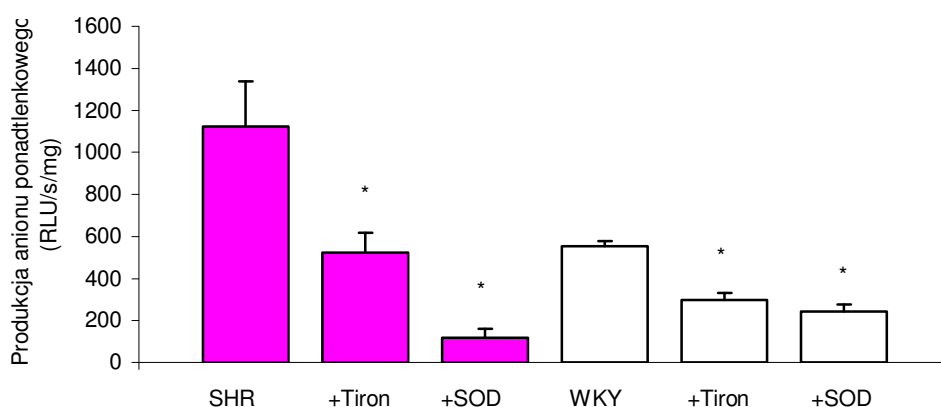
Ryc.IV.8. Źródła anionu ponadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, w aortach szczurzych – wpływ zahamowania syntazy tlenu azotu (L-NAME). Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia preinkubowano z L-NAME (300 $\mu$ M) przez 30-45 min, NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 9-10 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs SHR+L-NAME.

W następstwie preinkubowania naczyń z inhibitorem oksydazy ksantynowej (oksypurynolem) uzyskano co prawda zmniejszenie produkcji anionu ponadtlenkowego u SHR, ale nie była to odpowiedź statystycznie znamienne (Ryc. IV.9).



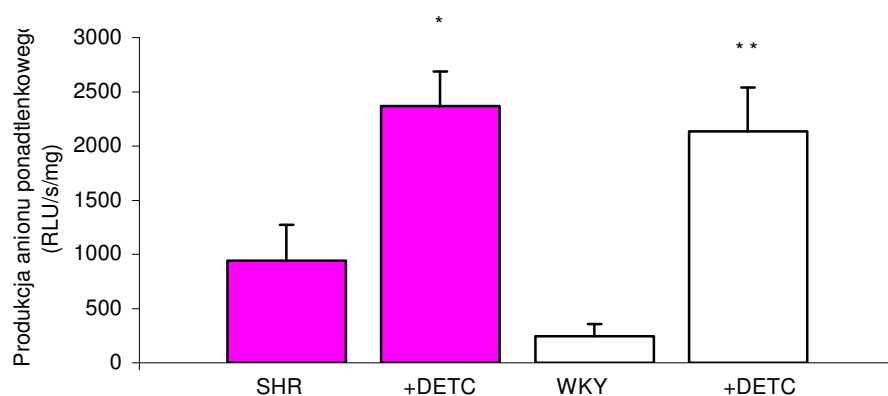
Ryc. IV.9. Źródła anionu ponadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, w aortach szczurzych – wpływ zahamowania oksydazy ksantynowej (oksypurinole) . Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia preinkubowano z oksypurynolem (100 $\mu$ M) przez 30-45 min, NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 9-10 doświadczeń.

Podobnie jak w doświadczeniach przeprowadzonych w warunkach podstawowych również w warunkach stresu oksydacyjnego wykonano eksperymenty z dysmutazą nadtlenkową i jej inhibitorem (DETC). Dodatkowo przeprowadzono doświadczenia z Tironem (SOD mimetyk), powszechnie stosowanym „wymiataczem wolnych rodników” (Ryc. IV.10). W przypadku dysmutazy nadtlenkowej uzyskano spadek produkcji anionu nadtlenkowego o 90% u SHR i o 56% u szczurów WKY. Zastosowanie Tironu spowodowało obniżenie generacji wolnych rodników o 54% u szczurów SHR i o 47% u szczurów WKY.



Ryc. IV.10. Źródła anionu nadtlenkowego w aortach szczurzych – wpływ „wymiatacza wolnych rodników” Tironu oraz dysmutazy nadtlenkowej na poziom zastymulowanej (przez podanie NADPH) produkcji  $O_2^-$ . Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia preinkubowano z Tironem (10mM), inne z SOD (500U/ml) przez 30-45 min. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 8-9 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs SHR +Tiron, SHR vs SHR+SOD, \* p<0,05 WKY vs WKY+Tiron, WKY vs WKY+SOD.

Zaobserwowano wzrost produkcji anionu nadtlenkowego po wcześniejszej inkubacji naczyń z inhibitorem dysmutazy nadtlenkowej (DETC) (Ryc. IV.11). W tętnicach od szczurów SHR uzyskano 61% wzrost  $O_2^-$ , a w przypadku szczurów WKY wzrost ten sięgał aż 89%. Może to, wraz z przedstawionym wcześniej wpływem SOD na zahamowanie nadprodukcji anionu nadtlenkowego, świadczyć o istotnej roli SOD w utrzymaniu prawidłowego potencjału oksydoredukcyjnego w naczyniach krwionośnych w warunkach stresu oksydacyjnego.



Ryc. IV.11. Źródła anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych – wpływ podania inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej (DETC) na poziom zastymulowanej (przez podanie NADPH) produkcji  $O_2^-$ . Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny ( $5 \mu M$ ). Niektóre naczynia preinkubowano z DETC ( $100 \mu M$ ) przez 30-45 min, NAD(P)H dodano uzyskując stężenie  $100 \mu M$  tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z  $n=7$  doświadczeń. \*  $p<0,05$  SHR vs SHR+DETC \*\*  $p<0,01$  WKY vs WKY+DETC.

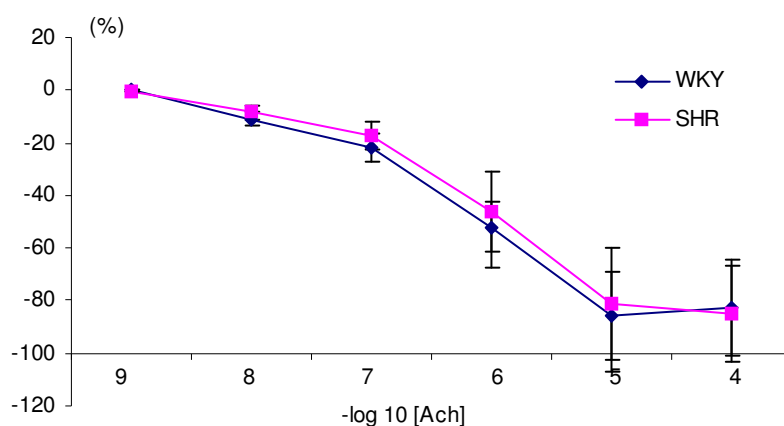
#### IV.1.3. Reakcje naczyniowe w odpowiedzi na stres oksydacyjny badane w aortach zwierząt z nadciśnieniem tętniczym

*Dokonano oceny wpływu stresu oksydacyjnego, a także substancji modulujących jego przebieg, na napięcie ściany naczyń krwionośnych. Stres oksydacyjny wywoływano przy użyciu NAD(P)H. Wykorzystano zwierzęcy model genetycznie uwarunkowanego nadciśnienia tętniczego (szczury SHR/WKY.)*

##### IV.1.3.1 Ocena reakcji naczyniowych w tętnicach przed podaniem NAD(P)H

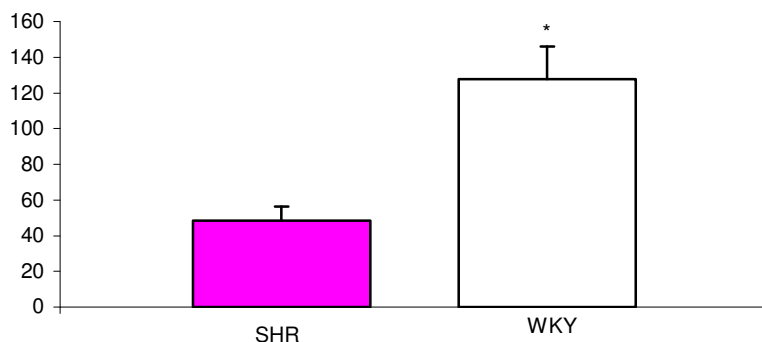
W pierwszym etapie starano się przeanalizować śródbłonkowe odpowiedzi naczyniowe na wzrastające dawki acetylocholiny. Jest to najbardziej akceptowana oraz najczęściej stosowana metoda wykazywania upośledzonej funkcji śródbłonka. Wiadomo, że acetylocholina działając na drodze śródbłonkowo-zależnego uwolnienia tlenu azotu doprowadza do rozkurczu naczyniowego. Zarówno w aortach uzyskanych od szczurów

hipertensyjnych (SHR), jak i w stanowiących dla nich kontrolę aortach zwierząt normotensyjnych (WKY) uzyskano podobne rozkurcze naczyniowe po podaniu acetylocholino (Ryc.IV.12). Również maksymalne odpowiedzi na acetylocholiny nie różniły się istotnie w obrębie obu grup zwierząt (SHR:  $87,9\% \pm 5,6$  vs WKY:  $93,6\% \pm 5,2$ ). Na tej podstawie nie wykazano więc dysfunkcji śródbłonna w naczyniach zwierząt hipertensyjnych.



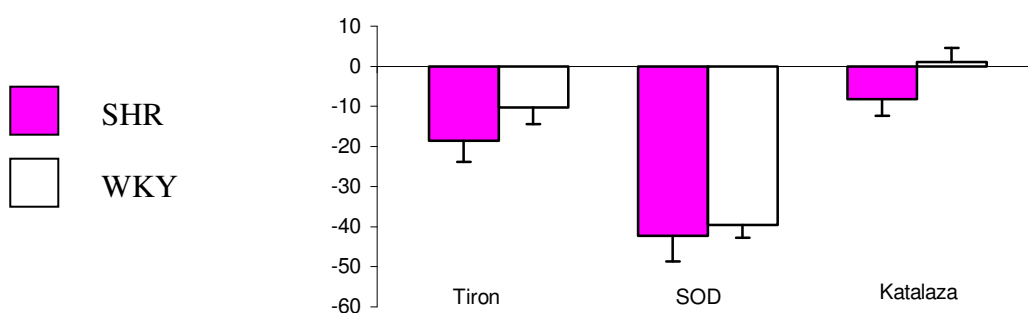
Ryc. IV. 12. **Odpowiedź aort szczurzych na wzrastające dawki acetylocholino.** Naczynia z nieuszkodzonym śródbłonkiem kurczone były fenylefryną ( $0,5\text{-}5\ \mu\text{M}$ ) do napięcia submaksymalnego. Wielkość rozkurczu lub skurczu przedstawiona jest jako % skurczu wywołanego przez fenylefrynę. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z  $n=14\text{-}16$  doświadczeń.

Zaobserwowano jednakże różnicę w odpowiedzi na L-NAME – inhibitor syntaz tlenku azotu. Podanie tego związku skutkowało u szczurów normotensyjnych 2,5 krotnie większym skurczem niż w naczyniach od szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem. Być może świadczy to o dysproporcji w podstawowej produkcji tlenku azotu u obu szczepów (naczynia szczurów WKY produkują więcej NO) oraz potwierdza możliwość upośledzenia czynności śródbłonna naczyń w nadciśnieniu (Ryc.IV.13).



Ryc. IV. 13. **Odpowiedź aort szczurzych na L-NAME.** Naczynia kurczone były fenylefryną (0,5-5  $\mu$ M) do napięcia submaksymalnego, następnie poddane zostały działaniu L-NAME (300 $\mu$ M) przez 20 minut. Wielkość skurczu przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 14-16 doświadczeń, \* p<0.05 SHR vs WKY.

W drugim etapie badań starano się ocenić wpływ wybranych związków regulujących potencjał oksydoredukcyjny tkanek naczyniowych. Jak się wydaje poprzez zmiany w stężeniu wolnych rodników, w tym głównie anionu ponadtlenkowego, powinny one wpływać na całkowitą zawartość tlenu azotu w obrębie naczyń, a co za tym idzie na napięcie ich ścian. Użyto Tiron, dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz katalazę (Ryc. IV.14).



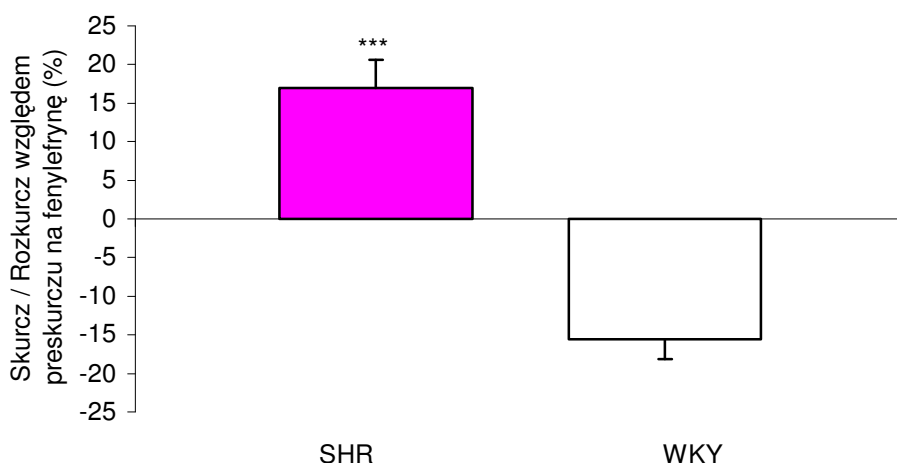
Ryc. IV.14. **Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na podanie: wymiatacza wolnych rodników - Tironu (5mM), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, 100 $\mu$ M) oraz katalazy (1200U/ml.** Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu ww. związków wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 11-12 doświadczeń.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w odpowiedziach naczyniowych na żaden z użytych związków.

#### IV.1.3.2 Ocena reakcji tętnic na stres oksydacyjny

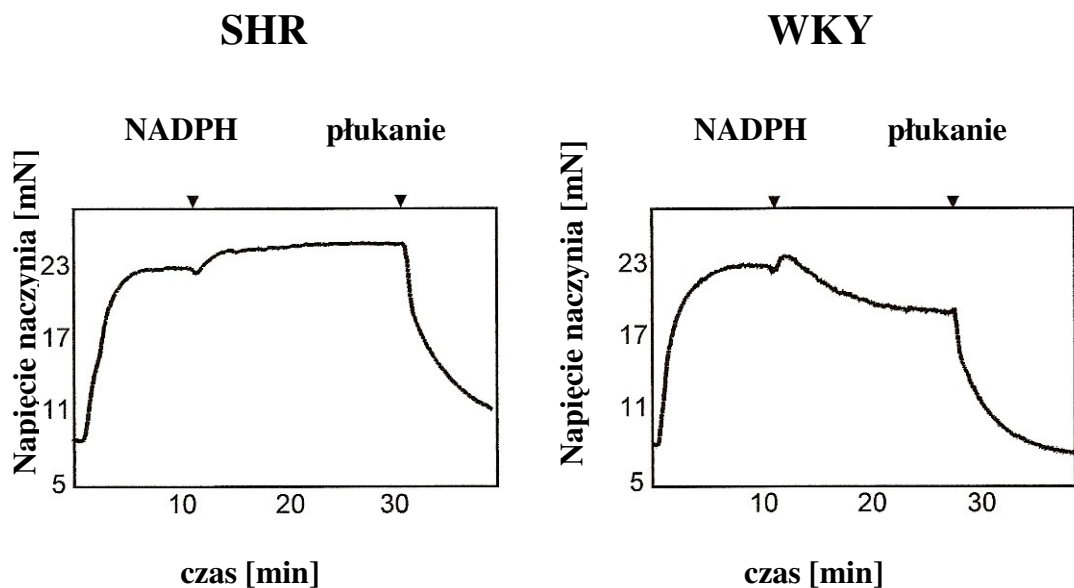
Stres oksydacyjny indukowano eksperymentalnie podobnie jak w przypadku chemiluminescencji, tj. poprzez podanie do buforu, w którym znajdowały się badane naczynia, NAD(P)H w stężeniu do 100  $\mu$ M.

Wytworzenie warunków stresu oksydacyjnego przez podanie NAD(P)H dało znamienne różną i co ważniejsze, jakościowo odmienną naczynioruchową odpowiedź aort szczurów SHR i WKY (Ryc.IV.15.A,B). Podczas gdy w naczyniach uzyskanych od szczurów nadciśnieniowych podanie NAD(P)H powodowało reakcję skurczową (16,95%±2,23), to w naczyniach zwierząt kontrolnych obserwowano rozkurcze (15,57%±2,01). Zatem w warunkach stresu oksydacyjnego naczynia pochodzące od zwierząt z samoistnym nadciśnieniem tętniczym zachowują się zupełnie odmiennie od naczyń pochodzących od zwierząt normotensyjnych.



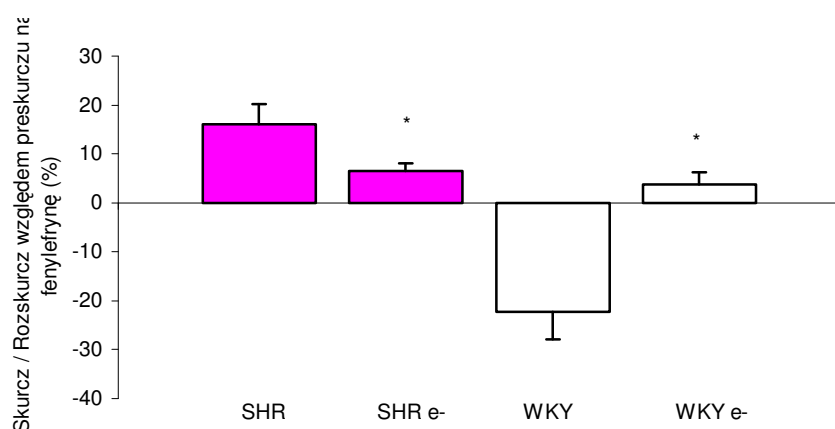
Ryc. IV.15.A. Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu nadadtlenkowego. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100  $\mu$ M tego związku., czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 40 doświadczeń, \* \* \* p<0,001 SHR vs WKY.





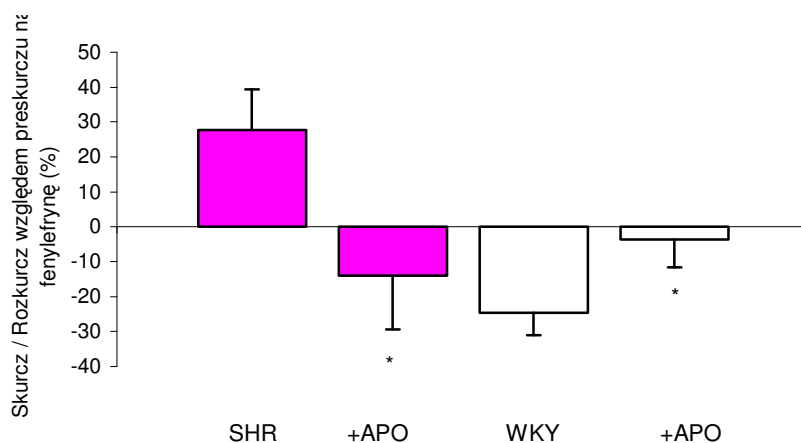
Ryc.IV.15.B. Przykładowe odpowiedzi aort szczurzych na NAD(P)H-zależną produkcję anionu nadadtlenkowego. Naczynia przykurczano wstępnie fenylefryną, NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. W przypadku szczurów SHR charakterystyczna była reakcja skurczowa na NADPH (wzrost napięcia naczyniowego), podczas gdy w przypadku szczurów WKY obserwowano rozkurcze (spadek napięcia naczyniowego).

W celu wykazania śródbłonkowego charakteru obserwowanych reakcji naczyniowych aorty uzyskane od szczurów SHR i szczurów WKY pozbawiane były śródbłonka. Wykazano, że w przypadku NAD(P)H-zależnych reakcji naczyniowych (zarówno skurczów jak i rozkurczów) kluczową rolę pełni obecność nienaruszonego śródbłonka (Ryc.IV.16).



Ryc.IV.16. Zależność zmian napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu nadadtlenkowego od obecności nienaruszonego śródbłonka. Skuteczność zabiegu mechanicznego usunięcia śródbłonka potwierdzano za pomocą zmiany odpowiedzi na acetylocholiny (z rozkurczowej do skurczowej). Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku, czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 8 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

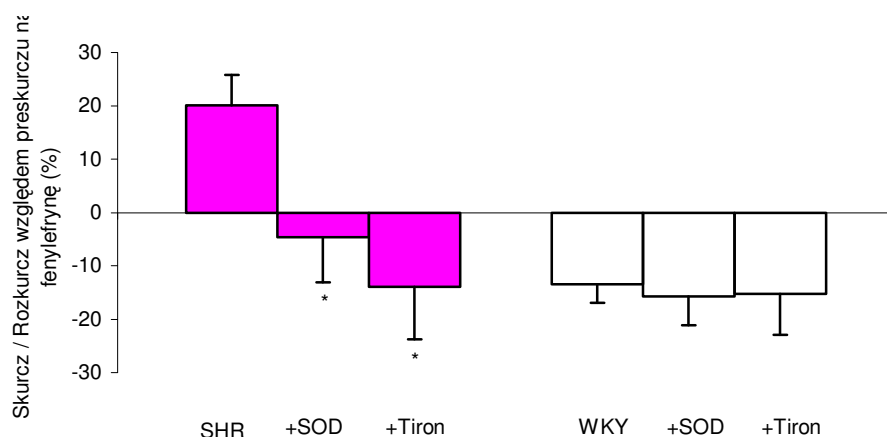
W celu scharakteryzowania zjawiska zróżnicowanej odpowiedzi naczyń na NAD(P)H poddano aorty działaniu apocyniny – swoistego inhibitora oksydazy NAD(P)H. (Ryc.IV.17).



Ryc.IV.17. Wpływ zahamowania oksydaz NADPH (apocynina, APO) na NADPH-zależne reakcje naczyniowe. Wielkość skurczu (+) lub rozkurczu (-) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Zarówno NADPH, jak i APO dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M, czas inkubacji z APO jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 7-9 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna..

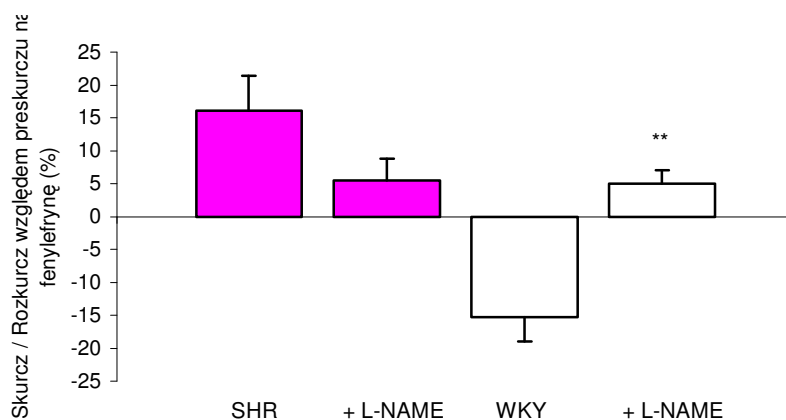
W wyniku preinkubacji naczyń SHR z apocyniną uzyskano po podaniu NAD(P)H konwersję skurczów naczyniowych w rozkurcze. Wynika z tego, że skurcz naczyń po NAD(P)H jest zależny od aktywności oksydazy NAD(P)H. Co ciekawe, również rozkurcz naczyń od szczurów normotensyjnych obserwowany po podaniu NAD(P)H jest zależny w dużym stopniu od aktywności oksydazy NAD(P)H, bowiem apocynina powoduje zmniejszenie rozkurczu o 85%.

Dodatkowo przeprowadzono eksperymenty z dysmutazą ponadtlenkową (SOD) i Tironem (Ryc.IV.18). Stwierdzono, że w przypadku naczyń hipertensyjnych obserwowany skurcz na NAD(P)H jest także wynikiem nadprodukcji anionu ponadtlenkowego.

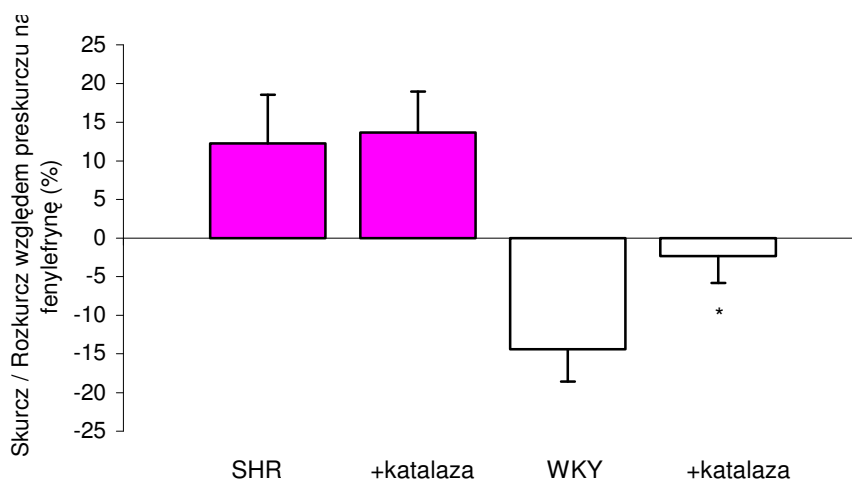


Ryc.IV.18. Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego - wpływ dysmutazy ponadtlenkowej i Tironu. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NADPH dodano w stężeniu 100 $\mu$ M, SOD (dysmutaza ponadtlenkowa) 300 U/ml, a Tiron 10mM. Zarówno czas inkubacji z SOD, z Tironem jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 7-9 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

W celu scharakteryzowania NAD(P)H-zależnych rozkurczów, obserwowanych w naczyniach normotensyjnych, przeprowadzono doświadczenia z L-NAME (Ryc.IV.19) i katalazą (Ryc.IV.20). Pierwsze miały wykazać udział tlenu azotu, drugie nadtlenu wodoru w opisywanym zjawisku (NO i nadtlenek wodoru są najczęstszą, wymienianą w piśmiennictwie przyczyną śródbłonkowych rozkurczów naczyniowych).

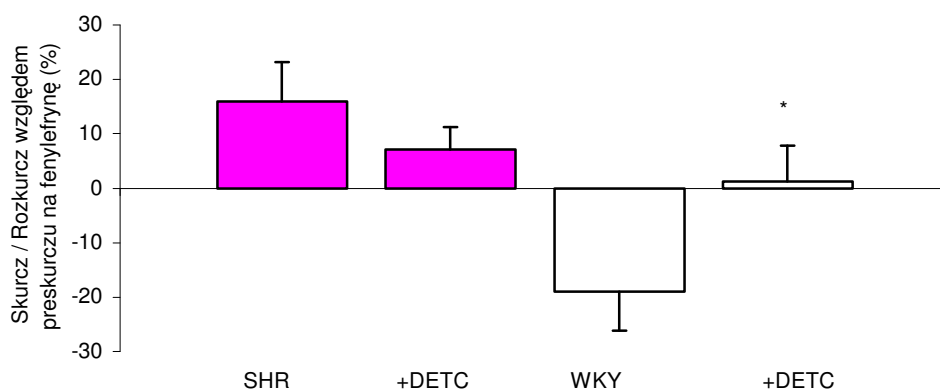


Ryc.IV.19. Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego - wpływ zahamowania syntaz tlenu azotu. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M., a L-NAME uzyskując stężenie 300  $\mu$ M, zarówno czas inkubacji z L-NAME jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 15-16 doświadczeń, \*\* p<0,01 SHR vs odpowiedź kontrolna.



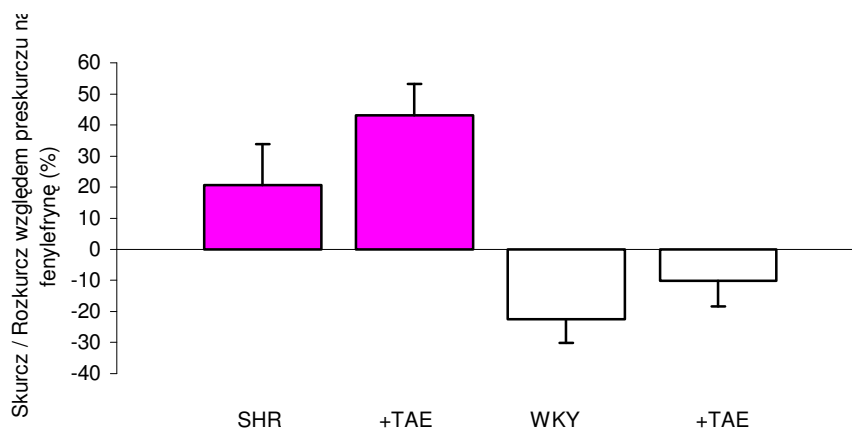
Ryc.IV.20. Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego – wpływ katalazy. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100µM, a katalazę uzyskując stężenie 1200 U/ml, czas inkubacji z katalazą jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 12-12 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs odpowiedź kontrolna.

Wydaje się, że w rozkurcze aort szczurów normotensyjnych (WKY) zaangażowane są zarówno tlenek azotu, jak i nadtlenek wodoru. Udział nadtlenu wodoru został potwierdzony przy użyciu DETC – inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej. Po zastosowaniu tego związku zostały zahamowane rozkurcze na NAD(P)H zwierząt normotensyjnych (Ryc.IV.21).



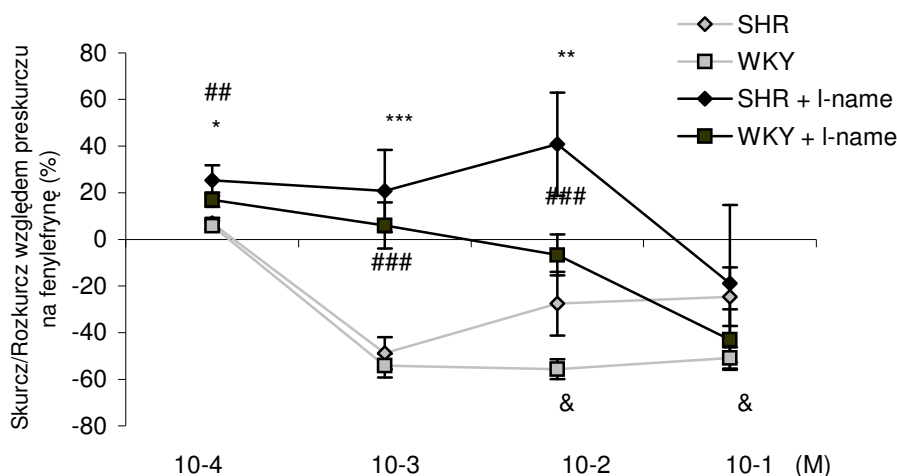
Rys.IV.21. Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego – wpływ inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej (DETC). Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Zarówno NADPH jak i DETC dodano uzyskując stężenie 100µM, czas inkubacji z DETC jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 8-10 doświadczeń, \* p<0,05 SHR vs odpowiedź kontrolna.

Ze względu na stwierdzony powyżej udział nadtlenu wodoru w NAD(P)H-zależnych rozkurczach naczyniowych próbowano ustalić rolę kanałów potasowych w tym zjawisku (jest to jeden z postulowanych mechanizmów działania nadtlenu wodoru) (Ryc.IV.22). Nie udało się wykazać istotnego zahamowania odpowiedzi naczyniowych przy użyciu TEA – swoistego inhibitora kanałów potasowych (jakkolwiek pewien trend był widoczny).



Ryc.IV.22. Zmiany napięcia aort szczurzych w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego - wpływ inhibitora kanałów potasowych (TEA). Wielkość skurczu lub rozkurczu przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100µM, a TEA (tetraethylamonium) uzyskując stężenie 5mM, zarówno czas inkubacji z TEA jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 9 doświadczeń

Jak wykazały powyższe eksperymenty w powstawaniu NAD(P)H zależnych rozkurczów naczyń szczurów normotensyjnych biorą udział zarówno nadtlenek wodoru, jak i tlenek azotu. W celu wykazania, czy związki te działają zupełnie od siebie niezależnie, czy też wpływają wzajemnie na siebie wykonano doświadczenia z egzogennym nadtlenkiem wodoru po inkubacji naczyń z L-NAME (Ryc. IV.23). Wydaje się, że mechanizmy rozkurczów wywołanych nadtlenkiem wodoru polegają, przynajmniej w części, na uwalnianiu tlenu azotu.

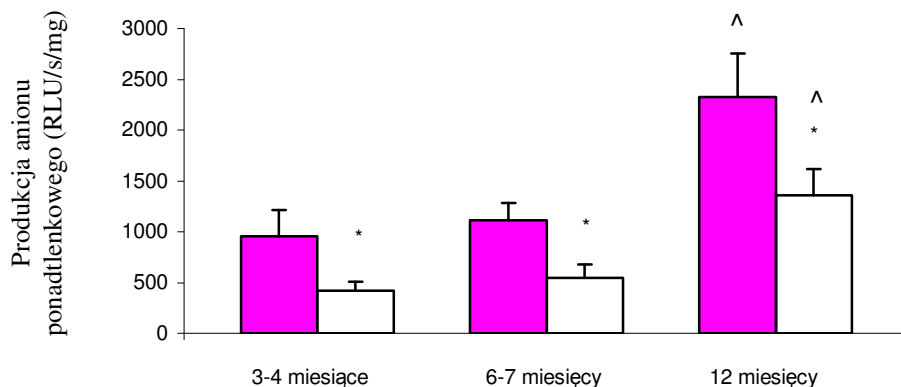


Ryc.IV. 23. **Odpowiedź naczyniowa na wzrastające dawki nadtlenu wodoru.** Naczynia z nietkniętym śródbłonkiem przykurczone były fenylefryną (0,5-5  $\mu$ M) do napięcia submaksymalnego. Wielkość rozkurczu lub skurczu przedstawiona jest jako % skurczu wywołanego przez fenylefrynę. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 8-10 doświadczeń. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 SHR vs l-name, ## p<0,01; ### p<0,001 WKY vs l-name, & p<0,05 SHR vs WKY.

#### IV.1.4. Wpływ wieku zwierząt na odpowiedzi naczyniowe w modelu samoistnego nadciśnienia tętniczego

*W podrozdziale tym dokonano oceny wpływu wieku na niektóre reakcje naczyniowe. W tym celu wykorzystano zwierzęcy model nadciśnienia samoistnego: szczury SHR/WKY. W odróżnieniu od poprzednich podrozdziałów przedstawione tutaj wyniki dotyczą również szczurów starszych tj. 6 i 12 miesięcznych (w poprzednich podrozdziałach były to wyłącznie szczury 3-4 miesięczne).*

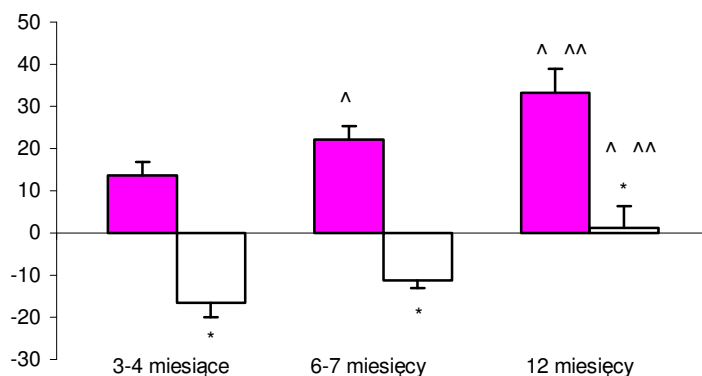
W badaniach podstawowej produkcji anionu nadadtlenkowego nie zaobserwowano znamienych różnic pomiędzy naczyniami uzyskanymi z różnych grup wiekowych (dane nie przedstawione). Podczas aktywacji oksydazy NAD(P)H uzyskano znamieny wzrost produkcji  $O_2^-$  dopiero w przypadku zwierząt rocznych. Poziom produkcji anionu nadadtlenkowego u zwierząt 3 miesięcznych i 6 miesięcznych nie różnił się istotnie (Ryc.IV.24)



Ryc. IV. 24. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych po aktywacji NAD(P)H oksydazy – wpływ starzenia się zwierząt.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). NADPH dodano w stężeniu 100 $\mu$ M. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 10 (w każdej grupie), \* p<0,01 SHR vs rówieśnicy WKY; ^ p<0,05 SHR, WKY 12 miesięczne vs zwierzęta 3-4 miesięczne.

W badaniach odpowiedzi naczyniowych istotną różnicę, w porównaniu z kontrolą, w maksymalnych odpowiedziach na acetylocholinę wykazano u szczurów rocznych (SHR: 76,9%  $\pm$  2,3 vs WKY: 65,8%  $\pm$  2,06 p<0,05). Podobnej reakcji nie wykazano u szczurów młodszych, zarówno trzy-, jak i sześćo-miesięcznych. Wydaje się zatem, że z użyciem acetylocholinę dopiero u rocznych szczurów SHR możliwe jest zaobserwowanie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego.

W reakcjach naczyniowych na NAD(P)H znamienne różnice wykazano dla starszych grup wiekowych. Ośmielam się więc twierdzić, że w wyniku starzenia się zwierząt obserwujemy zwiększającą się tendencję do skurczowych odpowiedzi na NAD(P)H. W ten sposób w grupie zwierząt rocznych mamy już wyłącznie odpowiedzi skurczowe, nawet u szczurów normotensyjnych (Ryc.IV.25).



Ryc. IV.25. Zmiany napięcia mięśniowego w aortach szczurzych w odpowiedzi na NADPH w zależności od wieku zwierząt. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100  $\mu$ M, czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 10 (w każdej grupie), \* p<0,05 SHR vs kontrola WKY w tym samym wieku ; <sup>^</sup> p<0,05 SHR, WKY vs SHR, WKY poprzedzającej grupy wiekowej, <sup>^^</sup> p<0,05 SHR, WKY roczne vs SHR, WKY 3-4 miesięczne.

## IV.2. Określenie źródeł i znaczenia produkcji anionu nadadtlenkowego w naczyniach ludzkich

*Dokonano próby analizy mechanizmów leżących u podstaw dysfunkcji śródbłonna i stresu oksydacyjnego w naczyniach pacjentów poddanych zabiegowi pomostowania aortalno-wieńcowego. Szczególną uwagę zwrócono na naczynia pacjentów, u których wśród czynników ryzyka choroby wieńcowej występowało nadciśnienie tętnicze.*

### IV.2.1. Charakterystyka kliniczna pacjentów biorących udział w doświadczeniach

W badaniach wzięło udział 160 pacjentów poddanych zabiegowi pomostowania aortalno-wieńcowego. Tętnice piersiowe wewnętrzne uzyskano od 105 pacjentów ( 73 mężczyzn i 32 kobiet), a żyły odpiszczelowe uzyskano od 136 pacjentów (95 mężczyzn i 41 kobiet). W większości przypadków tętnice i żyły pochodziły od tego samego pacjenta. Najważniejsze kliniczne i demograficzne cechy badanej grupy przedstawiono w Tabeli IV.1. Wśród czynników klinicznych branych pod uwagę w charakterystyce grupy były:

- palenie papierosów - obecnie lub w ciągu ostatnich 6 miesięcy – dane z wywiadu
- hipercholesterolemia – całkowity poziom cholesterolu > 4,8 mM w ciągu ostatnich 6 miesięcy – pomiar przed zabiegiem oraz dane od lekarza rodzinnego
- cukrzyca – glukoza na czczo > 5,5 mM lub leczenie cukrzycy



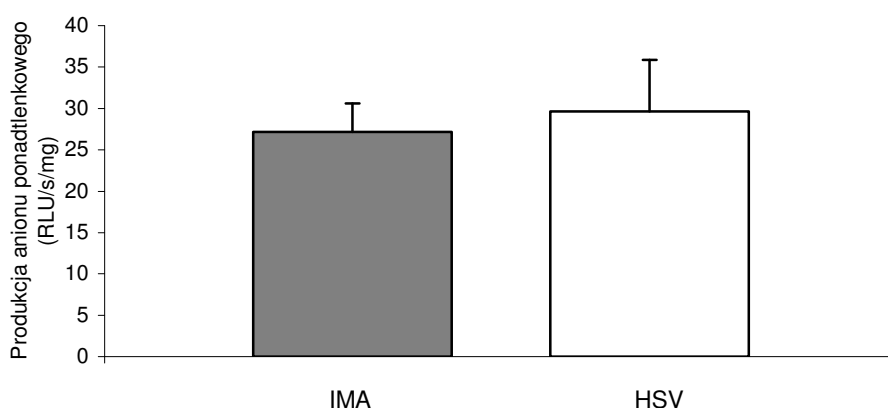
- nadciśnienie tętnicze – RR > 140/90 mmHg w co najmniej 6 niezależnych pomiarach w ciągu ostatnich 6 miesięcy lub leczenie nadciśnienia – dane od lekarza rodzinnego
- nadwaga – BMI > 25 (kg/m<sup>2</sup>)– dane przed zabiegiem

W badanej grupie chorych w każdym przypadku stwierdzano co najmniej jeden z analizowanych czynników ryzyka miażdżycy.

Tabela IV.1. Charakterystyka kliniczna i demograficzna analizowanej grupy chorych. Liczby w nawiasach oznaczają procent z całkowitej grupy badanych.	
	N (%)
Liczba badanych	160
Wiek (lat; średnia $\pm$ SEM)	67 $\pm$ 8,2
Płeć (M:K)	102:58 (63,8:36,2)
Czynniki ryzyka:	
Palenie papierosów	67 (41,8)
Nadciśnienie	119 (74,3)
Cukrzyca	38 (23,7)
Hipercholesterolemia	82 (51,2)
Nadwaga	87 (54,3)
Leki:	
$\beta$ -blokery	72 (45)
Aspiryna	160 (100)
Nitraty	160 (100)
Statyny	160 (100)
Ca <sup>++</sup> blokery	53 (33,6)
ACE inhibitory	160 (100)

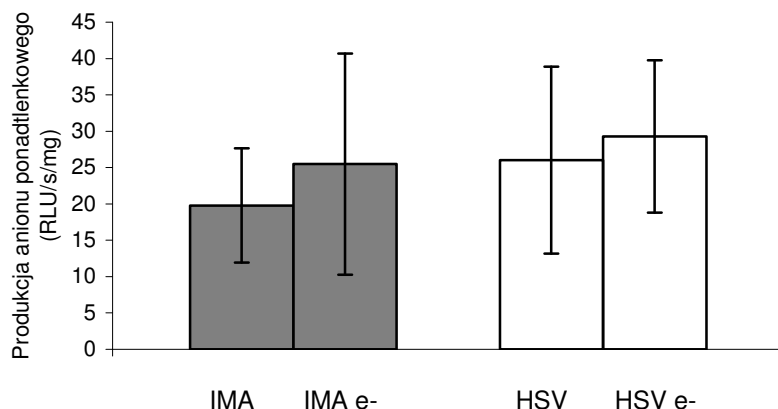
#### IV.2.2. Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich

Podstawowa produkcja anionu ponadtlenkowego mierzona za pomocą chemiluminescencji nie różniła się istotnie w żyłach odpiszczelowych w porównaniu z tętnicami piersiowymi wewnętrznymi (HSV  $29,63 \pm 1,86$ ; IMA  $27,15 \pm 3,45$ ) (Ryc.IV.26). Tożsamość anionu ponadtlenkowego stwierdzano poprzez hamowanie sygnałów chemiluminescencyjnych przez dysmutazę ponadtlenkową (PEG-SOD; 500U/ml) oraz Tiron (10 mM).



Ryc. IV.26. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Dane przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM z n= 80 doświadczeń, IMA: tętnica piersiowa wewnętrzna; HSV: żyła odpiszczelowa .

Usunięcie śródbłónka w naczyniach ludzkich nie powodowało znamienych różnic w produkcji anionu ponadtlenkowego (Ryc.IV.27). Być może wynika to stąd, iż produkcja anionu ponadtlenkowego jest skutecznie maskowana jednoczasową produkcją tlenu azotu. Usunięcie śródbłónka powoduje zahamowanie produkcji zarówno  $O_2^-$ , jak i NO.

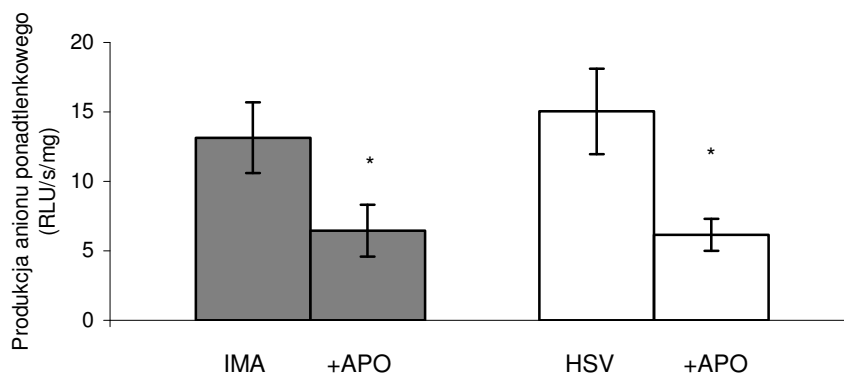


Ryc. IV.27. **Zależność produkcji anionu ponadtlenkowego od obecności śródbłonna.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń mechanicznie pozbawiono śródbłonna (e-). Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 9 doświadczeń. IMA: tętnica piersiowa wewnętrzna; HSV: żyła odpiszczelowa .

#### IV.2.2.1. Źródła anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich

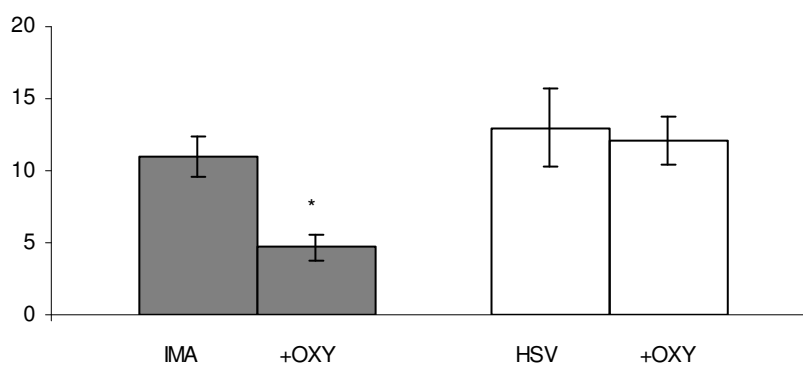
W celu określenia źródeł anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich mierzono produkcję anionu ponadtlenkowego po preinkubacji naczyń z inhibitorami głównych oksydaz naczyniowych. Aktualnie uważa się (78), że podstawową rolę w generowaniu naczyniowego anionu ponadtlenkowego odgrywają trzy oksydazy: oksydaza NAD(P)H, oksydaza ksantynowa oraz syntaza tlenu azotu. W celu ustalenia stopnia w jakim ww. oksydazy są zaangażowane w biologii ludzkich naczyń krwionośnych przeanalizowano wpływ zahamowania każdej z nich oddzielnie.

Po zastosowaniu apocyniny – swoistego inhibitora oksydazy NAD(P)H, uzyskano znaczny spadek podstawowej produkcji anionu ponadtlenkowego (Ryc.IV.28). Spadek ten w przypadku tętnic piersiowych wewnętrznych wynosił 51%, a w przypadku żył odpiszczelowych 60%.



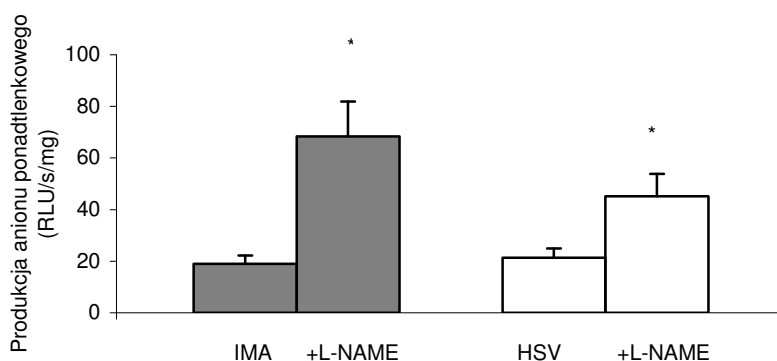
Ryc. IV.28. Źródła anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich – wpływ zablokowania NADPH oksydazy apocynina. Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z apocyniną (100 $\mu$ M) przez 30-45 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 6-7 doświadczeń, \* p<0,05 vs kontrola.

W przypadku zahamowania oksydazy ksantynowej przy użyciu oxypurinołu obserwowano znaczny spadek (58%) podstawowego uwalniania anionu ponadtlenkowego, ale tylko w naczyniach tętniczych (Ryc.IV.29). Każe to przypuszczać, że w ludzkich naczyniach tętniczych oksydaza ksantynowa współuczestniczy z oksydazą NAD(P)H w generacji anionu ponadtlenkowego.



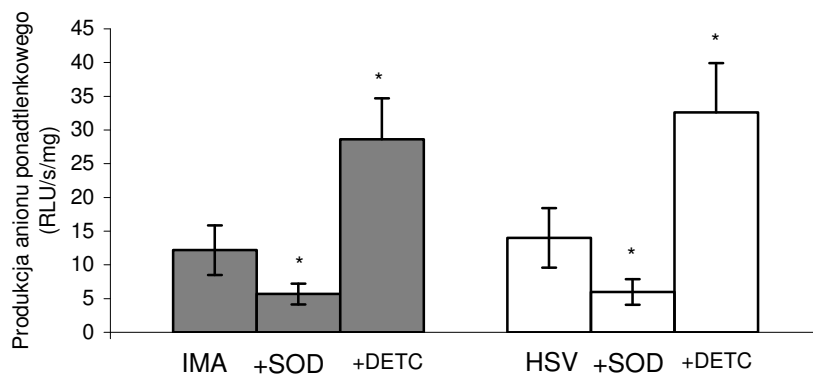
Ryc. IV.29. Źródła anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich – wpływ zablokowania oksydazy ksantynowej oksypurinołem. Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia preinkubowano z oksypurinołem (100 $\mu$ M) przez 30-45 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 6-7 doświadczeń, \* p<0,05 vs kontrola.

Wreszcie, po użyciu inhibitora syntaz tlenku azotu (L-NAME) uzyskano znaczny wzrost generacji anionu ponadtlenkowego, szczególnie zaznaczony w naczyniach tętniczych (ponad 3-krotny w IMA) (Ryc.IV.30). Potwierdza to rolę syntazy tlenku azotu w produkcji NO, który wchodząc w reakcje z anionem ponadtlenkowym zmniejsza jego stężenie i tym samym niekorzystne działanie (patrz wstęp).



Ryc. IV.30. Źródła anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich – wpływ zablokowania syntaz tlenku azotu przez L-NAME. Pomiary wykonano przy użyciu chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z L-NAME (300 $\mu$ M) przez 30-45 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 10-12 doświadczeń, \* p<0,05 vs kontrola

Produkcja anionu ponadtlenkowego była znamienne hamowana przy użyciu dysmutazy ponadtlenkowej zarówno w przypadku tętnic piersiowych wewnętrznych (o 54%), jak i żył odpiszczelowych (o 58%). Zastosowanie inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej (DETC) znacznie wzmacniało produkcję anionu ponadtlenkowego (Ryc.IV.31). Dowodzi to istotnej roli dysmutazy ponadtlenkowej w utrzymaniu prawidłowego potencjału oksydoredukcyjnego w naczyniach.



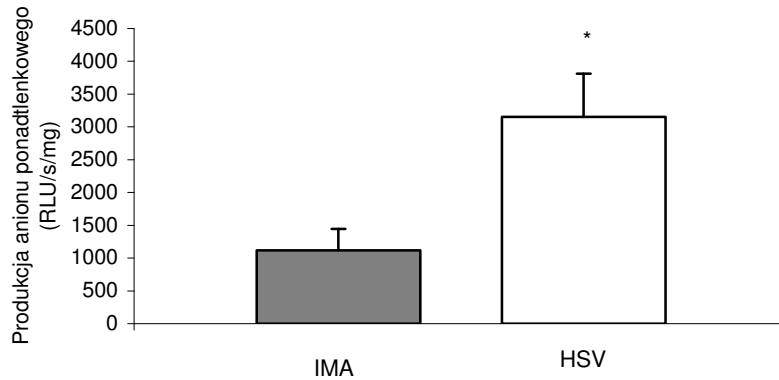
Ryc IV.31. **Źródła anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich.** Do pomiarów wykorzystano chemiluminescencję zależną od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z inhibitorem dysmutazy ponadtlenkowej (DETC; 100 $\mu$ M), jeszcze inne z dysmutazą ponadtlenkową (SOD; 100 $\mu$ M) przez 30-45 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 9-10 doświadczeń, \* p<0,05 vs kontrola.

#### IV.2.2.2. Produkcja anionu ponadtlenkowego w warunkach stresu oksydacyjnego

*Stres oksydacyjny wywoływano za pomocą stymulacji oksydazy NAD(P)H przez podanie NADPH.*

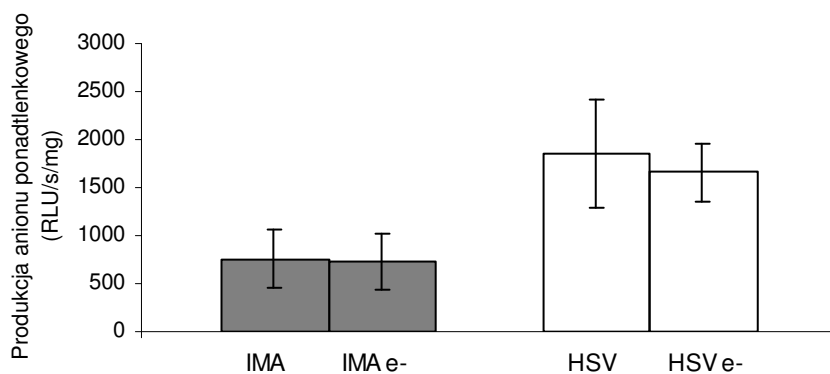
Zainicjowanie stresu oksydacyjnego powodowało przyrost produkcji anionu ponadtlenkowego. W tętnicach piersiowych wewnętrznych był to 40-krotny wzrost, a w przypadku żył odpiszczelowych ok. 110-krotny (porównanie danych Ryc.IV.26 i Ryc.IV.32).

Produkcja anionu ponadtlenkowego mierzona po aktywacji oksydazy NAD(P)H była około 2,8-krotnie wyższa w żyłach odpiszczelowych HSV (3152,1 $\pm$ 658) w porównaniu z tętnicami piersiowymi wewnętrznymi IMA (1116,2 $\pm$ 326) (Ryc.IV.32). Tożsamość anionu ponadtlenkowego potwierdzano poprzez hamowanie sygnałów chemiluminescencyjnych przez dysmutazę ponadtlenkową (PEG-SOD; 500U/ml) oraz Tiron (10 mM).



Ryc. IV. 32. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich po aktywacji NAD(P)H oksydazy za pomocą NADPH.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 80 doświadczeń, \* p<0,01 IMA vs HSV.

Usunięcie śródbłonna w naczyniach ludzkich nie spowodowało znamienych różnic w produkcji anionu ponadtlenkowego indukowanego przez NAD(P)H (Ryc.IV.33).

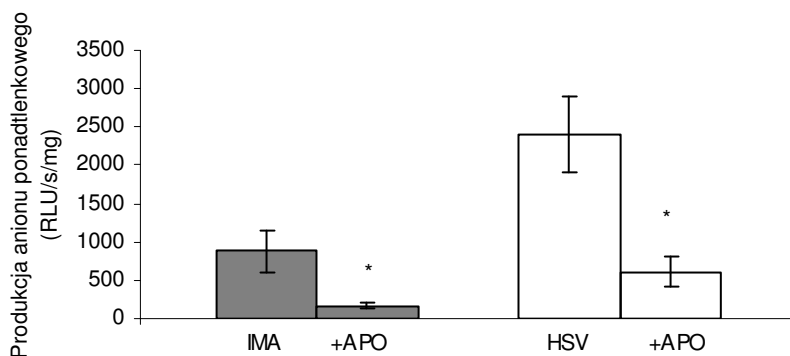


Ryc. IV.33.**Zależność produkcji anionu ponadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, od obecności śródbłonna.** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia sztucznie pozbawiono śródbłonna (e-). NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 10 doświadczeń. \* p<0,05 IMA vs IMA e- oraz HSV vs HSV e-.

#### IV.2.2.3. Źródła anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich podczas stresu oksydacyjnego

W celu określenia źródeł nadmiaru anionu ponadtlenkowego powstającego w warunkach stresu oksydacyjnego, mierzono produkcję anionu ponadtlenkowego po preinkubacji naczyń z inhibitorami oksydaz naczyniowych.

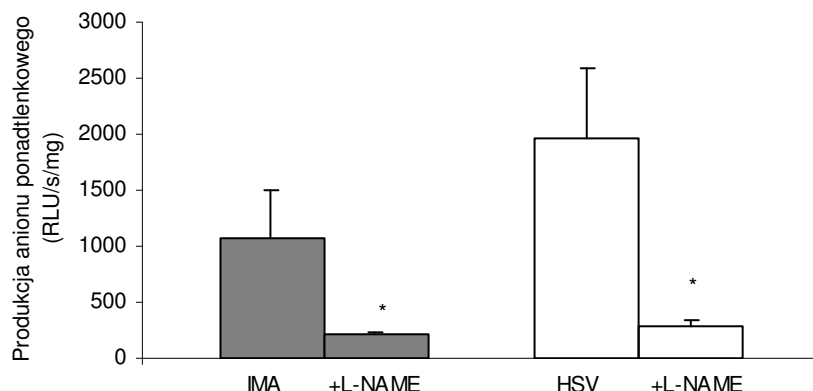
Po preinkubacji naczyń z inhibitorem oksydazy NAD(P)H (apocynina) uzyskano znaczne zahamowanie produkcji anionu ponadtlenkowego indukowanego podaniem NAD(P)H. W tętnicach spadek ten sięgał 81 %, a w żyłach 75%. Wydaje się zatem, że w warunkach stresu oksydacyjnego nadmierna produkcja anionu ponadtlenkowego jest w decydującym stopniu zależna od aktywności oksydazy NAD(P)H (Ryc.IV.34).



Ryc. IV.34. Źródła anionu ponadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, w naczyniach ludzkich – wpływ zablokowania NADPH oksydazy apocyniną. Pomiary wykonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z apocyniną (100 $\mu$ M) przez 30-45 min, NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 6-7 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

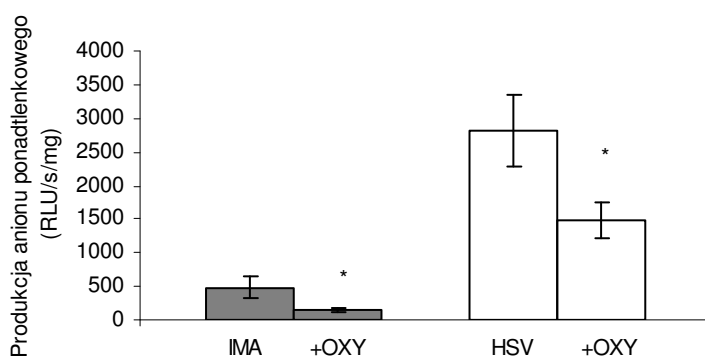
Po zahamowaniu syntaz tlenku azotu przy pomocy L-NAME uzyskano znamienne zmniejszenie produkcji anionu ponadtlenkowego zarówno w tętnicach (o 80%), jak i w żyłach (o 86%). Sugeruje to, że w warunkach stresu oksydacyjnego jednym ze źródeł anionu ponadtlenkowego może być także syntaza tlenku azotu (Ryc.IV.35) (efekt znany jako tzw. rozprężenie syntazy NO).





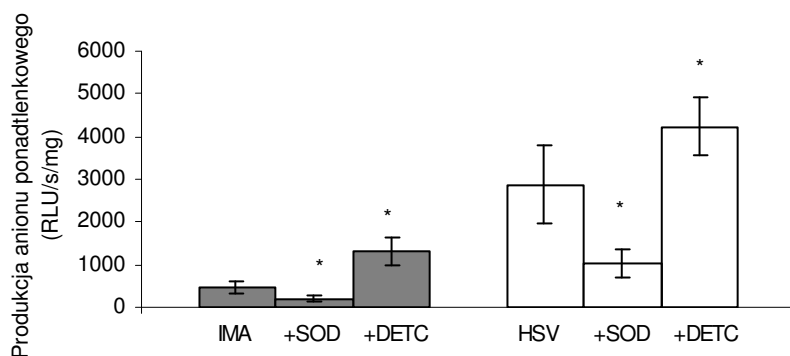
Ryc.IV.35. Źródła anionu nadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, w naczyniach ludzkich – wpływ zahamowania syntazy tlenu azotu (L-NAME). Pomiary wykonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z L-NAME (300 $\mu$ M) przez 30-45 min., NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 12-13 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

W następstwie preinkubowania naczyń z inhibitorem oksydazy ksantynowej - oksypurynolem - uzyskano znaczne zmniejszenie produkcji anionu nadtlenkowego w tętnicach i żyłach (Ryc.IV.36). Świadczy to, że w warunkach stresu oksydacyjnego również układ oksydazy ksantynowej odgrywa ważną rolę w nadprodukcji anionu nadtlenkowego.



Ryc. IV.36. Źródła anionu nadtlenkowego, indukowanego NAD(P)H, w naczyniach ludzkich – wpływ zahamowania oksydazy ksantynowej (oxypurinol) . Pomiary wykonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Część naczyń preinkubowano z oxypurynolem (100 $\mu$ M) przez 30-45 min., NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 12 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

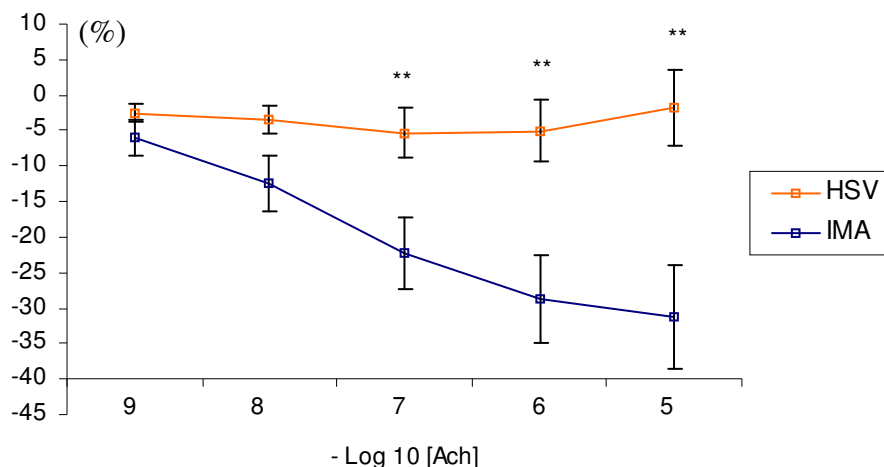
Po preinkubacji z DETC (inhibitor SOD) i następnie podaniu NAD(P)H zaobserwowano dodatkowy wzrost wytwarzania anionu ponadtlenkowego. Dysmutaza ponadtlenkowa *per se* powodowała spadek indukowanej produkcji  $O_2^-$  w żyłach o 64% i tętnicach o 55% (Ryc.IV.37) Może to świadczyć o znaczącej roli SOD w utrzymaniu prawidłowego potencjału oksydoredukcyjnego w naczyniach ludzkich.



Ryc. IV.37. Źródła anionu ponadtlenkowego w aortach szczurzych – wpływ dysmutazy ponadtlenkowej oraz inhibitora dysmutazy (DETC) na poziom zastymulowanej (przez podanie NADPH) produkcji  $O_2^-$ . Pomiary wykonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Niektóre naczynia preinkubowano z Tironem (10mM), inne z PEG-SOD (500U/ml) przez 30-45 min. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100 $\mu$ M tego związku. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 8-9 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

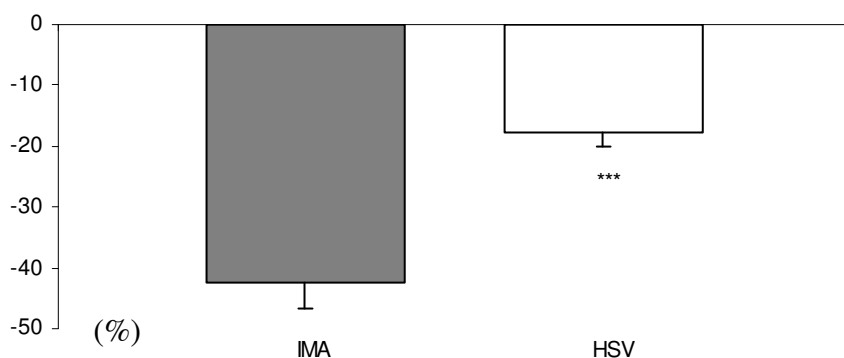
#### IV.2.3 Ocena stopnia dysfunkcji śródbłonna w tętnicach piersiowych wewnętrznych oraz żyłach odpiszczelowych

W celu oceny funkcji śródbłonna stosowano standardowy test odpowiedzi naczyń na acetylocholinę. W wyniku podawania wzrastających dawek acetylocholin (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) uzyskano rozkłady krzywych rozkurczu odpowiednio dla żył i tętnic. Obie krzywe różniły się istotnie dla wszystkich wyższych stężeń acetylocholin (10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup> M) (Ryc.IV.38).



Ryc.IV.38. **Odpowiedź naczyń ludzkich na wzrastające dawki acetylocholiny.** Wielkość rozkurczu (-) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. IMA: tętnica piersiowa wewnętrzna, HSV: żyła odpiszczelowa. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 60 doświadczeń, \* \* p<0,01 IMA vs HSV.

Tętnice piersiowe wewnętrzne reagują większym rozkurczem na acetylocholiny niż żyły odpiszczelowe. Wydaje się to świadczyć o większej biodostępności tlenu azotu w naczyniach tętniczych w porównaniu z naczyniami żylnymi. Również maksymalne rozkurcze tętnic na acetylocholiny są większe od odpowiedzi żył (Ryc.IV.39).

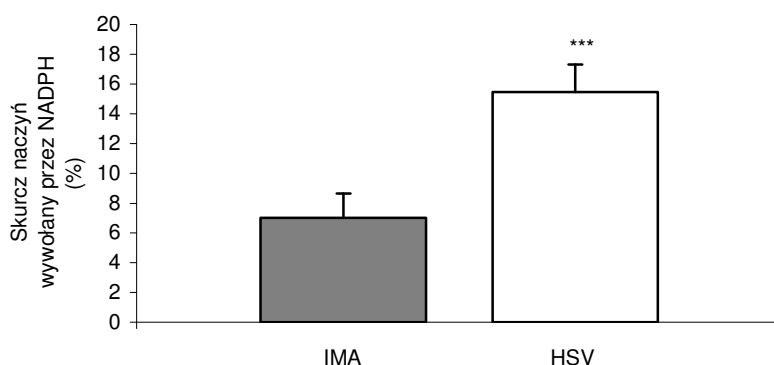


Ryc.IV.39. **Maksymalne odpowiedzi na acetylocholiny w naczyniach ludzkich.** Wielkość rozkurczu (-) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. IMA: tętnica piersiowa wewnętrzna, HSV: żyła odpiszczelowa. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 60 doświadczeń, \* \* \* p<0,001 IMA vs HSV.

#### IV.2.4. Badanie reakcji naczyń ludzkich na doświadczalny stres oksydacyjny

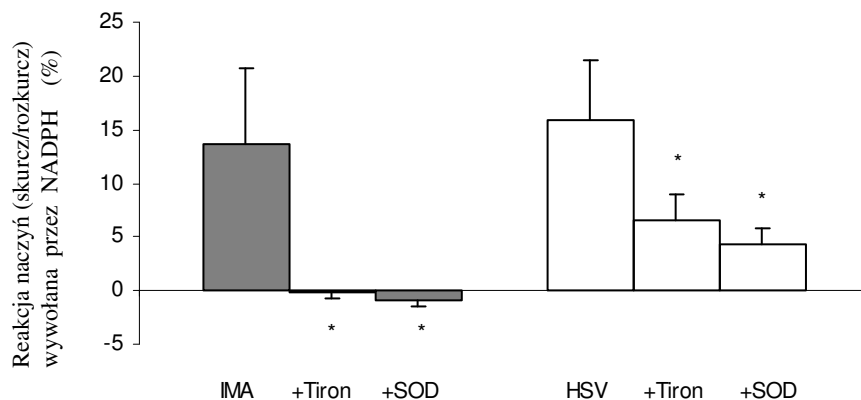
*Jak wykazano już u zwierząt, zaktywowanie oksydazy NAD(P)H przy pomocy NADPH wydaje się być dobrym sposobem na określenie stopnia dysfunkcji śródbłonna. W tym podrozdziale próbowano odpowiedzieć na pytanie czy jest to również możliwe w naczyniach ludzkich.*

Niemal we wszystkich naczyniach indukowanie oksydazy NAD(P)H prowadziło do skurczów naczyniowych. Tylko w przypadku ośmiu tętnic piersiowych wewnętrznych oraz trzech żył odpiszczelowych obserwowano rozkurcze na NADPH (ze względu na swoją nietypową odpowiedź naczynia te będą jednak omawiane oddzielnie – patrz Ryc.IV.44). Żyły odpowiadały dwukrotnie silniejszym skurczem niż tętnice piersiowe wewnętrzne (Ryc.IV.40).



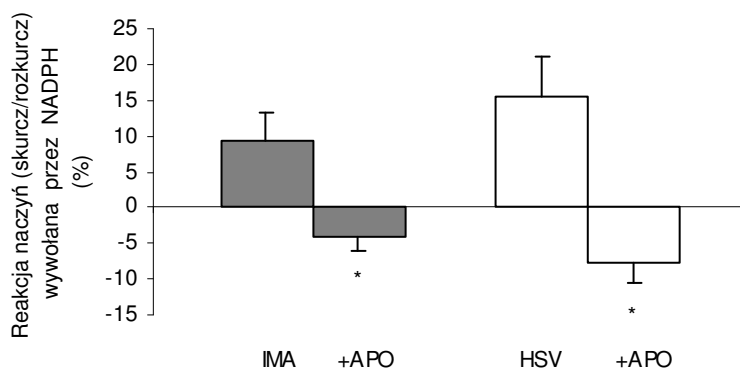
Ryc.IV.40. Zmiany napięcia naczyń ludzkich w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu nadadtlenkowego. Wielkość skurczu przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100µM., czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 70 doświadczeń, \*\*\* p<0,001 ima vs hsv.

W celu wykazania, że za obserwowany skurcz naczyniowy odpowiada uwalniany w nadmiarze anion nadadtlenkowy poddano je wcześniejszej preinkubacji z dysmutazą nadadtlenkową lub Tironem. Zastosowanie tych związków spowodowało zupełne zahamowanie indukowanych NAD(P)H skurczów naczyniowych w tętnicach (zmniejszenie skurczów w żyłach) i świadczy, że za reakcję skurczową odpowiedzialny jest najprawdopodobniej anion nadadtlenkowy (Ryc.IV.41).



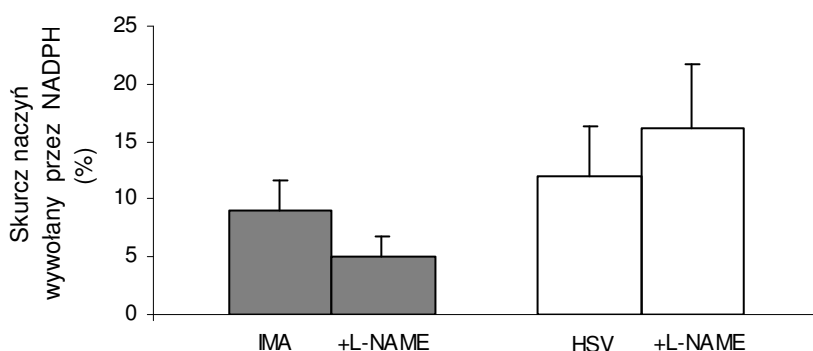
Ryc.IV.41. Zmiany napięcia naczyń ludzkich w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego - wpływ „wymiatacza wolnych rodników” tironu i dysmutazy ponadtlenkowej. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NAD(P)H dodano uzyskując stężenie 100µM, Tiron uzyskując stężenie 10mM, a SOD 300 U/ml. Zarówno czas inkubacji z Tironem, SOD jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 7-9 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

W celu potwierdzenia w opisywanym zjawisku roli stymulacji oksydazy NAD(P)H wykonano doświadczenia z zahamowaniem jej aktywności przy użyciu swoistego inhibitora – apocyniny (Ryc.IV.42). Uzyskano całkowite zniesienie indukowanych przez NAD(P)H skurczów naczyniowych, co potwierdza, że oksydaza NAD(P)H odgrywa główną rolę w generowaniu tego zjawiska.



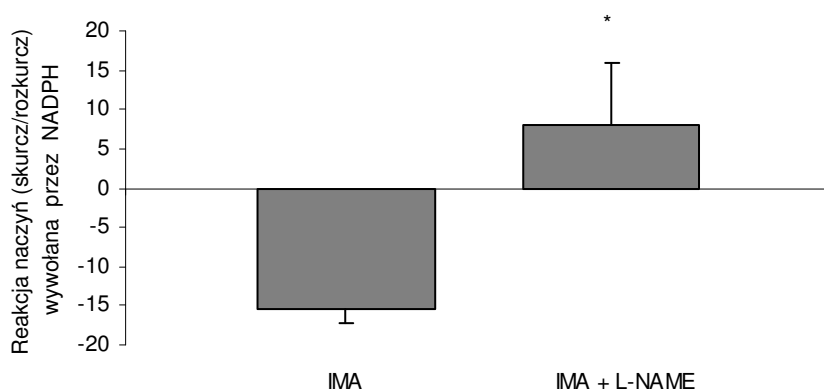
Ryc.IV.42. Wpływ zahamowania oksydaz NADPH na NADPH-zależne skurcze naczyniowe. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Zarówno NADPH jak i Apocyninę (APO) dodano w stężeniu 100 µM, czas inkubacji z APO jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 7 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

W kolejnym etapie badań próbowano określić zależność zjawiska skurczów naczyniowych po NADPH od fundamentalnego dla homeostazy naczyniowej wytwarzania tlenu azotu i nadtlenu wodoru. W tym celu wykonano szereg doświadczeń z inhibitorem syntazy tlenu azotu (L-NAME) oraz z katalazą. Jak już wcześniej wspomniano tylko niektóre naczynia po podaniu NAD(P)H rozkurczały się. Ponieważ naczyń tych było niewiele, nie zdołaliśmy przeprowadzić szczegółowej analizy zjawiska. Udało się jedynie określić, że indukowane przez NAD(P)H rozkurcze naczyniowe zależą od produkcji tlenu azotu. Analizę z hamowaniem syntazy tlenu azotu przeprowadzono oddzielnie dla naczyń z NAD(P)H zależnymi skurczami i rozkurczami. W pierwszym przypadku w wyniku zahamowania syntazy tlenu azotu uzyskano zmniejszenie NAD(P)H zależnych skurczów tętnic, a zwiększenie tych skurczów w żyłach. Nie były to jednak odpowiedzi istotne statystycznie (Ryc.IV.43).



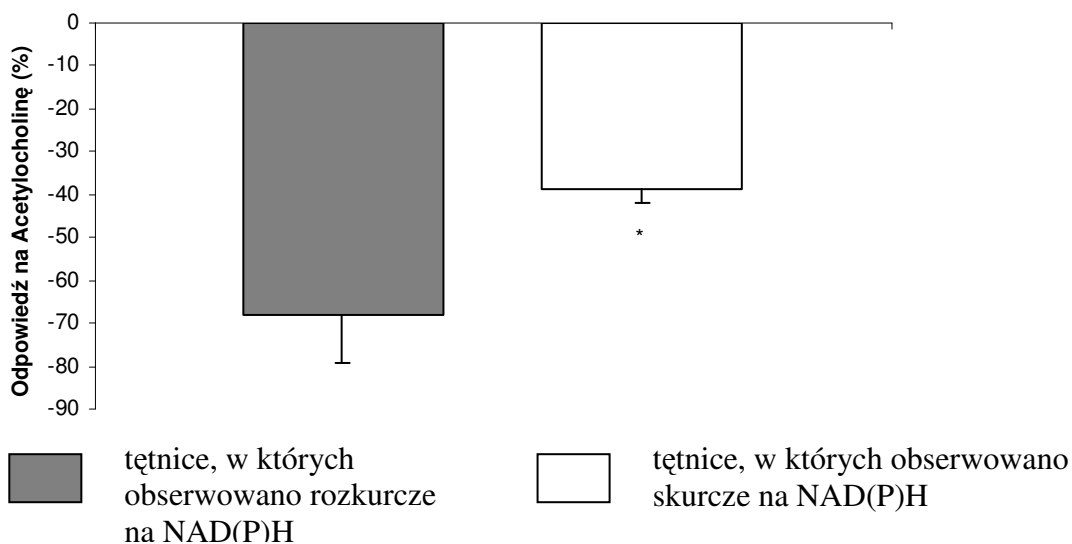
Ryc.IV.43. Wpływ zahamowania syntazy tlenu azotu na NADPH-zależne skurcze naczyniowe (naczynia, u których obserwowano po podaniu NADPH rozkurcze analizowano osobno). Wielkość skurczu przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NADPH dodano uzyskując stężenie 100µM, a L-NAME uzyskując stężenie 300µM; zarówno czas inkubacji z L-NAME, jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 8-12 doświadczeń.

W drugim przypadku tj. w naczyniach rozkurczających się na podanie NAD(P)H, ustalono zależność zjawiska od uwalniania tlenu azotu (Ryc.IV.44).



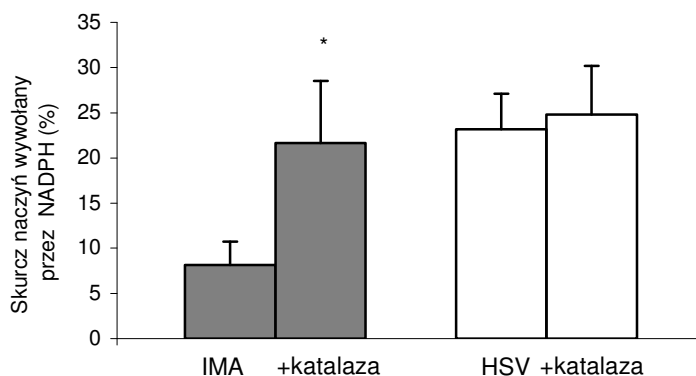
Ryc.IV.44. Wpływ zahamowania syntezy tlenu azotu na NADPH-zależne rozkurcze naczyniowe (naczynia, u których obserwowano po podaniu NADPH skurcz - analizowano osobno). Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NADPH dodano uzyskując stężenie 100μM, a L-NAME uzyskując stężenie 300μM, zarówno czas inkubacji z L-NAME jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 5 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

W naczyniach, w których obserwowano rozkurcze na NAD(P)H, wykazano także znamienne większe maksymalne rozkurcze na acetylocholinę (Ryc.IV.45). Jak wykazano w doświadczeniach na szczurach, odpowiedzi takie są dowodem prawidłowej funkcji śródbłoka u szczurów normotensyjnych.



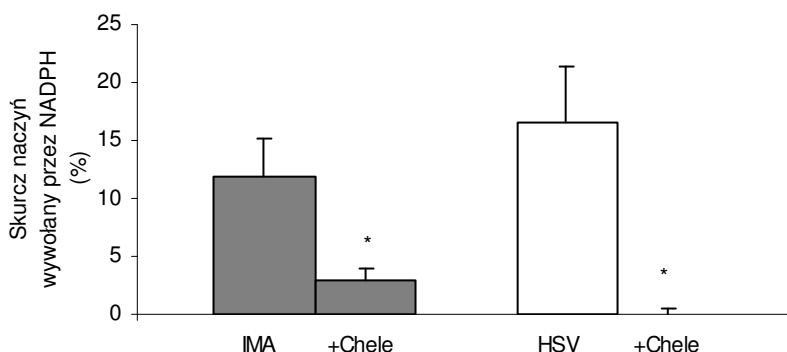
Ryc.IV.45. Wpływ stopnia dysfunkcji śródbłoka na NADPH-zależną reakcję ludzkich naczyń tętniczych. Wielkość maksymalnego rozkurczu (-) na acetylocholinę przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Porównywano naczynia z obserwowanymi rozkurczami oraz skurczami na 100uM stężenie NAD(P)H. Istotność statystyczną obliczano używając testu T-studenta z próbkami o nierównej wariancji. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 8 dla tętnic z rozkurczami, n=45 dla tętnic ze skurczami, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

Próbując określić wpływ powstawania nadtlenu wodoru na występowanie NAD(P)H zależnych skurczów naczyniowych preinkubowano je wcześniej z katalazą (Ryc.IV.46). W naczyniach tętnicznych zaobserwowano znamienne wzrost odpowiedzi skurczowych, co może świadczyć o istotnej roli nadtlenu wodoru w utrzymaniu homeostazy naczyń tętnicznych w warunkach stresu oksydacyjnego. W żyłach taka odpowiedź jest bardzo słabo zauważalna (statystycznie nieistotna).



Ryc.IV.46. Zmiany napięcia naczyń ludzkich w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu nadadtlenkowego - wpływ katalazy (w powyższej analizie nie uwzględniono naczyń, które odpowiadały na podanie NADPH rozkurczem, n=2). Wielkość skurczu przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NADPH dodano w stężeniu 100  $\mu$ M, a katalazę w stężeniu 1200 U/ml, zarówno czas inkubacji z Katalazą jak i czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 7-9 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

W doświadczeniach z inhibitorem kinazy białkowej C (chelerytryną) udało się wykazać znaczenie tego układu enzymatycznego w generowaniu skurczów naczyniowych w stresie oksydacyjnym (kinaza białkowa C uczestniczy w aktywacji oksydazy NAD(P)H) (Ryc.IV.47).

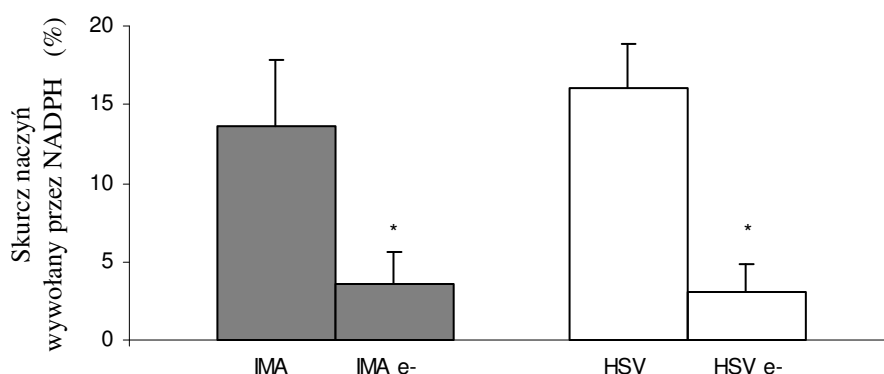


Ryc.IV.47. Zmiany napięcia naczyń ludzkich w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu nadadtlenkowego - wpływ inhibitora kinazy białkowej (chelerytryny). Wielkość skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NADPH dodano uzyskując stężenie 100  $\mu$ M, a chelerytrynę uzyskując stężenie 3  $\mu$ M, zarówno czas inkubacji z chelerytryną, jak i czas



oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 7-9 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna

Dokonano wreszcie próby określenia czy NAD(P)H zależne reakcje naczyniowe zależą od obecności śródbłonka. Zarówno skurcze obserwowane w tętnicach piersiowych wewnętrznych, jak i te w żyłach odpiszczelowych, w sposób istotny zależą od obecności śródbłonka. Wytworzenie stresu oksydacyjnego w naczyniu pozbawionym śródbłonka powoduje zmniejszenie odpowiedzi skurczowej. Wydaje się to być spowodowane brakiem endogennego tlenu azotu. Zatem w ludzkich naczyniach krwionośnych skurcz związany z nadprodukcją anionu ponadtlenkowego wydaje się być ściśle związany z jego wpływem na biodostępność tlenu azotu (Ryc.IV.48).



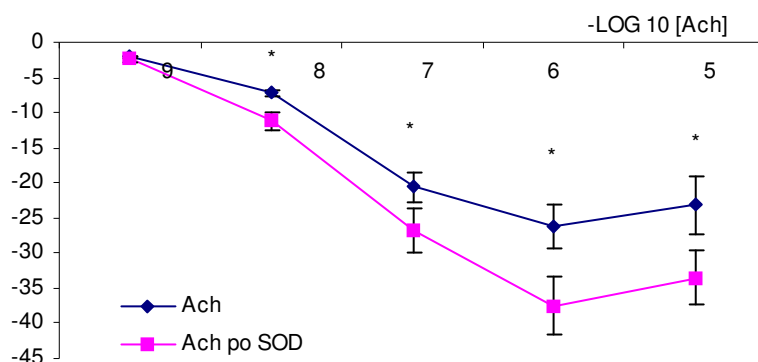
Ryc.IV.48. Zależność zmian napięcia naczyń ludzkich w odpowiedzi na NADPH-zależną produkcję anionu ponadtlenkowego od obecności nienaruszonego śródbłonka. Wielkość skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. NADPH dodano uzyskując stężenie 100  $\mu$ M, czas oczekiwania na odpowiedź po podaniu NADPH wynosił 20 min. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 7 doświadczeń, \*p<0,05 vs odpowiedź kontrolna.

### IV.3. Ocena odpowiedzi naczyń ludzkich na powszechnie stosowane antyoksydanty – wpływ stopnia dysfunkcji śródbłonka

*W podrozdziale tym dokonano oceny wpływu powszechnie stosowanych antyoksydantów tj. dysmutazy ponadtlenkowej oraz N-acetylocysteiny na reaktywność naczyniową. W analizie tej podzielono pacjentów na dwie grupy: chorych ze słabo zaznaczoną dysfunkcją śródbłonka (u których występowały rozkurcze na acetylocholinę) oraz chorych z silnie zaznaczoną dysfunkcją (u nich po acetylocholinie obserwowano jedynie skurcze naczyniowe).*

#### IV.3.1. Współzależność stopnia uszkodzenia śródbłonna i naczyniowych efektów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

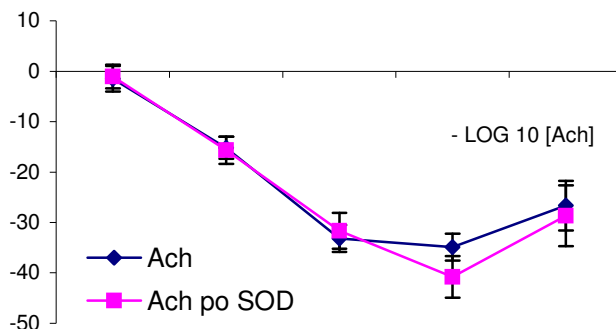
W doświadczeniach z dysmutazą ponadtlenkową (SOD) dokonano oceny czy podanie jej wpłynie na biodostępność tlenu azotu w naczyniach tętniczych (nie wykonywano eksperymentów na żyłach). Zaobserwowano wzrost odpowiedzi na acetylocholinę w naczyniach wcześniej preinkubowanych z dysmutazą ponadtlenkową (Ryc.IV.49). Wydaje się, że SOD usuwając z naczynia wolne rodniki zwiększa biodostępność NO.



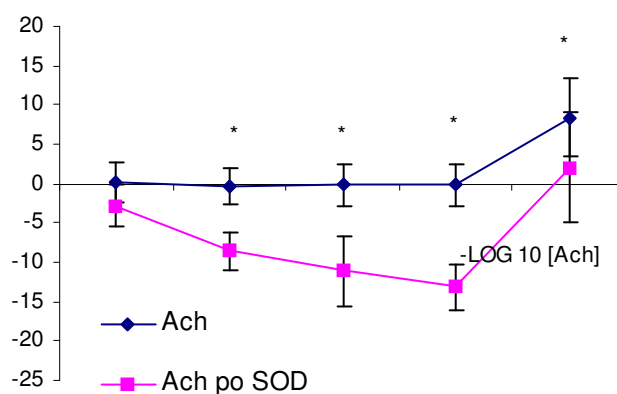
Ryc.IV.49. Wpływ dysmutazy ponadtlenkowej na naczyniorozszerzające właściwości acetylocholinę w tętnicach piersiowych wewnętrznych (IMA). Wielkość rozkurczu (-) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. . Po pomiarze odpowiedzi na wzrastające stężenia acetylocholinę naczynia inkubowano przez ok. 20 min ze 100μM stężeniem SOD i następnie znowu wykonywano pomiar odpowiedzi na acetylocholinę. Dane przedstawiają średnią ± SEM, n=20, \* p< 0,05 ; Ach vs Ach po SOD.

Po podzieleniu pacjentów na grupy z małą i dużą dysfunkcją śródbłonna okazało się, że tylko w grupie z nasiloną dysfunkcją naczyniową obserwowano poprawę odpowiedzi na acetylocholinę po wcześniejszej inkubacji z dysmutazą ponadtlenkową. Wydaje się to być związane z większą produkcją anionu ponadtlenkowego w tych naczyniach (Ryc.IV.50).

tętnice bez  
dysfunkcji



tętnice  
dysfunkcyjne

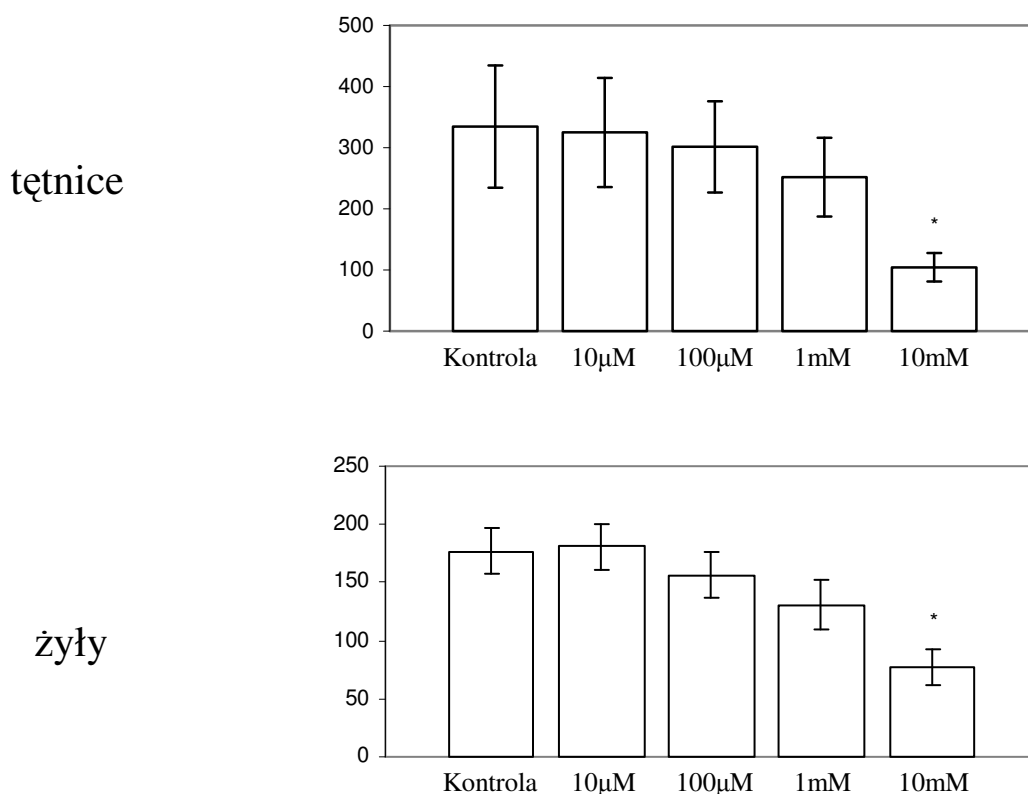


Ryc.IV. 50. Porównanie tętnic piersiowych wewnętrznych (IMA) z małą i dużą dysfunkcją śródbłonka - wpływ dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) na odpowiedzi po acetylocholinie. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Po pomiarze odpowiedzi na wzrastające stężenia acetylocholinę naczynia inkubowano przez ok. 20 min ze 100µM stężeniem SOD i następnie znowu wykonywano pomiar odpowiedzi na acetylocholinę. Dane przedstawiają średnią ± SEM, n=7-8, \* p<0,05 ; Ach vs Ach po SOD.

#### IV.3.2. Współzależność stopnia uszkodzenia śródbłonka i naczyniowych efektów N-acetylocysteiny

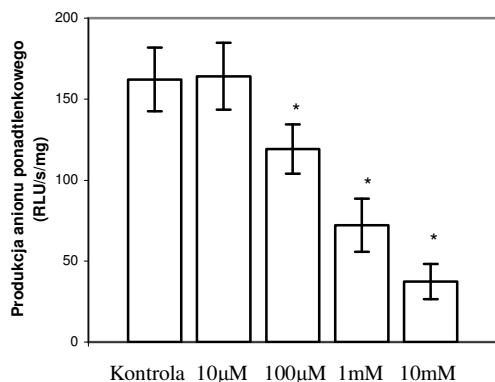
*Ponieważ znany jest wpływ N-acetylocysteiny na rozkurcze naczyniowe po podaniu nitratów (patrz dyskusja), zrezygnowano w niniejszej pracy ze zbadania wpływu tego związku na rozkurcze po acetylocholinie (acetylocholina działa poprzez uwalnianie NO). Postanowiono skupić się na wyjaśnieniu mechanizmów bezpośredniego działania NAC na naczynia krwionośne, w tym obszarze badawczym nie istnieje bowiem zbyt wiele opublikowanych informacji.*

N-acetylocysteina znana jest ze swojej właściwości „wymiatania wolnych rodników”. Z tego powodu w pierwszych eksperymentach próbowano określić jej wpływ na spadek produkcji anionu ponadtlenkowego zarówno w żyłach, jak i tętnicach (Ryc.IV.51). Znamienne spadek produkcji  $O_2^-$  zaobserwowano dopiero przy najwyższym stężeniu NAC (10mM). Po uwzględnieniu podziału na chorych z dysfunkcją i bez dysfunkcji śródbłonka okazało się, że spadek produkcji  $O_2^-$  zachodził przy użyciu mniejszych stężeń NAC u pacjentów z bardziej funkcjonalnym śródbłonkiem (w tętnicach były to stężenia 100 krotnie niższe, a w żyłach 10 krotnie)(Ryc.IV.52).

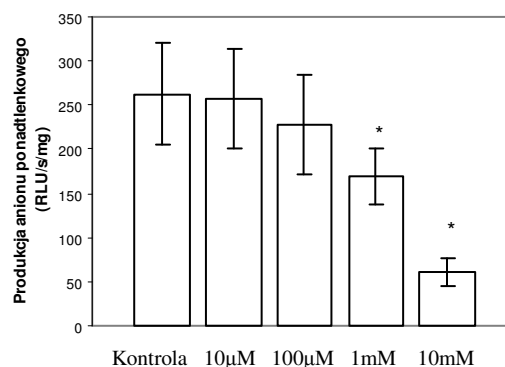


Ryc.IV 51. **Wpływ wzrastających stężeń N-acetylocysteiny (NAC) na poziom produkcji anionu ponadtlenkowego** Pomiarów dokonano przy pomocy chemiluminescencji zależnej od lucygeniny (5  $\mu$ M). Pierwszy słupek (kontrola) oznacza pomiar luminescencyjny z samego naczynia, następne słupki oznaczają pomiar po dodaniu wzrastających stężeń NAC. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 20 doświadczeń, \* p<0,05 basal vs NAC 10mM.

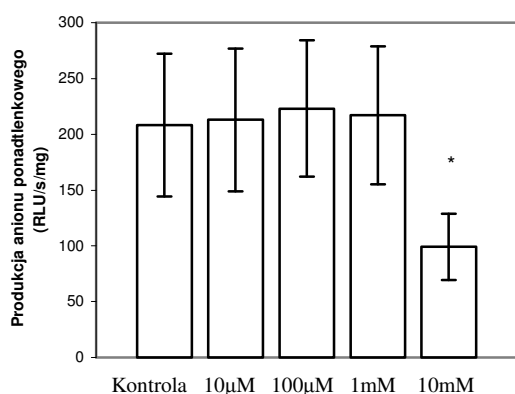
### A1) tętnice bez dysfunkcji



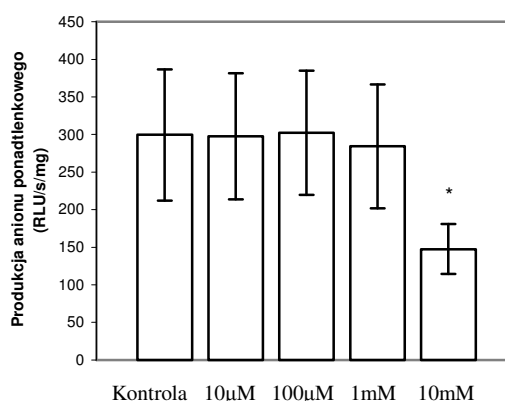
### B1) żyły bez dysfunkcji



### A2) tętnice dysfunkcyjne



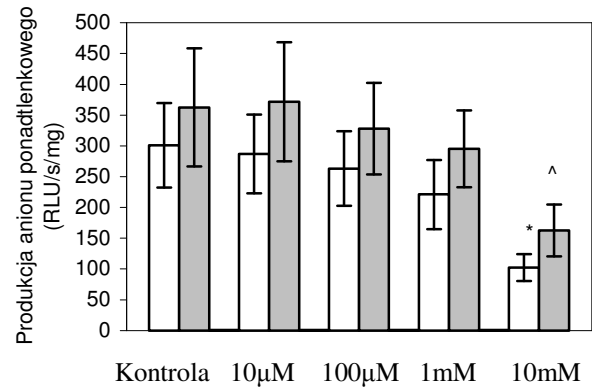
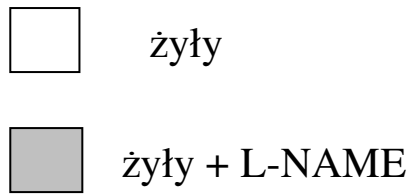
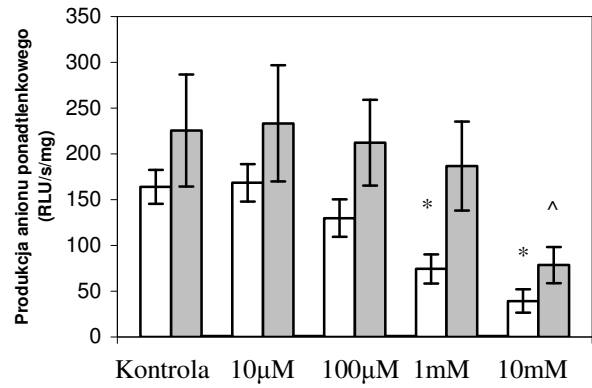
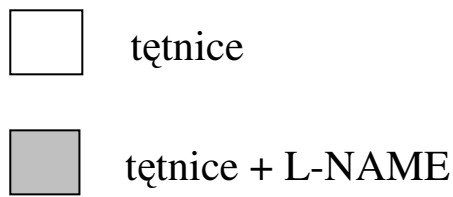
### B2) żyły dysfunkcyjne



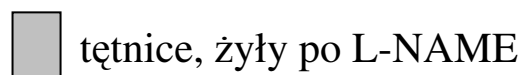
Ryc.IV.52. Wpływ wzrastających stężeń N-acetylocysteiny (NAC) na produkcję anionu ponadtlenkowego - analiza według stopnia dysfunkcji. A1,A2- IMA. B1,B2 - HSV. A1,B1 - naczynia z obserwowanymi rozkurczami na wzrastające stężenia Acetylcholine. A2,B2 - naczynia, u których po zastosowaniu acetylcholine obserwowano odpowiedź skurczową (dysfunkcja). Pierwszy słupek (kontrola) oznacza pomiar luminescencyjny z samego naczynia, następne słupki oznaczają pomiar po dodaniu wzrastających stężeń NAC. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM z n= 10 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiednia kontrola.

Wobec opisanego powyżej wpływu fenotypu śródbłonka (z i bez dysfunkcji) na czułość usuwania wolnych rodników przez N-acetylocysteinę, próbowano ustalić czy wynika to z jej właściwości „rodnikowego wymiatania”, czy też jest wynikiem oddziaływania NAC na inne śródbłonkowe mediatory. Ponieważ tlenek azotu jest kluczowym czynnikiem homeostazy naczyniowej, oceniono wpływ zahamowania syntazy tlenu azotu (NOS) na antyoksydacyjne działanie NAC (Ryc.IV.53). Zaobserwowano osłabienie działania NAC po zahamowaniu NOS, ale tylko w naczyniach tętnicznych. Po uwzględnieniu podziału pacjentów według stopnia upośledzenia funkcji śródbłonka

wykazano, że to zmniejszenie działania NAC zachodziło głównie w tętnicach z nieznaczną dysfunkcją śródbłonna (Ryc.IV.54).

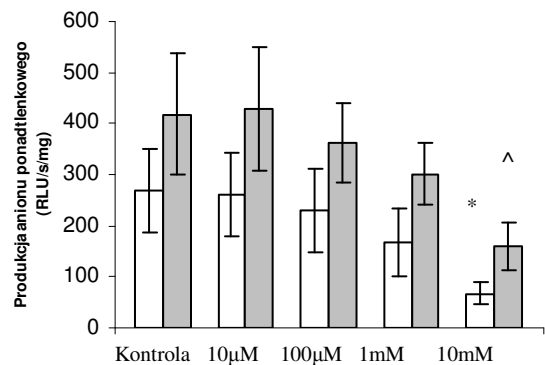
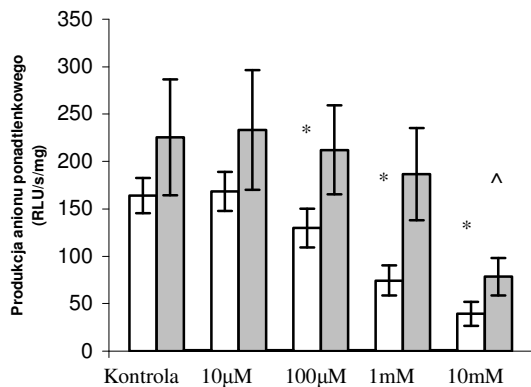


Ryc.IV.53. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich w odpowiedzi na wzrastające stężenia NAC – wpływ L-NAME.** Naczynia inkubowano przez 20 min ze 300µM stężeniem L-NAME. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 20 doświadczeń, \* ^ p<0,05 vs odpowiednia kontrola.

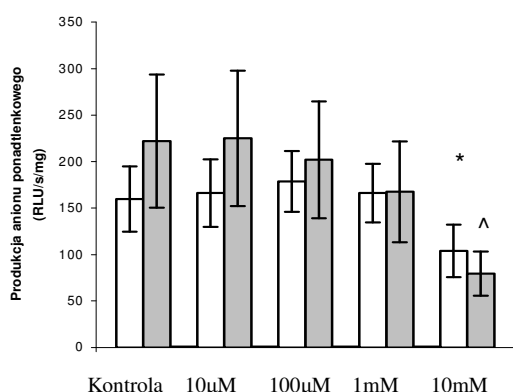


A1) tętnice bez dysfunkcji

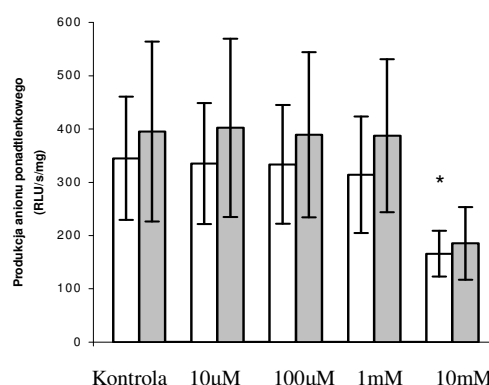
B1) żyły bez dysfunkcji



## A2) tętnice dysfunkcyjne



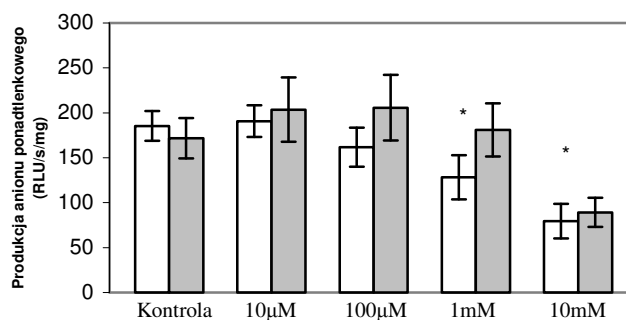
## B2) żyły dysfunkcyjne



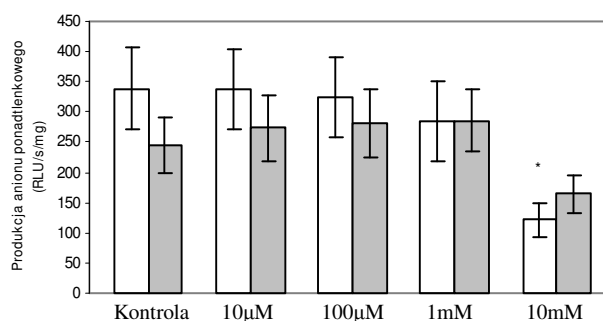
Ryc.IV.54. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich w odpowiedzi nawzrastające stężenia NAC – wpływ L-NAME.** A1,A2 - IMA. B1,B2 –HSV. A1,B1 – naczynia bez dysfunkcji. A2,B2 –naczynia dysfunkcyjne. Naczynia inkubowano 20 min ze 300µM stężeniem L-NAME. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 10 doświadczeń, \* ^ p<0,05 vs odpowiednia kontrola.

W celu określenia roli N-acetylocysteiny w bezpośrednim usuwaniu wolnych rodników poddano naczynia działaniu dysmutazy ponadtlenkowej. Oprócz żył pochodzących od pacjentów z zaawansowaną dysfunkcją śródbłonna, we wszystkich naczyniach zauważalne było obniżenie skuteczności działania NAC po takim postępowaniu (Ryc.IV.55, Ryc.IV.56).

□ tętnice  
 ■ tętnice + SOD



□ żyły  
 ■ żyły + SOD

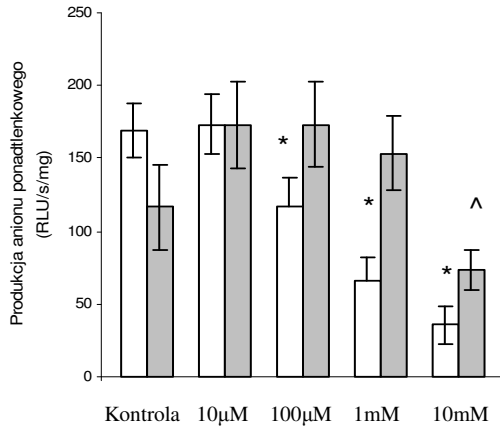


Ryc.IV.55. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich w odpowiedzi na wzrastające stężenia NAC – wpływ SOD.** Naczynia inkubowano przez 20 min ze 100µM stężeniem SOD. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 20 doświadczeń, \* p<0,05 vs odpowiednia kontrola.

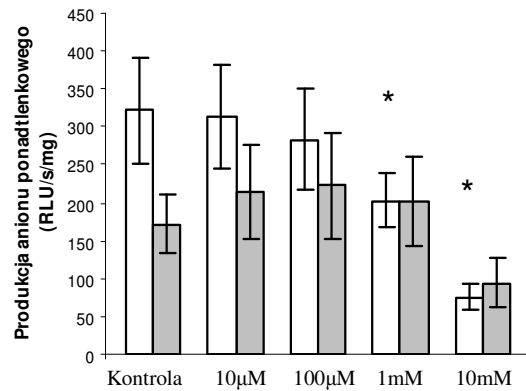
☐ tętnice, żyły

■ tętnice, żyły po SOD

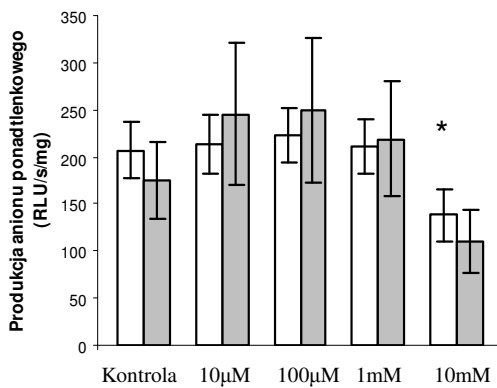
A1) tętnice bez dysfunkcji



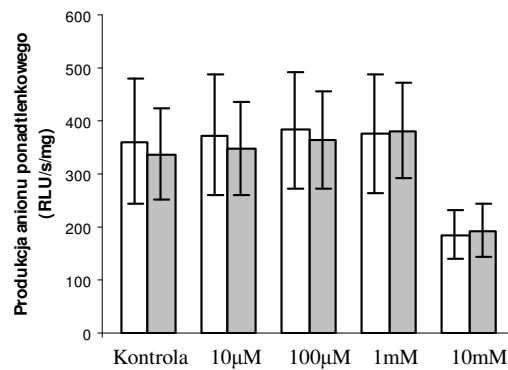
B1) żyły bez dysfunkcji



A2) tętnice dysfunkcyjne



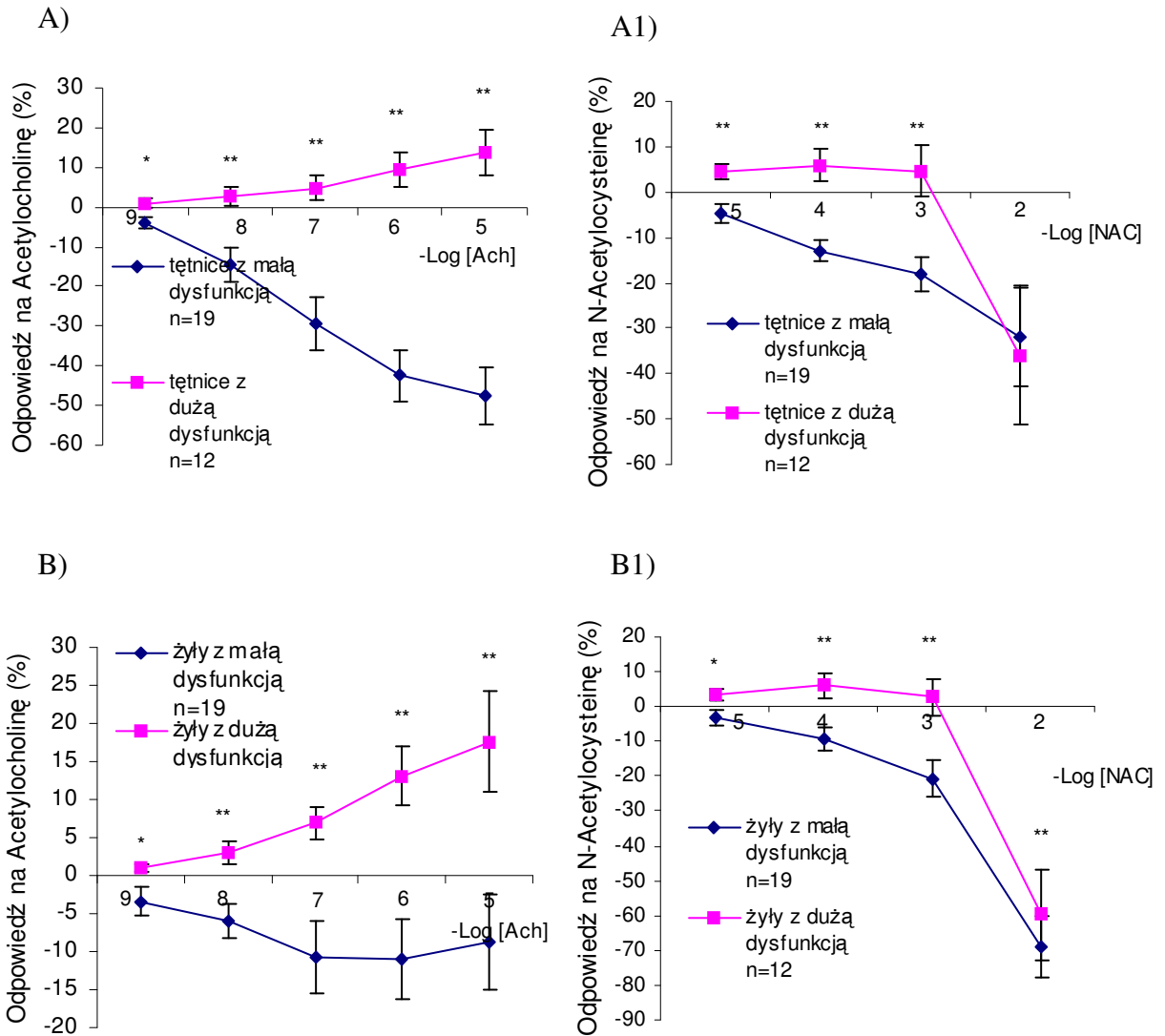
B2) żyły dysfunkcyjne



Ryc.IV.56. **Produkcja anionu ponadtlenkowego w naczyniach ludzkich w odpowiedzi na wzrastające stężenia NAC – wpływ SOD.** A1,A2 - IMA. B1,B2 - HSV. A1,B1 – naczynia bez dysfunkcji. A2,B2 – naczynia dysfunkcyjne. Naczynia inkubowano przez 20 min ze 100µM stężeniem SOD. Dane przedstawiają średnią ± SEM z n= 10 doświadczeń, \* ^ p<0,05 vs odpowiednia kontrola.

Następnie próbowano ocenić wpływ N-acetylocysteiny na zmiany napięcia naczyniowego. W analizie tej również dokonano podziału chorych na tych z dysfunkcją śródbłonna, nie reagujących rozkurczem na wzrastające dawki acetylocholin, jak i tych bez dysfunkcji, u których obserwowano rozkurcze po acetylocholinie. W świetle wykonanych eksperymentów wydaje się, że w zakresie niższych stężeń NAC powoduje rozkurcze tętnic i żył tylko w naczyniach bez dysfunkcji (Ryc.IV.57).

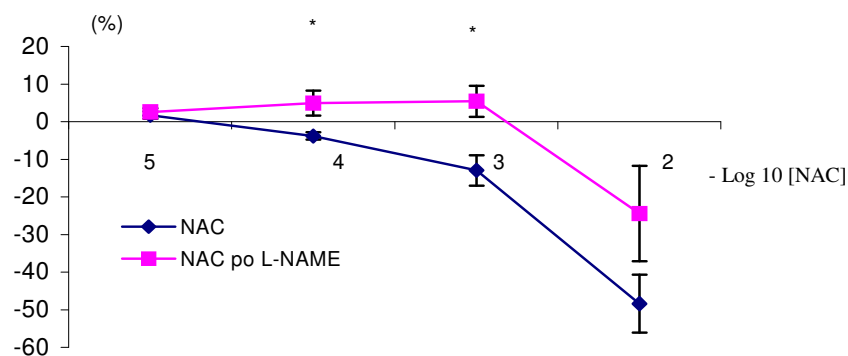




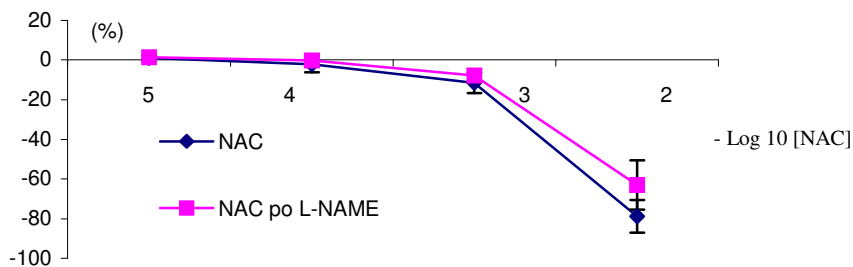
Ryc.IV.57. Porównanie naczyń ludzkich z małą i dużą dysfunkcją śródbłonna względem odpowiedzi na wzrastające dawki acetylocholino (A,B) i N-acetylocysteinę (A1,B1). Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Dane przedstawiają średnią  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  IMA vs HSV. Ryc. A, A1: Tętnice piersiowe wewnętrzne (IMA), Ryc. B,B1: Żyły odpiszczelowe (HSV).

Podobnie jak w przypadku badań nad produkcją anionu ponadtlenkowego, również w tym przypadku wykonano doświadczenia mające wykazać w jakim stopniu obserwowane rozkurcze naczyniowe zależą od uwalniania tlenu azotu. W sytuacji zahamowania syntazy tlenu azotu przez L-NAME obserwowano zmniejszenie rozkurczów naczyniowych indukowanych przez NAC tylko w naczyniach tętnicznych (Ryc.IV.58). Po uwzględnieniu podziału chorych według stopnia dysfunkcji śródbłonna, stwierdzono zmniejszenie rozkurczów na NAC w naczyniach bez dysfunkcji i to zarówno w tętnicach jak i żyłach (Ryc.IV.59).

tętnice

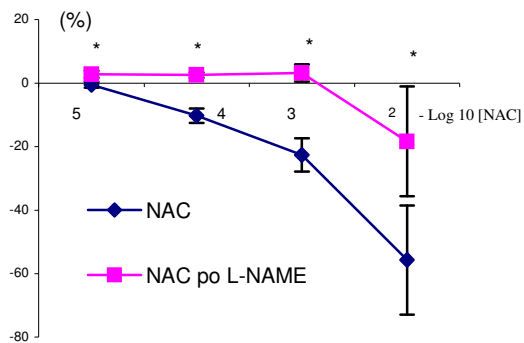


żyły

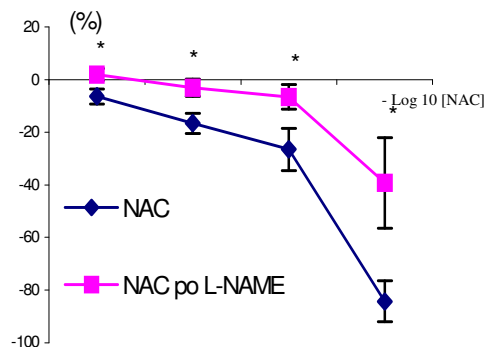


Ryc.IV.58. Odpowiedź naczyń ludzkich (żylnych i tętnicznych) na wzrastające stężenia N-Acetylocysteiny (NAC) – wpływ zahamowania syntazy tlenu azotu przy użyciu L-NAME. Naczynia kurczone były fenylefryną (0.5-5uM) do napięcia submaksymalnego. Niektóre naczynia inkubowano przez ok. 20 min ze 300µM stężeniem L-NAME i dopiero wtedy podawano wzrastające dawki NAC. Dane przedstawiają średnią ± SEM, \* p< 0,05 NAC vs NAC po L-NAME. IMA: Tętnice piersiowe wewnętrzne; HSV: Żyły odpiszczelowe.

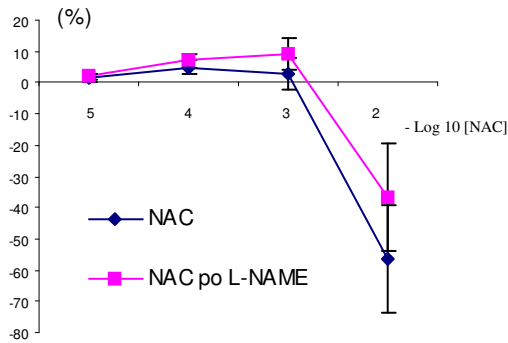
A1) tętnice bez dysfunkcji



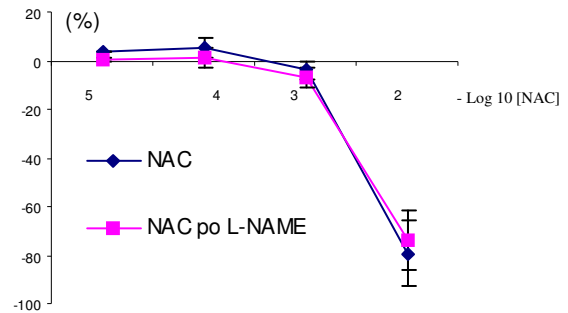
B1) żyły bez dysfunkcji



## A2) tętnice dysfunkcyjne



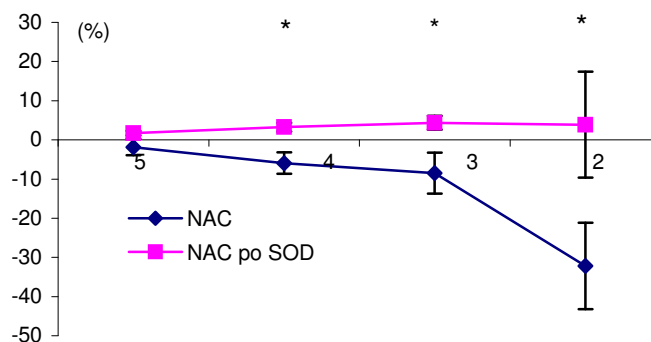
## B2) żyły dysfunkcyjne



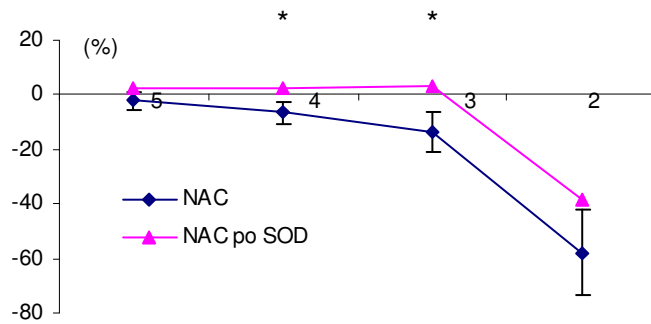
Ryc.IV.59. Porównanie naczyń ludzkich z małą i dużą dysfunkcją śródbłonna względem odpowiedzi na wzrastające dawki N-acetylocysteiny – wpływ L-NAME. A1,B1 – naczynia bez dysfunkcji A2,B2 – naczynia dysfunkcyjne. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Niektóre naczynia inkubowano przez ok. 20 min ze 300μM stężeniem L-NAME. Dane przedstawiają średnią ± SEM, \* p< 0,05 ; NAC vs NAC po L-NAME vs HSV. Ryc. A1, A2: Tętnice piersiowe wewnętrzne (IMA), Ryc. B1,B2: Żyły odpiszczelowe (HSV).

Po preinkubacji naczyń z dysmutazą ponadtlenkową uzyskano całkowite zahamowanie rozkurczów na podanie NAC w tętnicach. W żyłach podobne zahamowanie obserwowano dla niższych stężeń N-acetylocysteiny (Ryc.IV.60). Podobnie jak w przypadku L-NAME i tu również największe zahamowanie rozkurczów po NAC zachodziło w naczyniach bez dysfunkcji (Ryc.IV.61).

tętnice



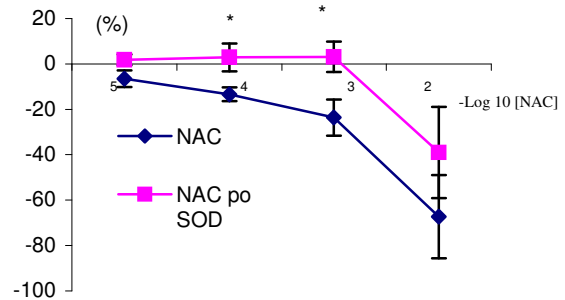
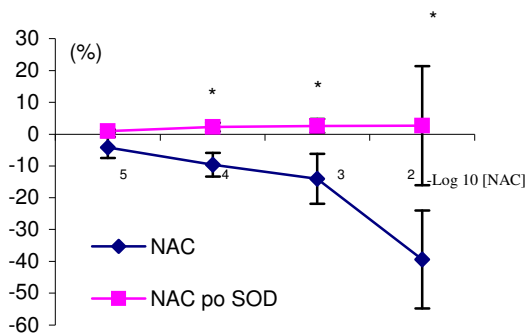
żyły



Ryc.IV.60. Odpowiedź naczyń ludzkich (żylnych i tętniczych) na wzrastające stężenia N-Acetylocysteiny (NAC) – wpływ dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Naczynia kurczone były fenylefryną (0.5-5uM) do napięcia submaksymalnego. Niektóre naczynia inkubowano przez ok. 20 min ze 100 uM stężeniem SOD i dopiero wtedy podawano wzrastające dawki NAC. Dane przedstawiają średnią ± SEM, \* p< 0,05 NAC vs NAC po L-NAME. IMA: Tętnice piersiowe wewnętrzne; HSV: Żyły odpiszczelowe.

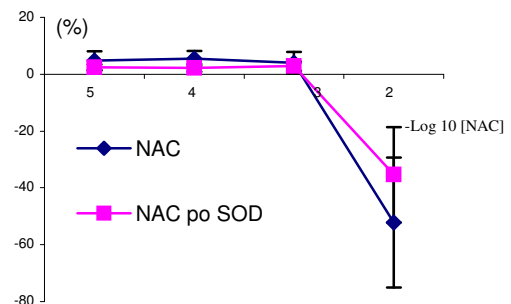
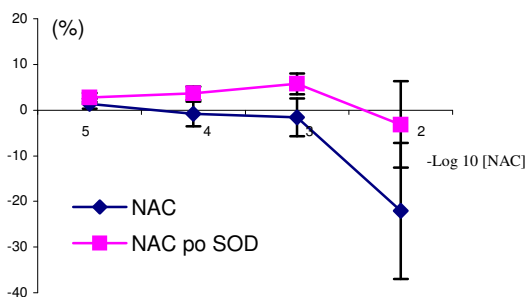
A1) tętnice bez dysfunkcji

B1) żyły bez dysfunkcji



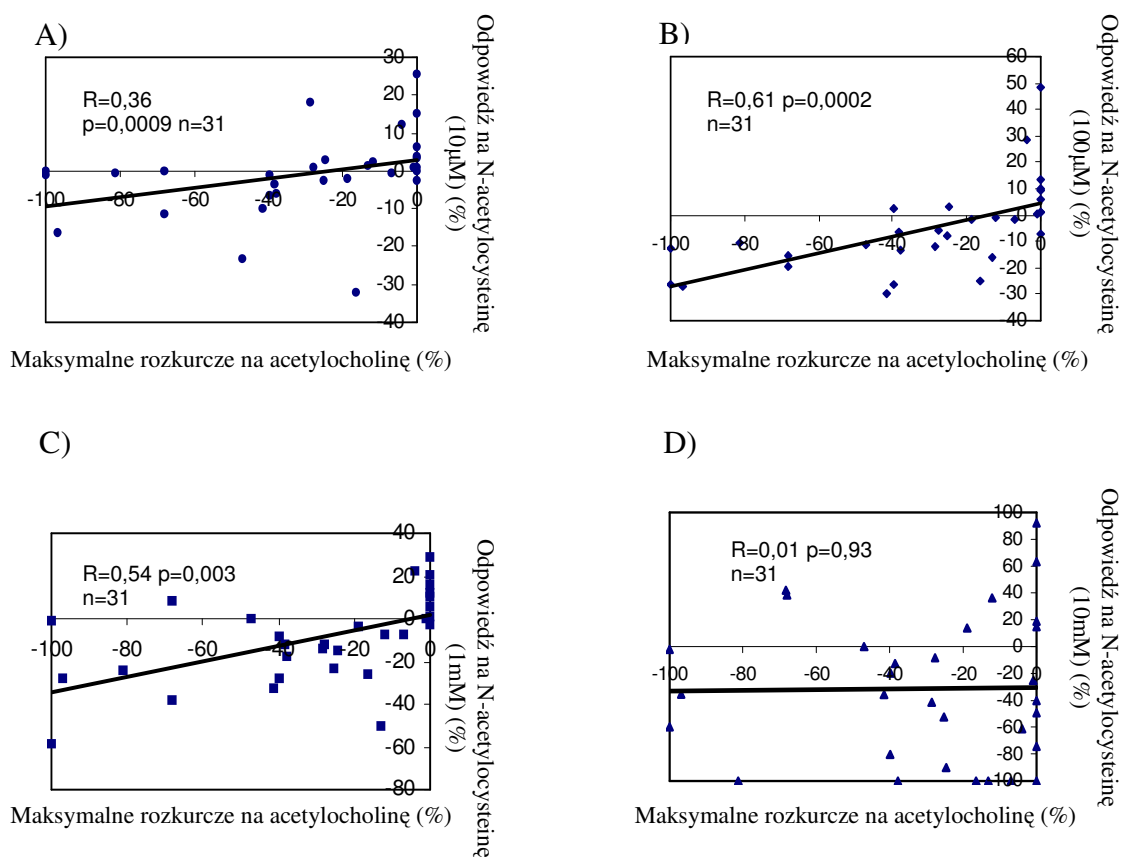
A2) tętnice dysfunkcyjne

B2) żyły dysfunkcyjne

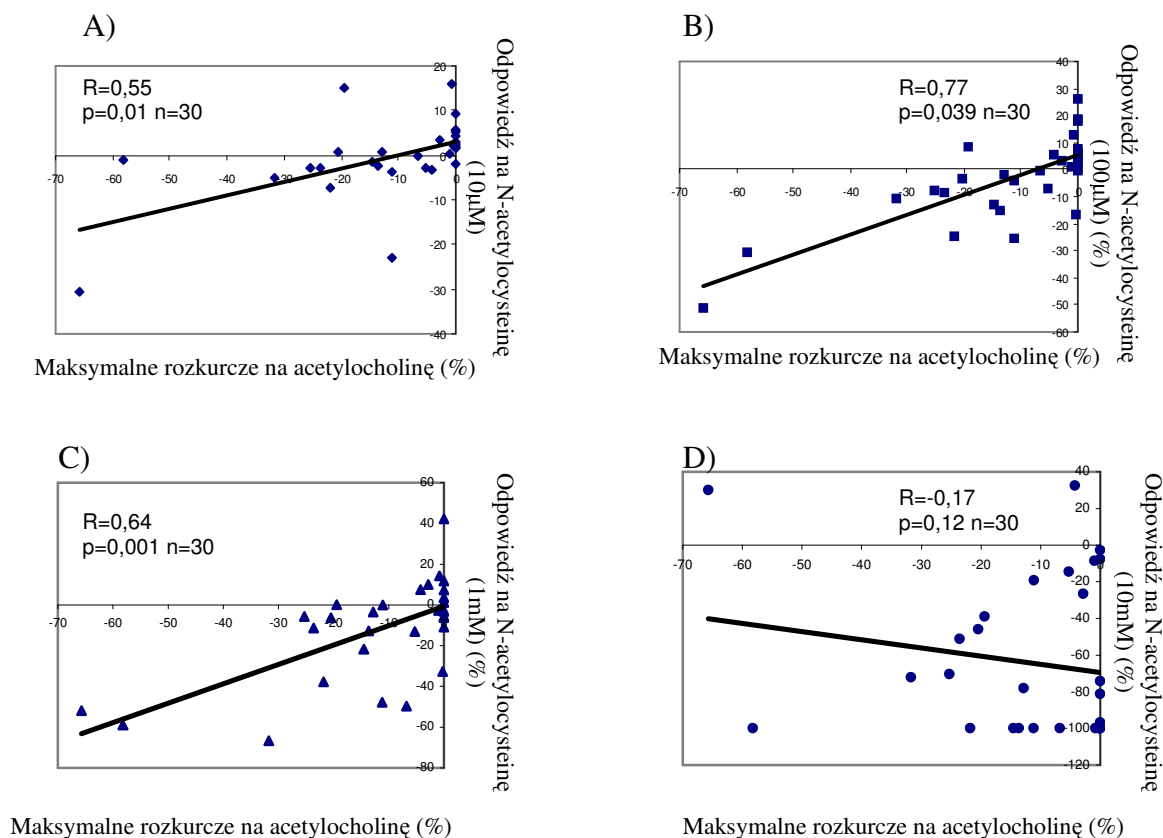


Ryc.IV.61. Porównanie naczyń ludzkich z małą i dużą dysfunkcją śródbłonna względem odpowiedzi na wzrastające dawki N-acetylocysteiny – wpływ dysmutazy ponadtlenkowej. A1,B1 – naczynia bez dysfunkcji A2,B2 – naczynia dysfunkcyjne. Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. Niektóre naczynia inkubowano przez ok. 20 min ze 100µM stężeniem SOD. Dane przedstawiają średnią ± SEM, \* p< 0,05 ; NAC vs NAC po SOD vs HSV. Ryc. A1, A2: Tętnice piersiowe wewnętrzne (IMA), Ryc. B1,B2: Żyły odpiszczelowe (HSV).

W ostatnim etapie badań próbowano określić zależność rozkurczów naczyniowych indukowanych przez NAC od stopnia uszkodzenia śródbłonka (mierzonego odpowiedzią na acetylocholinę). Stwierdzono, że w przypadku naczyń tętniczych najsilniejsza korelacja występowała w stężeniach NAC od 100µM do 1 mM (odpowiednio  $R=0,61$  i  $R=0,54$ ), a przy stężeniu wyższym tj. 10 mM nie występowała (Ryc.IV.62). W przypadku naczyń żylnych również najsilniejsza korelacja była dla stężeń NAC od 10µM do 1mM, a w zakresie stężeń wyższych (10mM) korelacja ta była niewielka i przechodziła w ujemną (Ryc.IV.63).



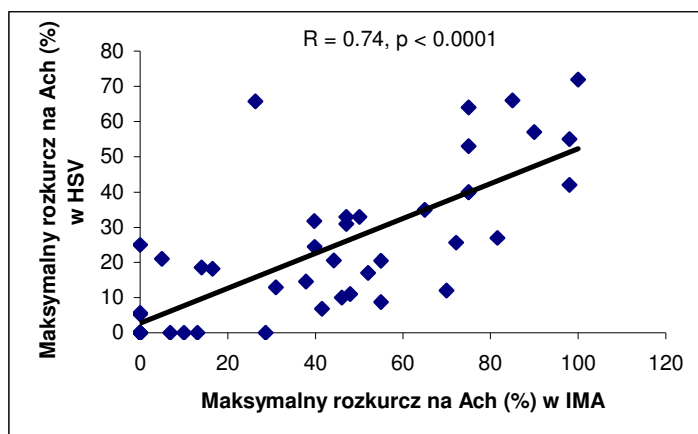
Ryc. IV.62. Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem na acetylocholinę a odpowiedzią na wzrastające dawki N-acetylocysteiny w tętnicach piersiowych wewnętrznych (IMA). Wielkość rozkurczu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. A: N-acetylocysteina w stężeniu 10 µM. B: N-acetylocysteina w stężeniu 100 µM. C: N-acetylocysteina w stężeniu 1 mM. D: N-acetylocysteina w stężeniu 10 mM.



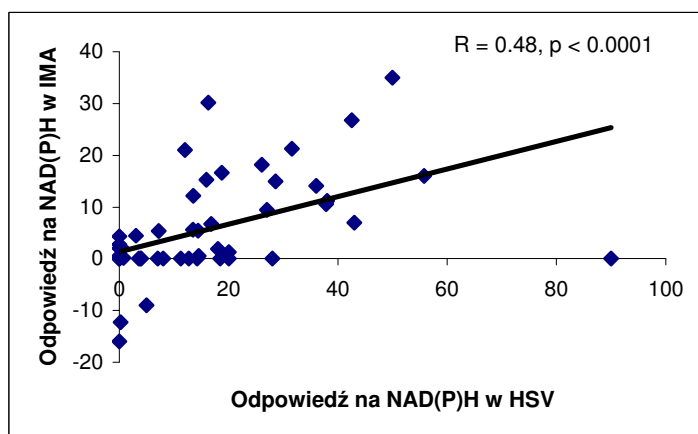
Ryc. IV.63. Korelacja pomiędzy maksymalnym rozkurczem na acetylocholinę, a odpowiedzią na wzrastające dawki N-acetylocysteiny w żyłach odpiszczelowych (HSV). Wielkość rozkurcu (-) lub skurczu (+) przedstawiona jest w % odpowiedzi na fenylefrynę. A: N-acetylocysteina w stężeniu 10  $\mu$ M. B: N-acetylocysteina w stężeniu 100  $\mu$ M. C: N-acetylocysteina w stężeniu 1 mM. D: N-acetylocysteina w stężeniu 10 mM.

#### VI.4. Związki współzależności pomiędzy dysfunkcją śródbłonna a stresem oksydacyjnym i aktywnością NAD(P)H oksydazy

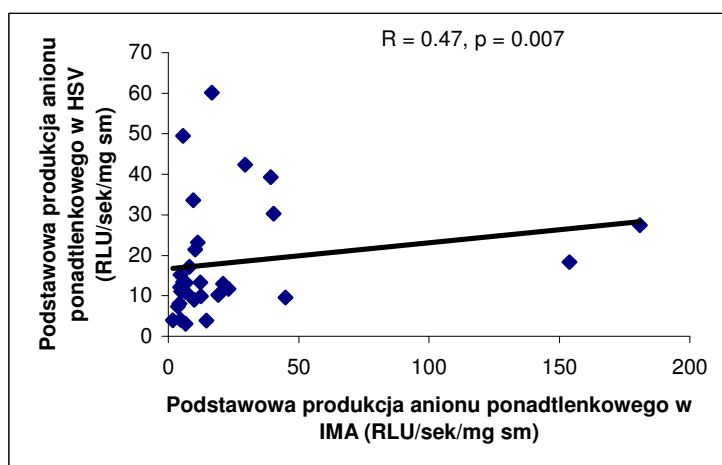
Korelację pomiędzy dysfunkcją śródbłonna a stresem oksydacyjnym badano w tętnicach i żyłach pochodzących od tego samego pacjenta poprzez odpowiedź na acetylocholinę (która była wyznacznikiem dysfunkcji śródbłonna), oraz poprzez produkcję anionu nadtlenkowego w odpowiedzi na NAD(P)H (która była wyznacznikiem aktywności oksydazy NAD(P)H). Wykazano istotną korelację występowania dysfunkcji śródbłonna (Ryc.IV.64), produkcji anionu nadtlenkowego (Ryc.IV.66) oraz aktywności oksydazy NAD(P)H (Ryc.IV.65 i 67) w naczyniach tętniczych (IMA) oraz żylnych (HSV) pochodzących od tego samego pacjenta.



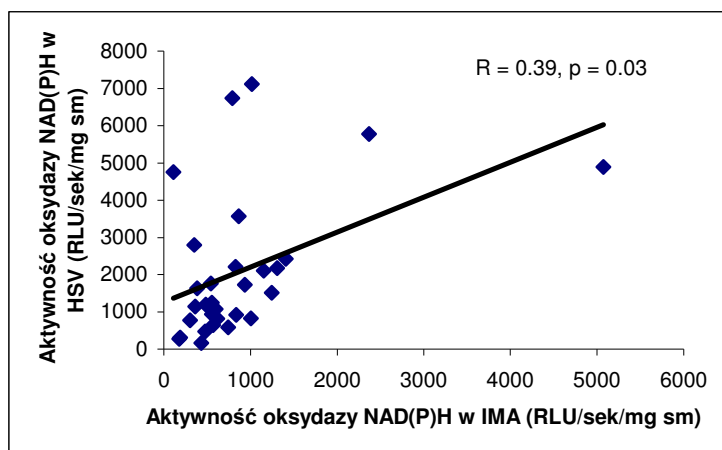
Ryc.IV.64. Korelacja pomiędzy maksymalnymi rozkurczami na Ach w tętnicach (IMA) i żyłach (HSV) pochodzących od tego samego chorego, n=90.



Ryc.IV.65. Korelacja pomiędzy odpowiedziami na NAD(P)H (aktywność oksydazy NAD(P)H określana metodą organ bath) w tętnicach (IMA) i żyłach (HSV) pochodzących od tego samego chorego, n=90. Stopień aktywności oksydazy NAD(P)H określany był poprzez zmianę tonusu naczyniowego w odpowiedzi na 100 $\mu$ M stężenie NAD(P)H.



Ryc.IV.66. Korelacja pomiędzy podstawową produkcją anionu ponadtlenkowego w tętnicach (IMA) i żyłach (HSV) pochodzących od tego samego chorego, n=60.

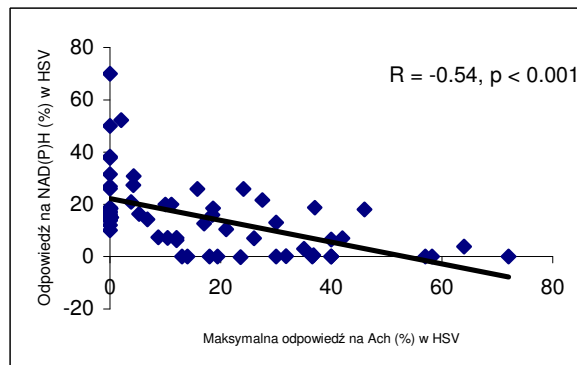
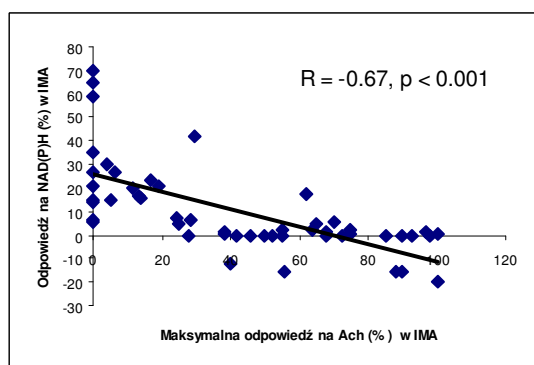


Ryc.IV.67. Korelacja pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H określanej metodą chemiluminescencji, w tętnicach (IMA) i żyłach (HSV) pochodzących od tego samego chorego, n=60. Aktywność oksydazy NAD(P)H mierzono poprzez detekcję sygnału po dodaniu do mierzonej próbki NAD(P)H w ilości dającej stężenie 100 $\mu$ M.

Wykazano ścisłą korelację pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonka a aktywnością oksydazy NAD(P)H (Ryc.IV.68 i 69) oraz produkcją anionu nadtlenkowego (Ryc.IV.70), zarówno w naczyniach tętniczych, jak i żylnych. Podobną korelację zaobserwowano pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H, a stopniem uwalniania wolnego O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Ryc.IV.71 i 72). Co ciekawe, istnieje silna korelacja pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonka a aktywnością oksydazy NAD(P)H, i to zarówno gdy aktywność oksydazy NAD(P)H mierzona była techniką *organ bath* (Ryc.IV.68), jak również techniką chemiluminescencji (Ryc.IV.69). Uderzające jest, że lepsze korelacje zarówno dla stopnia dysfunkcji śródbłonka, jak i parametrów stresu oksydacyjnego obserwowaliśmy w naczyniach tętniczych.

A) tętnice

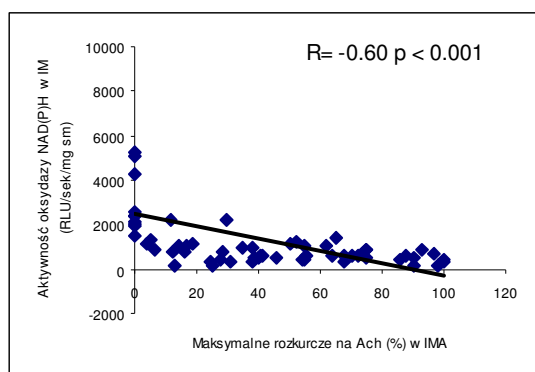
B) żyły



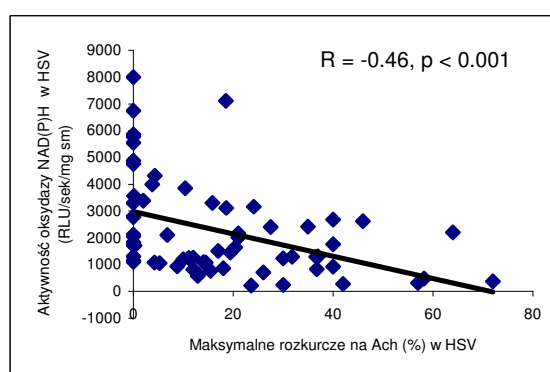
Ryc.IV.68. Korelacja pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonka a aktywnością oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętniczych (IMA;A) i żylnych (HSV;B). Oba parametry mierzono przy pomocy oceny zmian tonusu naczyniowego na podane substancje (metoda *organ bath*), n=90.



### A) tętnice

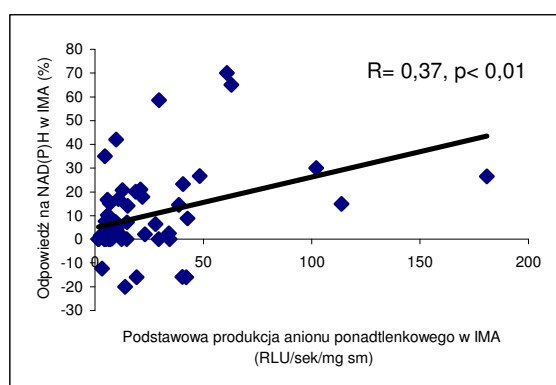


### B) żyły

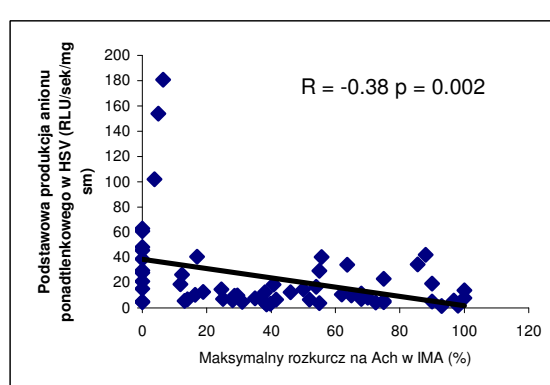


Ryc.IV.69. Korelacja pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna a aktywnością oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętniczych (IMA;A) i żylnych (HSV;B). Oba parametry mierzono przy pomocy różnych metod: dysfunkcję jako stopień zmian tonusu naczyniowego na Ach (metoda organ bath), a aktywność oksydazy NAD(P)H jako detekcję sygnału w sytuacji 100uM stężenia NAD(P)H (metoda chemiluminescencji) n=60.

### A) tętnice

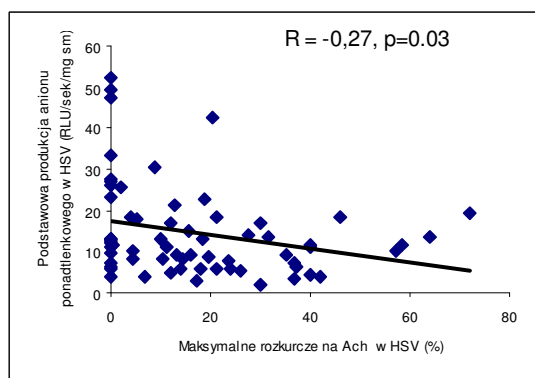


### B) żyły

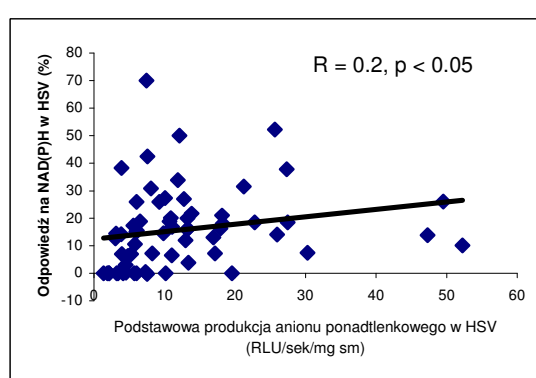


Ryc.IV.70. Korelacja pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna a poziomem podstawowej produkcji anionu ponadtlenkowego w naczyniach tętniczych (IMA;A) i żylnych (HSV;B). Oba parametry mierzono przy pomocy różnych metod: dysfunkcję jako stopień zmian tonusu naczyniowego na Ach (metoda organ bath), a aktywność produkcyjną anionu ponadtlenkowego jako detekcję sygnału naczynia (metoda chemiluminescencji) n=60.

### A) tętnice

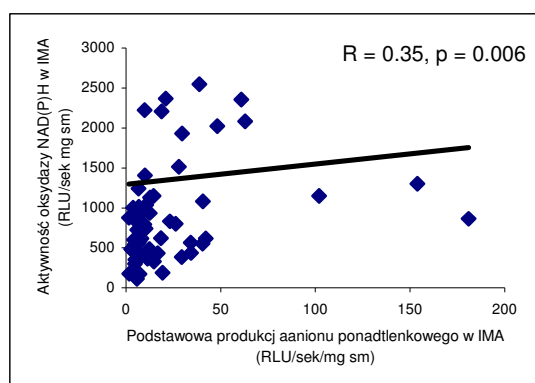


### B) żyły

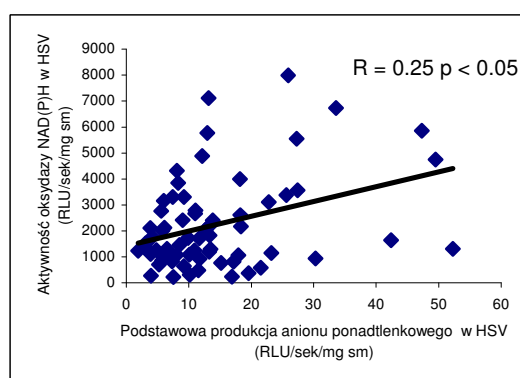


Ryc.IV.71. Korelacja pomiędzy podstawową produkcją anionu ponadtlenkowego a aktywnością oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętniczych (IMA;A) i żylnych (HSV;B). Oba parametry mierzono przy pomocy różnych metod: odpowiedź na NAD(P)H (aktywność oksydazy NAD(P)H) jako stopień zmian tonusu naczyniowego na NAD(P)H (metoda organ bath), a aktywność produkcyjną anionu ponadtlenkowego jako detekcję sygnału naczynia (metoda chemiluminescencji) n=60.

### A) tętnice



### B) żyły

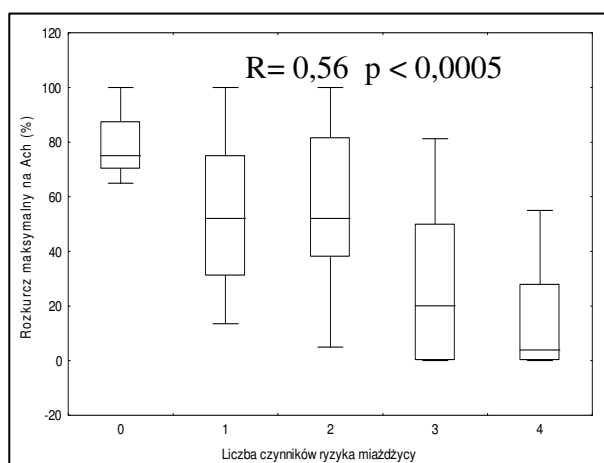


Ryc.IV.72. Korelacja pomiędzy podstawową produkcją anionu nadtlenkowego a aktywnością oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętnicznych (IMA;A) i żylnych (HSV;B). Oba parametry mierzono przy pomocy metody chemiluminescencyjnej, n=60.

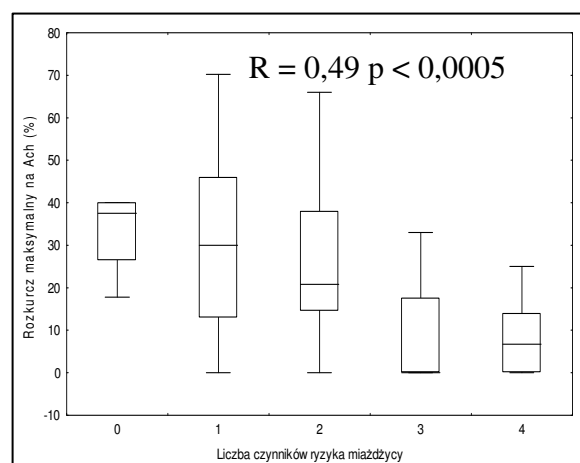
## VI.5. Czynniki ryzyka miażdżycy, a funkcja śródbłonna i produkcja anionu nadtlenkowego

Wykazano, że stopień dysfunkcji śródbłonna istotnie koreluje z podstawowymi czynnikami ryzyka miażdżycy tj. hipercholesterolemią, nadwagą, cukrzycą, nadciśnieniem oraz paleniem papierosów. Należy tutaj zaznaczyć, że obserwowana zależność w większym stopniu występowała dla tętnic niż żył (Ryc.IV.73).

### A) tętnice



### B) żyły



Ryc.IV.73. Korelacja pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna (ocenianej za pomocą odpowiedzi na Ach) a współwystępowaniem czynników ryzyka miażdżycy u poszczególnych chorych (wśród branych pod uwagę czynników były: nadciśnienie, hipercholesterolemia, cukrzyca, palenie oraz nadwaga). A: naczynia tętniczne, n=90, B: naczynia żyłne, n=110.

Zastosowanie wieloczynnikowej analizy statystycznej (test Anova), umożliwiającej oszacowanie wpływu poszczególnych czynników w powstawaniu zaburzonego fenotypu śródłonka, pozwoliło potwierdzić rolę palenia tytoniu, nadwagi i hipercholesterolemii. Nie zaobserwowano podobnych zależności dla nadciśnienia i cukrzycy (Tab.IV.2a i 2b).

Tabela IV.2a. Czynniki ryzyka miażdżycy związane z funkcją śródłonka w ludzkich tętnicach piersiowych.

Znaczenie poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy (CzR) wyznaczono przy pomocy sumy kwadratów t. III (ANOVA). Za miarę funkcji śródłonka przyjęto maksymalny rozkurcz w odpowiedzi na acetylocholinę.

Maksymalny rozkurcz na Ach (średni % ± SEM)					
Czynniki ryzyka (CzR)	n z CzR	n bez CzR	z CzR	bez CzR	p
Nadciśnienie	75	16	39,11±3,66	46,11±8,06	0,33
Hipercholesterolemia	49	42	26,75±3,96	55,09±4,54	<b>&lt; 0,0005</b>
Nadwaga	44	47	26,74±6,63	52,08±6,85	<b>&lt; 0,0005</b>
Palenie	39	52	31,67±6,19	44,25±3,8	<b>&lt; 0,05</b>
Cukrzyca	20	71	32,4±5,18	41,9±3,91	0,33

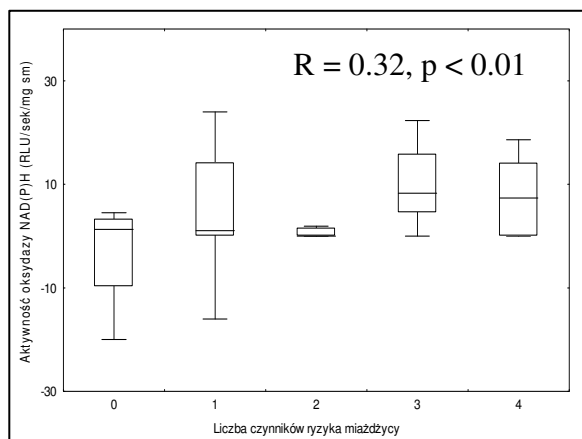
Tabela IV.2b. Czynniki ryzyka miażdżycy związane z funkcją śródłonka w ludzkich żyłach odpiszczelowych.

Znaczenie poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy (CzR) wyznaczono przy pomocy sumy kwadratów t. III (ANOVA). Za miarę funkcji śródłonka przyjęto maksymalny rozkurcz w odpowiedzi na acetylocholinę.

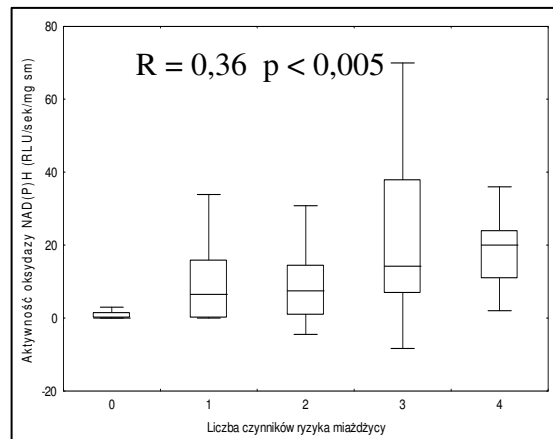
Maksymalny rozkurcz na Ach (średni % ± SEM)					
Czynniki ryzyka (CzR)	n z CzR	n bez CzR	z CzR	bez CzR	p
Nadciśnienie	76	31	20,02±2,15	21,87±4,4	0,52
Hipercholesterolemia	65	42	16,8±2,24	26,37±2,9	<b>&lt; 0,005</b>
Nadwaga	45	62	11,79±1,95	26,92±2,53	<b>&lt; 0,0005</b>
Palenie	38	69	17,38±2,73	22,31±2,18	<b>&lt; 0,05</b>
Cukrzyca	16	91	16,1±5,52	21,34±1,91	0,11

Wykazano również związek aktywności oksydazy NAD(P)H, wyrażanej zmianą odpowiedzi naczyniowej na NAD(P)H, z występowaniem czynników ryzyka miażdżycy. Zaobserwowano znamiennej korelację pomiędzy nadwagą, hipercholesterolemią, nadciśnieniem, paleniem i cukrzycą, a stopniem aktywności oksydazy NAD(P)H (Ryc.IV.74). Zależność ta była silniej wyrażona dla naczyń tętniczych.

A) tętnice



B) żyły



Ryc.IV.74. Korelacja pomiędzy stopniem aktywności oksydazy NAD(P)H (ocianianej za pomocą odpowiedzi na 100µM stężenie NAD(P)H), a współwystępowaniem czynników ryzyka miażdżycy u poszczególnych chorych (wśród branych pod uwagę czynników były: nadciśnienie, hipercholesterolemia, cukrzyca, palenie oraz nadwaga). A:naczynia tętnicze, n=90, B: naczynia żyłne, n=110.

Potwierdzono rolę nadwagi oraz hipercholesterolemii w zdolności do aktywacji oksydazy (Tab.IV.3a i 3b) w naczyniach tętniczych i żylnych.

Tabela IV.3a. Związek wybranych czynników ryzyka miażdżycy z aktywnością naczyniowej oksydazy NAD(P)H w ludzkich tętnicach piersiowych.

Znaczenie poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy (CzR) wyznaczono przy pomocy sumy kwadratów t. III (ANOVA). Za miarę aktywności oksydazy NAD(P)H przyjęto zmianę tonusu naczyniowego wywołanego podaniem NAD(P)H.

Czynniki ryzyka (CzR)	n z CzR	n bez CzR	Odpowiedź na NAD(P)H (średnia % ± SEM)		p
			z CzR	bez CzR	
Nadciśnienie	62	16	6,62±1,54	3,91±2,29	0,58
Hipercholesterolemia	39	39	9,17±1,97	2,96±1,6	<b>&lt; 0,05</b>
Nadwaga	39	39	10,02±1,93	2,11±1,55	<b>&lt; 0,005</b>
Palenie	23	55	6,3±3,28	5,97±1,28	0,85
Cukrzyca	15	63	6,15±1,63	6,05±1,58	0,76

Tabela IV.3b. Związek wybranych czynników ryzyka miażdżycy z aktywnością naczyniowej oksydazy NAD(P)H w ludzkich żyłach odpiszczelowych.

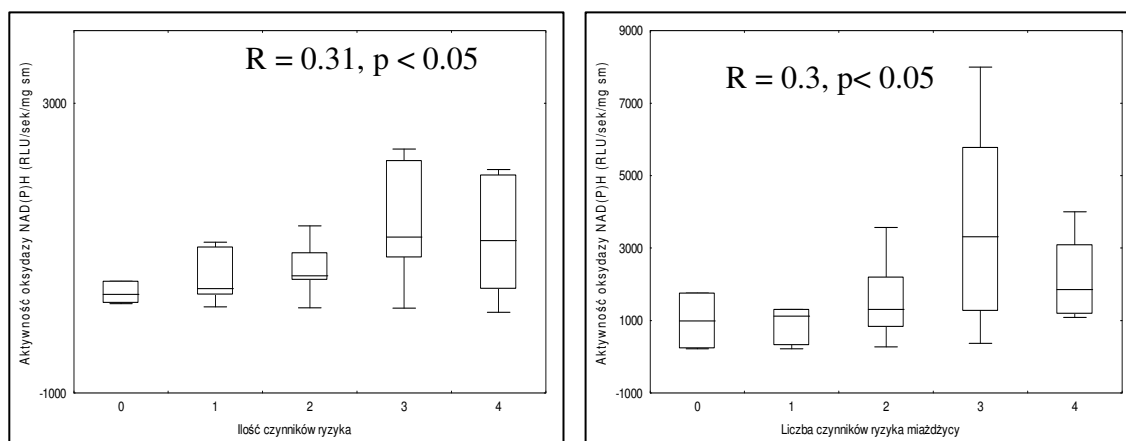
Znaczenie poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy (CzR) wyznaczono przy pomocy sumy kwadratów t. III (ANOVA). Za miarę aktywności oksydazy NAD(P)H przyjęto zmianę tonusu naczyniowego wywołanego podaniem NAD(P)H.

Czynniki ryzyka (CzR)	n z CzR	n bez CzR	Odpowiedź na NAD(P)H (średnia arytmetyczna % ± SEM)		p
			z CzR	bez CzR	
Nadciśnienie	67	25	13,42 ± 1,84	14,28 ± 2,8	0,82
Hipercholesterolemia	56	36	17,32 ± 2,16	7,93 ± 1,63	< 0,005
Nadwaga	42	50	18,28 ± 2,25	9,77 ± 1,94	< 0,005
Palenie	30	67	16,71 ± 3,29	12,17 ± 1,61	0,35
Cukrzyca	14	78	16,49 ± 3,49	13,14 ± 1,69	0,21

Również aktywność oksydazy NAD(P)H mierzona metodą chemiluminescencji znamienne korelowała z występowaniem klasycznych czynników ryzyka (Ryc.IV.75).

A) tętnice

B) żyły



Ryc.IV.75. Korelacja pomiędzy stopniem aktywności oksydazy NAD(P)H (ocanianej za pomocą chemiluminescencji), a współwystępowaniem czynników ryzyka miażdżycy u poszczególnych chorych (wśród branych pod uwagę czynników były: nadciśnienie, hipercholesterolemia, cukrzyca, palenie oraz nadwaga). A: naczynia tętnicze, n=90, B: naczynia żyłne, n=110.

Potwierdzono rolę palenia i nadwagi w przypadku naczyń tętniczych, oraz nadwagi w przypadku żył, w generowaniu tego zjawiska (Tab.IV.4a i 4b).

Tabela IV.4a. Związek wybranych czynników ryzyka miażdżycy z aktywnością naczyniowej oksydazy NAD(P)H w ludzkich tętnicach piersiowych.

Znaczenie poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy (CzR) wyznaczono przy pomocy sumy kwadratów t. III (ANOVA). Za miarę aktywności oksydazy NAD(P)H przyjęto pomiar uwalniania O<sub>2</sub>- metodą chemiluminescencji w odpowiedzi na 100μM stężenie NAD(P)H

Czynniki ryzyka (CzR)	Odpowiedź na NAD(P)H (średnia % ± SEM)				
	n z CzR	n bez CzR	z CzR	bez CzR	p
Nadciśnienie	41	9	1362,12±468,5	1091,6±229,1	0,97
Hipercholesterolemia	27	23	1778±746,2	828,2±172,5	0,15
Nadwaga	32	18	1300,6±273,6	670,7±176,6	<b>&lt; 0,05</b>
Palenie	38	12	2616,2±1352,6	893,1±164,1	<b>&lt; 0,05</b>
Cukrzyca	39	11	2150,7±1386,7	1003,2±174,8	0,45

Tabela IV.4b. Związek wybranych czynników ryzyka miażdżycy z aktywnością naczyniowej oksydazy NAD(P)H w ludzkich żyłach odpiszczelowych.

Znaczenie poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy (CzR) wyznaczono przy pomocy sumy kwadratów t. III (ANOVA). Za miarę aktywności oksydazy NAD(P)H przyjęto pomiar uwalniania O<sub>2</sub>- metodą chemiluminescencji w odpowiedzi na 100μM stężenie NAD(P)H

Czynniki ryzyka (CzR)	Odpowiedź na NAD(P)H (średnia % ± SEM)				
	n z CzR	n bez CzR	z CzR	bez CzR	p
Nadciśnienie	45	15	2181,6±302,6	1811±405,1	0,53
Hipercholesterolemia	34	26	2565±366,8	1828,1±248,3	0,15
Nadwaga	25	35	2700,8±368,4	1888±294,1	<b>&lt; 0,05</b>
Palenie	36	24	2683,7±7467,4	2003,6±264,3	0,15
Cukrzyca	47	13	2129,8±530,9	2179,4±295,3	0,76

Nie zaobserwowano statystycznie istotnej korelacji pomiędzy niestymulowaną (podstawową) produkcją anionu ponadtlenkowego, a występowaniem czynników ryzyka miażdżycy (danych nie przedstawiono).

## V. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Opracowano metodę oceny dysfunkcji śródbłonka w oparciu o pomiar stymulowanej podaniem NADPH aktywności oksydazy NAD(P)H w izolowanych naczyniach krwionośnych szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym. Wykazano skuteczność powyższej metody w oszacowaniu stopnia dysfunkcji śródbłonka w naczyniach ludzkich. Podjęto próbę oceny wpływu niektórych antyoksydantów na korektę zaburzonych odpowiedzi śródbłonkowych naczyń ludzkich.

Badania wykazały, że:

- 1) Produkcja anionu ponadtlenkowego jest podwyższona u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym. Głównym źródłem nadprodukcji  $O_2^-$  jest oksydaza NAD(P)H. Usunięcie śródbłonka znacząco zmniejsza nadprodukcję  $O_2^-$ .
- 2) Aktywność oksydazy NAD(P)H stymulowana podaniem egzogenego NAD(P)H jest znamienne wyższa w przypadku szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym.
- 3) W warunkach stresu oksydacyjnego, indukowanego NAD(P)H, głównym źródłem anionu ponadtlenkowego u szczurów jest oksydaza NAD(P)H. W przypadku szczurów nadciśnieniowych pewną rolę odgrywa dysfunkcyjna syntaza tlenu azotu. Za każdym razem zaznaczony jest wpływ obecności śródbłonka na wielkość produkcji anionu ponadtlenkowego.
- 4) Nie udało się wykazać obecności dysfunkcji śródbłonka u szczurów nadciśnieniowych za pomocą standardowego testu po podaniu acetylocholino. Udało się jednak wykazać zmniejszoną biodostępność tlenu azotu w obrębie naczyń hipertensyjnych.
- 5) Istnieją jakościowo różne odpowiedzi naczyń szczurzych w odpowiedzi na egzogeny NAD(P)H. W przypadku naczyń hipertensyjnych obserwowano skurcze, podczas gdy w naczyniach normotensyjnych obserwowano rozkurcze naczyń. Wykazano, że te jakościowo różne odpowiedzi naczyń szczurzych zależą od obecności śródbłonka.
- 6) W przypadku NAD(P)H-zależnych rozkurczów naczyń reakcja ta zależy od aktywności oksydazy NAD(P)H. Kluczowy udział w powstawaniu powyższych

rozkurczów ma ponadto uwalnianie w naczyniu wody utlenionej i tlenku azotu. Wydaje się, że woda utleniona realizuje w poważnym stopniu swoje działanie rozkurczowe poprzez powstanie tlenku azotu.

7) W przypadku NAD(P)H-zależnych skurczów naczyniowych reakcje te zależą od aktywności oksydazy NAD(P)H i od produkowanego przez nią anionu ponadtlenkowego.

8) Wraz ze starzeniem się zwierząt powiększa się naczyniowa produkcja anionu ponadtlenkowego (większe nasilenie dysfunkcji śródbłonka występuje w aortach szczurów nadciśnieniowych).

9) W tętnicach oraz żyłach ludzkich obserwowana produkcja anionu ponadtlenkowego jest zależna głównie od aktywności oksydazy NAD(P)H. Dodatkowym źródłem  $O_2^-$  w naczyniach tętnicznych wydaje się być oksydaza ksantynowa.

10) Aktywność oksydazy NAD(P)H jest wyższa w żyłach odpiszczelowych niż w tętnicach piersiowych wewnętrznych. Wykazano silniejsze rozkurcze naczyniowe po acetylocholinie w obrębie tętnic niż żył uzyskanych od tego samego pacjenta.

11) W sytuacji stymulacji oksydazy NAD(P)H przeważnie występują skurcze ludzkich naczyń krwionośnych. NAD(P)H-zależne skurcze naczyniowe wynikały z aktywności oksydazy NAD(P)H oraz następczej produkcji anionu ponadtlenkowego. W tętnicach, w których obserwowano NAD(P)H-zależne rozkurcze naczyniowe (sytuacja zbliżona do naczyń szczurów normotensyjnych), wykazano mniejsze nasilenie dysfunkcji śródbłonka. NAD(P)H-zależne rozkurcze naczyniowe zależne były od biodostępności tlenku azotu.

12) Możliwa jest poprawa zaburzonych odpowiedzi śródbłonkowych w naczyniach tętnicznych człowieka „*in vitro*” po zastosowaniu dysmutazy ponadtlenkowej – naturalnego antyoksydanta. Przy czym poprawa ta jest wyraźniejsza w przypadku naczyń z bardziej zaawansowaną dysfunkcją śródbłonka.

13) Zastosowanie N-acetylocysteiny (NAC), spowodowało występowanie rozkurczów naczyniowych zarówno w naczyniach tętnicznych, jak i żylnych. Wykazano korelację pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonka w tętnicach i żyłach oraz rozkurczami na NAC. Wydaje się, że podstawową rolę w generowaniu tego zjawiska odgrywa wpływ N-acetylocysteiny na interakcję pomiędzy NO i  $O_2^-$ .



14) W ludzkich naczyniach tętniczych i żylnych zarówno dysfunkcja śródbłonna, jak i aktywność oksydazy NAD(P)H wydaje się dobrze korelować z profilem czynników ryzyka miażdżycy.

15) Stopień dysfunkcji śródbłonna w naczyniach tętniczych dobrze koreluje z poziomem dysfunkcji śródbłonna naczyń żylnych uzyskanych od tego samego chorego.

16) Istnieje istotna zależność pomiędzy dysfunkcją śródbłonna naczyniowego a występowaniem u chorych niektórych czynników ryzyka miażdżycy, w tym: nadwagi, palenia papierosów czy hipercholesterolemii. Nie udało się podobnej korelacji wykazać dla nadciśnienia tętniczego.

## VI. DYSKUSJA

### VI.1. Badania naczyń od szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym

#### VI.1.1. Generacja anionów nadadtlenkowych w warunkach podstawowych

W niniejszej pracy wykazano zwiększenie produkcji anionów nadadtlenkowych w aortach uzyskanych od szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym (SHR). Podobne zależności obserwowane były przez innych badaczy, i to zarówno w homogenatach (109), jak i w całych naczyniach (112,165). Ponieważ usunięcie śródbłoka w aortach szczurów SHR powodowało w naszych doświadczeniach zmniejszenie produkcji anionu nadadtlenkowego, wydaje się że u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem produkcja anionu nadadtlenkowego jest zależna od obecności śródbłoka. Istnieją jednak również doniesienia, demonstrujące wzrost produkcji anionu nadadtlenkowego u szczurów bez nadciśnienia, pod warunkiem, że są one wystarczająco stare. Dlatego sądzimy, że do doświadczeń na śródbłoku od szczurów SHR powinny być użyte zwierzęta zawsze w tym samym wieku, a w interpretacji wyników pochodzących z doświadczeń na zwierzętach w różnym wieku (112) winna być zachowana szczególna ostrożność.

W celu określenia źródła pochodzenia anionu nadadtlenkowego w aortach szczurzych mierzyliśmy produkcję anionu nadadtlenkowego po wcześniejszej inkubacji naczyń z inhibitorami różnych oksydaz naczyniowych. W ten sposób byliśmy w stanie wykazać znaczne zahamowanie produkcji anionu nadadtlenkowego w tętnicach zwierząt z nadciśnieniem i wnosimy stąd, że kluczową rolę w nadprodukcji anionu nadadtlenkowego w samoistnym nadciśnieniu tętniczym odgrywa oksydaza NAD(P)H. Podobne obserwacje poczynił Hamilton i wsp.(112). Obecnie istnieją też dane molekularne, wskazujące, że w nadciśnieniu tętniczym dochodzi w naczyniach krwionośnych do podwyższonej ekspresji podjednostek oksydazy NAD(P)H i tym samym zwiększenia jej aktywności (109,166). Co ciekawe, podwyższona jest w nadciśnieniu również ekspresja i aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (166,167). Powstaje zatem w nadciśnieniowych naczyniach dość niezwykła sytuacja polegająca na tym, że za dysfunkcję śródbłoka staje się odpowiedzialna nadprodukcja anionu nadadtlenkowego, która, pomimo zwiększonej aktywności syntazy NO pozostaje

niedostatecznie równoważona zwiększonym uwalnianiem tlenu azotu. Jak dowodzą badania Morawietza i wsp., nie bez znaczenia dla efektów działania NO w naczyniach nadciśnieniowych może być także zmniejszona ekspresja i aktywność rozpuszczalnej cyklicznej guanylowej (165).

Produkcja anionu nadadtlenkowego u szczurów nadciśnieniowych była w naszych doświadczeniach znamienne hamowana przez dysmutazę nadadtlenkową - SOD. Ponieważ istnieją doniesienia, że SOD hamuje produkcję anionu nadadtlenkowego (109), również w przypadku naczyń pochodzących od szczurów normotensyjnych, może to wskazywać, że powiększająca się w przebiegu nadciśnienia dysfunkcja śródbłonna, zależna od nadprodukcji nadadtlenków, niekoniecznie musi mieć związek ze skutecznością endogennego SOD w ograniczaniu produkcji nadadtlenków. Czy jednak tak jest w istocie, trudno mieć pewność. Zastanawiające jest, że w naczyniach szczurów nadciśnieniowych opisywano zarówno wzrost ekspresji i aktywności endogennej SOD (88), jak i jej obniżenie (168). W naszych nielicznych doświadczeniach (dane nie przedstawione) nie byliśmy w stanie dostrzec różnicy w ekspresji i aktywności dysmutazy nadadtlenkowej w naczyniach szczurów nadciśnieniowych i normotensyjnych. Z drugiej strony, w obecności inhibitora dysmutazy nadadtlenkowej (DETC) zaobserwowaliśmy znamienne wzrost produkcji  $O_2^-$ , zarówno w naczyniach zwierząt nadciśnieniowych, jak i bez nadciśnienia.

#### VI.1.2. Generacja anionów nadadtlenkowych w warunkach aktywacji (stres oksydacyjny)

Aktywacja oksydazy NAD(P)H przy użyciu nadmiaru substratu (NADPH) prowadziła do wytwarzania w aortach znacznych ilości anionów nadadtlenkowych. U szczurów nadciśnieniowych był to 40-krotny wzrost, a u szczurów normotensyjnych 25-krotny w stosunku do warunków podstawowych.

W warunkach podstawowych produkcja anionu nadadtlenkowego przez naczynia szczurów nadciśnieniowych była około 2,5 razy wyższa, niż u zwierząt normotensyjnych. Obserwacje te wydają się świadczyć nie tylko o wzmożonej aktywności naczyniowej oksydazy NAD(P)H w nadciśnieniu tętniczym, ale przede wszystkim o zwiększonej podatności naczyń w nadciśnieniu na stres oksydacyjny wywołany podaniem NADPH.

Wzrost generacji anionów nadadtlenkowych w chorobie nadciśnieniowej opisywany był dla kilku różnych modeli tej choroby (109,167), w tym także u szczurów

z samoistnym, skrajnie podwyższonym ciśnieniem tętniczym (*stroke-prone* SHR) (112) oraz u szczurów z nadciśnieniem tętniczym indukowanym angiotensyną II (62). W tym ostatnim przypadku podwyższoną aktywność naczyniowej oksydazy NAD(P)H u szczurów nadciśnieniowych potwierdzono wykazaniem zwiększonej ekspresji p22phox - podstawowej podjednostki oksydazy NAD(P)H. (62).

Usunięcie śródbłonna w aortach szczurzych powodowało znaczne zahamowanie stymulowanej produkcji anionu nadadtlenkowego, i to zarówno u szczurów nadciśnieniowych, jak i normotensyjnych. Potwierdzają to publikowane już doniesienia (208), iż nadmiar produkcji anionu nadadtlenkowego, obserwowany w warunkach stresu oksydacyjnego, zależy od obecności śródbłonna.

Przeprowadzona przez nas farmakologiczna analiza źródeł pochodzenia anionu nadadtlenkowego z użyciem inhibitorów oksydaz naczyniowych potwierdziła, że także w warunkach stresu oksydacyjnego za produkcję  $O_2^-$  w największym stopniu odpowiada śródbłonkowa oksydaza NAD(P)H (apocynina niemal całkowicie hamuje tę produkcję). Dodatkowym źródłem, ale tylko w przypadku naczyń uzyskanych od szczurów nadciśnieniowych, wydaje się być syntaza tlenu azotu (NOS). Najprawdopodobniej w nadciśnieniu tętniczym z powodu nadmiernej produkcji anionu nadadtlenkowego dochodzi do tzw. efektu rozprężenia NOS, polegającego na produkowaniu przez nią więcej  $O_2^-$  niż NO.

Fakt, że oksydaza NAD(P)H, jest głównym enzymem odpowiedzialnym za generowanie anionu nadadtlenkowego, pozostaje w zgodzie ze wszystkimi dotychczas publikowanymi wynikami (109,167).

W przypadku jednak syntazy tlenu azotu sytuacja jest bardziej złożona. Badania Kerr i wsp. wykazały znaczącą rolę NO-syntazy tlenu w produkcji  $O_2^-$  w naczyniach nadciśnieniowych, lecz był to model szczurów SHR z bardzo wysokim ciśnieniem (*stroke-prone* SHR) (155). W innych badaniach na szczurach SHR wykazano co prawda różnicę w produkcji  $O_2^-$  przed i po zahamowaniu NOS, ale nie była to odpowiedź statystycznie znamienne (167), prawdopodobnie z powodu niewielkiej liczby eksperymentów.

W celu potwierdzenia tożsamości anionu nadadtlenkowego przeprowadziliśmy doświadczenia z dysmutazą nadadtlenkową i tironem – związkami obniżającymi stężenie  $O_2^-$ . W obu przypadkach obecność  $O_2^-$  została farmakologicznie potwierdzona zahamowaniem jego wytwarzania.

W naszych doświadczeniach prześledziliśmy też wpływ endogennej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) na przebieg stresu oksydacyjnego. W tym celu wykonano eksperymenty z użyciem selektywnego inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej - DETC. Zarówno w naczyniach od zwierząt normo- jak i hipertensyjnych po DETC uzyskano istotny wzrost produkcji anionu ponadtlenkowego, co dowodzi, że endogenny SOD zdolny jest do regulacji homeostazy oksydoredukcyjnej zarówno w naczyniach zdrowych, jak i dysfunkcyjnych.

### VI.1.3. Reakcje naczynioruchowe in vitro w samoistnym nadciśnieniu tętniczym

Zastosowano standardową metodę wykorzystywaną do oznaczania stopnia dysfunkcji śródbłonka w izolowanych naczyniach krwionośnych, polegającą na ocenie wielkości śródbłonkowo-zależnych rozkurczów naczyń na wzrastające dawki acetylocholiny.

Na początku do doświadczeń użyliśmy aorty od czteromiesięcznych zwierząt z nadciśnieniem. Nie stwierdziliśmy jednak znamienych różnic w odpowiedzi na acetylocholinę pomiędzy aortami kontrolnymi i pochodzącymi od zwierząt z nadciśnieniem. Mogłoby to świadczyć, że samoistne nadciśnienie tętnicze u szczurów wcale nie wywołuje dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, objawiającej się zmniejszeniem rozkurczowych odpowiedzi na acetylocholinę. Tak jednak nie jest. Brak dysfunkcji śródbłonka, stwierdzony w aortach zwierząt z nadciśnieniem, był po prostu, jak uważamy, wynikiem użycia przez nas zwierząt zbyt młodych (4-miesięcznych). Wielu badaczy wyraża przekonanie, że mniejsze rozkurcze naczyń na acetylocholinę (dysfunkcja śródbłonka) u szczurów nadciśnieniowych zdarzają się dopiero po przekroczeniu wieku sześciu miesięcy (109,169). Istotnie, na podstawie naszych badań przychyłamy się do opinii, w tym także Chamiot-Clerc (170), że o stopniu dysfunkcji śródbłonka w nadciśnieniu tętniczym u szczurów SHR decyduje wiek zwierząt i potwierdzamy, że przy użyciu acetylocholiny bezpośrednio nie można zaobserwować upośledzonej funkcji śródbłonka w nadciśnieniu u młodych szczurów. Natomiast wykazaliśmy upośledzenie odpowiedzi śródbłonkowych w naczyniach szczurów nadciśnieniowych w wieku starszym, a co nawet bardziej interesujące, zdołaliśmy spostrzec dysfunkcję także u młodych SHR, ale w sposób pośredni. Zastosowaliśmy mianowicie inhibitor syntazy tlenu azotu (L-NAME) zarówno u 4-miesięcznych zwierząt kontrolnych, jak i u odpowiadających im wiekowo SHR.

Zaobserwowaliśmy, że aorty od zwierząt bez nadciśnienia odpowiadały na L-NAME (zahamowanie NO-syntazy) znamienne większym skurczem, niż te z nadciśnieniem. Wyjaśniam, iż skurczową odpowiedź aorty na L-NAME uważa się za wynik wyeliminowania ze śródbłonka naczyń rozszerzającego tlenu azotu i naruszenia równowagi w utrzymaniu napięcia mięśni gładkich pomiędzy śródbłonkowymi czynnikami naczyń rozszerzającymi i naczyniokurczącymi na korzyść tych ostatnich. W ten sposób, jak sądzimy, obserwowany przez nas większy niż w nadciśnieniu skurcz aorty na L-NAME u zwierząt kontrolnych może świadczyć prawdopodobnie o generowaniu większej ilości tlenu azotu w naczyniach zwierząt nie mających nadciśnienia. Podobne doświadczenia opisywane już były przez innych badaczy (112,171,172).

W kolejnym etapie badań podjęliśmy próbę oceny działania związków, zmieniających potencjał oksydoredukcyjny komórki, tzn. SODu, katalazy i tironu. Założyliśmy, że zmiany w stężeniu wolnych rodników w naczyniach (w tym głównie anionu nadadtlenkowego), wywołane podaniem powyższych związków, powinny wpływać na napięcie mięśni gładkich ściany naczyniowej, między innymi poprzez zmianę dostępności tlenu azotu (tlenek azotu jest unieczynniany przez anion nadadtlenkowy) w zależności od stopnia dysfunkcji śródbłonka (nadciśnienie vs kontrola). Nie udało się jednak zaobserwować znamienne różnych reakcji, ani na dysmutazę nadadtlenkową, ani na tiron i katalazę. Natomiast zaobserwowaliśmy przeciwstawne odpowiedzi na podanie NADPH w naczyniach pochodzących od zwierząt nadciśnieniowych i kontrolnych. Podczas gdy w naczyniach uzyskanych od szczurów nadciśnieniowych (SHR) podanie NAD(P)H powodowało reakcję skurczową, w naczyniach od zwierząt normotensyjnych (WKY) obserwowano rozkurcze. Jest to pierwsza opisana obserwacja takiego zjawiska. Dotychczas, opublikowano na przykład, że wygenerowanie anionu nadadtlenkowego przez enzymatyczny układ generujący ksantina/oksydaza ksantynowa wywołuje skurcz aorty szczurzej, przy czym skurcz aorty SHR był znamienne większy, niż aorty kontrolnej WKY (173). W tych doświadczeniach podanie zarówno dysmutazy nadadtlenkowej, jak i „wymiatacza wolnych rodników” hamowało skurczowe odpowiedzi.

Inni badacze w doświadczeniach przeprowadzonych na szczurach wykazali co prawda występowanie rozkurczów naczyniowych na NAD(P)H (174), ale obserwowano je zarówno u szczurów SHR, jak i WKY, a ponadto dotyczyły naczyń mózgowych, a nie aorty. Autorzy próbowali wytłumaczyć rozkurcze naczyniowe

przetwarzaniem anionu ponadtlenkowego w nadtlenek wodoru – substancji znanej ze swoich właściwości naczyniorozszerzających (175,176).

Doświadczenia przeprowadzone przeze mnie w niniejszej pracy wskazują, że odpowiedzi naczyniowe na NAD(P)H, przynajmniej częściowo, mogą być wypadkową działania dwóch sił: skurczu mięśni gładkich indukowanego przez aniony ponadtlenkowe oraz rozkurczu wywołanego jednoczesnym powstawaniem nadtlenu wodoru. Z drugiej strony, kluczowym elementem decydującym, jak się wydaje, o stężeniu anionu ponadtlenkowego jest dostępność tlenu azotu, uzależniona z kolei od stopnia dysfunkcji naczyniowego śródbłonna. Jak wykazały doświadczenia chemiluminescencyjne, aorty szczurów nadciśnieniowych generują znacznie więcej  $O_2^-$  niż naczynia szczurów kontrolnych. Wydaje się prawdopodobne, że w momencie osiągnięcia wysokiego stężenia anionu ponadtlenkowego, ta jego część, która nie może przereagować z dysmutazą ponadtlenkową, reaguje z tlenkiem azotu, wywołując skurcz naczyń. Dla ostatecznego wyniku odpowiedzi naczyniowej ważna jest również wielokrotnie większa szybkość reakcji anionu ponadtlenkowego z tlenkiem azotu niż szybkość reakcji z SOD (54), gdyż doprowadza ona do nierównowagi pomiędzy czynnikami naczyniorozszerzającymi i naczyniokurczącymi. Dodatkowo, w przypadku nadmiaru  $O_2^-$  może dochodzić do wspomnianego już zjawiska „rozprężenia” syntazy tlenu azotu, która zamiast produkować NO, zaczyna generować anion ponadtlenkowy (12,54,177). Przypuszczamy wręcz, że w sytuacji niewielkiej generacji anionów ponadtlenkowych, ta ich część, która ulega przemianie do nadtlenu wodoru, może rekompensować, a nawet przewyższać ubytek tlenu azotu. Niestety, nie udało się nam ani za pomocą podania mniejszej ilości NAD(P)H, ani też przy użyciu układu ksantyna/oksydaza ksantynowa wygenerować w aortach szczurów SHR takiego stężenia  $O_2^-$ , które będąc bliskie stężeniu uzyskiwanemu po podaniu NAD(P)H na aorty szczurów kontrolnych, doprowadziłoby również do wywołania ich rozkurczu. Pośrednich dowodów, potwierdzających nasze powyższe spekulacje, dostarczyliśmy jednak w doświadczeniach z hamowaniem oksydazy NAD(P)H apocyniną. Po apocyninie skurcze aorty szczurów SHR na podanie NAD(P)H zamieniły się w rozkurcze. Dowiodło to, że po zahamowaniu oksydazy dochodzi w naczyniach do zmiany równowagi na korzyść czynników naczyniorozszerzających. Podobne zmiany odpowiedzi obserwowano po zastosowaniu innych antyoksydantów tj. dysmutazy ponadtlenkowej i tironu. Wydaje się, że za każdym razem, kiedy usuwaliśmy aniony ponadtlenkowe

w naczyniach zwierząt nadciśnieniowych, przybliżaliśmy je jakby do warunków kontrolnych.

W przypadku tętnic WKY zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) nie tylko nie hamowało rozkurczowych odpowiedzi na NAD(P)H, ale wręcz je potęgowało. Co ciekawe, apocynina drastycznie zmniejszała rozkurcz aorty na NAD(P)H. Nie powinno to dziwić, jeśli przyjąć, że o odpowiedzi rozkurczowej decyduje w dużej mierze powstawanie nadtlenku wodoru z anionu ponadtlenkowego, a apocynina, hamując powstawanie anionu ponadtlenkowego, zatrzymuje również wytwarzanie nadtlenku wodoru. Z drugiej strony SOD, który katalizuje reakcję przekształcenia  $O_2^-$  w nadtlenek wodoru, nie powinien nie tylko nie hamować, ale wręcz potęgować, rozkurcze na NAD(P)H, co, jak wykazaliśmy, rzeczywiście czyni.

Powyższy mechanizm potwierdza również doświadczenie, w którym zahamowanie dysmutazy ponadtlenkowej przy użyciu DETC skutkowało całkowitym zahamowaniem rozkurczowych odpowiedzi naczyniowych.

O ile zahamowanie NAD(P)H-zależnych rozkurczów naczyń szczurów WKY przez katalazę da się łatwo wytłumaczyć zahamowaniem natywnego SOD, o tyle analogiczne zahamowanie rozkurczów przez inhibitor NOS (L-NAME) nastrocza poważniejszych problemów interpretacyjnych. Ponieważ zarówno katalaza, jak i L-NAME niemal całkowicie hamują rozkurcze naczyniowe, uprawnionym staje się podejrzenie, iż nadtlenek wodoru i NO działają równocześnie. Doświadczenia, w których preinkubacja naczyń z L-NAME zmniejsza rozkurcze na zewnątrzpochodny nadtlenek wodoru, pozwala przypuszczać, że powstająca w naczyniach znaczna część  $H_2O_2$  doprowadza do aktywacji syntazy tlenu azotu i następnego wzrostu biodostępności NO. Podobne obserwacje opisywane już były w piśmiennictwie. (178). I wreszcie, w naczyniach z usuniętym śródbłonkiem naczyniowym zaobserwowano zahamowanie odpowiedzi skurczowej u SHR i rozkurczowej u WKY, co potwierdza kluczową rolę śródbłonka w generowaniu anionu ponadtlenkowego.

#### VI.1.4. Wpływ wieku zwierząt na odpowiedzi naczyniowe w modelu samoistnego nadciśnienia tętniczego

Nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie podstawowej produkcji anionu ponadtlenkowego w naczyniach uzyskanych z różnych grup wiekowych. W doświadczeniach, w których aktywowano naczyniową oksydazę NAD(P)H,



znamienny wzrost (względem szczurów młodszych) produkcji  $O_2^-$  uzyskano dopiero u zwierząt rocznych. Podobną obserwację opisano w badaniach Hamilton i wsp. (112). Autorzy ci wykazali, że za mechanizm zjawiska odpowiada wzrost ekspresji podjednostki p22phox NAD(P)H oksydazy.

Co ciekawe, NAD(P)H-zależne rozkurcze naczyń, uzyskiwane w naszych doświadczeniach z młodymi szczurami WKY, nie występowały już u rocznych szczurów. W ten sposób, łącznie ze wzmiankowaną obserwacją o wzrastającej ilości  $O_2^-$  w naczyniach od rocznych szczurów, proponowana przez nas hipoteza o decydującej roli ilości anionu ponadtlenkowego w NAD(P)H-zależnej reakcji naczyniowej, wydaje się być dodatkowo uzasadniona.

## VI.2. Badania naczyń ludzkich

### VI.2.1. Produkcja podstawowa anionów ponadtlenkowych

W naszych doświadczeniach spontaniczna produkcja anionu ponadtlenkowego, mierzona za pomocą chemiluminescencji nie różniła się istotnie w żyłach odpiszczelowych, w porównaniu z tętnicami piersiowymi wewnętrznymi. Niewiele jest danych analizujących produkcję wolnych rodników w ludzkich naczyniach krwionośnych. Te, które są, przedstawiają wyniki niejednoznacznie. Niektórzy, jak Berry i wsp. stwierdzili większą produkcję  $O_2^-$  w tętnicach piersiowych, niż w żyłach odpiszczelowych (179). Jednak stosowanie przez tych autorów wysokich stężeń lucygeniny mogło prowadzić do sztucznego zawyżenia wartości produkcji  $O_2^-$  (180). W naszej pracy próbowaliśmy wyeliminować to zjawisko, używając mniejszych stężeń lucygeniny. W innych pracach (181) wykazano brak różnic w spontanicznym generowaniu anionu ponadtlenkowego w naczyniach żylnych i tętniczych, przy czym zwracano uwagę, iż ta równowaga produkcji  $O_2^-$  może być pozorna, bowiem wynika z faktu dynamicznej interakcji między NO i  $O_2^-$ , która maskuje właściwą ocenę zjawiska. To, że taka interakcja jest możliwa, oraz może wpływać na poziom mierzalnego anionu ponadtlenkowego, wykazały doświadczenia w modelach zwierzęcych. Dowiedziono w nich np. przy pomocy metody ERP, że usunięcie śródbłonna lub zahamowanie NOS zwiększa uwalnianie  $O_2^-$  (182).

Zaskakujące są dane wykazujące podwyższoną aktywność i ekspresję podjednostek oksydazy NAD(P)H właśnie w naczyniach żylnych (183). Tę pozorną

sprzeczność można wytłumaczyć biorąc pod uwagę, że są co najmniej dwie możliwe drogi powstawania anionu nadtlenkowego w IMA u człowieka. W przypadku tętnic piersiowych wewnętrznych dodatkowym źródłem  $O_2^-$ , poza oksydazą NAD(P)H, jest oksydaza ksantynowa. (183,184).

Wyniki naszych doświadczeń z inhibitorem syntazy tlenu azotu wydają się potwierdzać obserwacje dokonane wcześniej przez Guzika i wsp (283). Po preinkubacji z L-NAME, uzyskiwano znacznie większy wzrost uwalniania  $O_2^-$  w tętnicach, niż żyłach, co mogłoby świadczyć o większej produkcji NO w naczyniach tętniczych.

Poprzez zastosowanie dysmutazy nadtlenkowej (SOD) oraz jej wybiórczego inhibitora (DETC) potwierdziliśmy z jednej strony udział anionu nadtlenkowego w powstawaniu dysfunkcji śródbłonka, z drugiej zaś wykazaliśmy znamienne wpływy natywnego SOD na równowagę oksydoredukcyjną w naczyniach krwionośnych.

Usunięcie śródbłonka w naczyniach ludzkich nie powodowało istotnych różnic w produkcji anionu nadtlenkowego. Być może wynika to z faktu, że wraz ze śródbłonkiem podczas takiego zabiegu jednocześnie zostają usunięte śródbłonkowe enzymy odpowiedzialne zarówno za powstawanie  $O_2^-$  (oksydaza NAD(P)H, oksydaza ksantynowa), jak i enzymy odpowiedzialne za usuwanie  $O_2^-$  w naczyniach (syntaza NO, SOD). Jak wiadomo, powyższe enzymy są obecne w śródbłonku, przy czym aktywność poszczególnych z nich może się różnić w naczyniach uzyskanych od różnych pacjentów oraz może korelować u tych pacjentów ze stopniem dysfunkcji śródbłonka (236). Dotychczas publikowane badania są nie zawsze w pełni zbieżne z przedstawianymi w rozprawie. Na przykład te, opublikowane przez Berry i wsp. wykazywały, że obecność śródbłonka miała wpływ jedynie na produkcję  $O_2^-$  w naczyniach żylnych (179).

#### VI.2.2. Produkcja nadtlenków w warunkach aktywacji ( stresu oksydacyjnego)

Wywołanie stresu oksydacyjnego poprzez podanie NAD(P)H powodowało ogromny przyrost produkcji anionu nadtlenkowego, w porównaniu z kontrolą. W przypadku tętnic piersiowych wewnętrznych był to ok. 40-krotny wzrost, a w przypadku żył odpiszczelowych ok. 110-krotny. Aktywowana poprzez podanie NAD(P)H produkcja anionu nadtlenkowego była prawie 3-krotnie wyższa w żyłach odpiszczelowych niż w tętnicach piersiowych wewnętrznych. Są to dane zgodne z publikowanymi w literaturze i wydają się wynikać ze zwiększonej ekspresji i aktywności oksydazy NAD(P)H w naczyniach żylnych (183). Analizę pochodzenia

powstającego anionu ponadtlenkowego przy pomocy inhibitorów oksydaz prowadzono w odniesieniu do oksydazy NAD(P)H, oksydazy ksantynowej oraz syntazy NO. Wszystkie wydają się być odpowiedzialne za powstawanie tak dużych ilości  $O_2^-$ . Należy jednak wziąć pod uwagę, że dotychczas nie ma dostępnych inhibitorów oksydazy NAD(P)H, które całkowicie hamowałyby jej funkcję (najskuteczniejsza jest apocynina) (186), oraz, że zastosowane przez nas dawki ( $100\mu M$ ) mogą nie być optymalnymi do hamowania funkcji tego enzymu. Podobnej wielkości dawki stosowane już były w innych badaniach (187), a w naszej pracy zastosowaliśmy je, aby uniknąć błędów wynikających z działania naczyniorozszerzającego, występującego w wyższych dawkach apocyniny niezależnie od hamowania oksydazy.

Ponieważ usunięcie śródbłonna w naczyniach ludzkich nie powodowało znamienych różnic w NAD(P)H-zależnej produkcji anionu ponadtlenkowego, oksydaza NAD(P)H wydaje się pełnić główną rolę w generacji  $O_2^-$  w warunkach stresu oksydacyjnego. Z drugiej jednak strony, hamowanie produkcji  $O_2^-$  przez inhibitory syntazy tlenu azotu wskazuje, iż generacja ponadtlenków zależy też od NOS. Pozostaje to w zgodzie z wynikami prezentowanymi dotychczas w piśmiennictwie (185).

### VI.2.3. Badanie odpowiedzi naczynioruchowych naczyń ludzkich

W standardowym teście odpowiedzi naczyń na acetylocholinę wykazano znamienne większe odpowiedzi rozkurczowe tętnic w stosunku do żył. Są to obserwacje potwierdzone w piśmiennictwie i powszechnie tłumaczone zwiększoną ekspresją eNOS w naczyniach tętniczych. Zjawisko znacznego zróżnicowania stopnia NO-zależnych odpowiedzi śródbłonkowych na acetylocholinę w naczyniach ludzkich było już wielokrotnie opisywane i wydaje się odpowiadać stopniu zaawansowania dysfunkcji śródbłonna (188). Podstawą do takiego wniosku są wyniki badań na zwierzętach, w których wykazano, że stopień upośledzenia odpowiedzi na acetylocholinę może być wyznacznikiem stopnia dysfunkcji śródbłonna (189).

W tej części rozprawy, która dotyczyła badań na zwierzętach, udowodniliśmy, że aktywacja oksydazy NAD(P)H może być alternatywnym sposobem oceny funkcji śródbłonna w zmienionych patologicznie naczyniach. U ludzi niemal we wszystkich naczyniach aktywowanie oksydazy NAD(P)H (przy użyciu NADPH) prowadziło do skurczów naczyniowych. Tylko w przypadku ośmiu tętnic piersiowych wewnętrznych oraz trzech żył odpiszczelowych obserwowano NAD(P)H-zależne rozkurcze. Żyły

odpiszczelowe odpowiadały dwukrotnie silniejszym skurczem niż tętnice piersiowe wewnętrzne. Udowodniono, że stymulacja oksydazy NAD(P)H przy pomocy zewnątrzkomórkowego NADPH powoduje nadprodukcję anionu nadtlenkowego (doświadczenia z SOD i tironem), skutkującą spadkiem biodostępności NO.

Większość badaczy dostrzega przyczynę naczyniokurczącego działania  $O_2^-$  właśnie w zaburzeniu interakcji NO z  $O_2^-$  (112,185). Istnieją jednak prace wskazujące na możliwe, bezpośrednie działanie kurczące anionu nadtlenkowego na mięśniówkę gładką ściany naczyniowej (190). Jak wykazaliśmy w naszych doświadczeniach nie można wykluczyć, że część odpowiedzi naczynioskurczowych po aktywacji oksydaz NAD(P)H zachodzi również w taki sposób.

W badaniach roli oksydazy NAD(P)H w powstawaniu skurczów po podaniu NAD(P)H, wykonano doświadczenia z zahamowaniem jej aktywności przy użyciu swoistego inhibitora – apocyniny. W wyniku takiego postępowania uzyskano odwrócenie NAD(P)H-zależnych skurczów naczyń na rozkurcze, co potwierdza proponowany przez nas kluczowy udział oksydazy NAD(P)H w mechanizmie tej odpowiedzi. Autorom innej pracy udało się ustalić NO-zależny mechanizm rozkurczów naczyniowych występujących po zahamowaniu oksydazy NAD(P)H przy pomocy apocyniny (187).

Aby zweryfikować hipotezę o podstawowym znaczeniu zaburzonej interakcji między NO i  $O_2^-$  w regulacji NAD(P)H-zależnych skurczów naczyniowych, wykonano szereg doświadczeń z inhibitorem NOS. Jedynie w tętnicach piersiowych wewnętrznych po zahamowaniu NOS zaobserwowano zmniejszenie odpowiedzi skurczowej po podaniu NAD(P)H. Może to potwierdzać udział interakcji NO i  $O_2^-$  w wywoływaniu skurczu przez NAD(P)H. W żyłach odpiszczelowych nie udało się zaobserwować podobnego efektu.

Ze względu na wielokrotnie wcześniej obserwowaną w badaniach na zwierzętach możliwość wpływania na zmiany napięcia naczyniowego przez powstający nadtlenek wodoru, wykonano doświadczenia z katalazą – enzymem rozkładającym nadtlenek wodoru. Użycie katalazy doprowadziło nas do spostrzeżenia, że w tętnicach piersiowych wewnętrznych, ale z jakiegoś powodu nie w żyłach odpiszczelowych, nadtlenek wodoru odgrywać może ważną rolę w ograniczaniu skurczu naczyniowego, wywołanego podaniem NAD(P)H.

Wśród naczyń ludzkich znaleziono takie naczynia, w których, podobnie jak w naczyniach młodych szczurów WKY, po podaniu NAD(P)H występowały rozkurcze

naczyń. Niestety, naczyń tych było zbyt mało (n=8) i uniemożliwiło to dokonanie pełnej analizy zjawiska. Poprzez doświadczenia z zahamowaniem NOS udało się jedynie ustalić, że w tętnicach piersiowych wewnętrznych obserwowane rozkurcze zależą od tlenu azotu. Jest to obserwacja dotychczas nigdzie nie publikowana. Co więcej, występowanie NAD(P)H-zależnych rozkurczów naczyniowych obserwowano jedynie w tętnicach z dobrze zachowaną funkcją śródbłonna. NO-zależne odpowiedzi uzyskane z tych naczyń były znamienne wyższe w porównaniu do odpowiedzi uzyskanych z pozostałych naczyń. Istnieje oczywiście możliwość, że podobnie, jak w przypadku naczyń szurzych, w rozkurczach tych, obok NO, może uczestniczyć także nadtlenek wodoru.

W doświadczeniach z inhibitorem kinazy białkowej C - chelerytryną zaobserwowano zahamowanie NAD(P)H-zależnych reakcji naczyniowych. Potwierdza to, że kinaza białkowa C odgrywa ważną rolę w aktywacji oksydazy NAD(P)H. Jest to obserwacja zgodna z danymi w literaturze i tym bardziej godna uwagi, że użyteczność terapeutyczna tego inhibitora kinazy białkowej C jest obecnie w fazie badań klinicznych (191). Ponieważ zaś ostatnio często podkreśla się rolę oksydazy NAD(P)H w powstawaniu niekorzystnych zjawisk zachodzących w pomostach naczyniowych (192,193), warto podkreślić także wagę tej farmakologicznej manipulacji w ewentualnym zapobieganiu najczęstszym komplikacjom klinicznym pomostowania aortalno-wieńcowego. W przypadku żył jest to restenoza, a w przypadku tętnic nadmierna skłonność do skurczu (194).

### VI.3. Przeciwutleniacze w badaniach naczyń *in vitro*

Do najczęściej stosowanych antyoksydantów zalicza się: SOD i jego pochodne, witaminy C i E, tiron oraz N-acetylocysteinę. Spośród nich SOD oraz N-acetylocysteina zajmują miejsce szczególne. Pierwsza ze względu na liczne dowody jej korzystnego wpływu na śródbłonek naczyniowy. Druga, bo chociaż jest stosowana klinicznie w wysokich dawkach w sytuacjach nie związanych z chorobami naczyń (jak np.: zatrucie paracetamolem, w chorobach obturacyjnych dróg oddechowych - jako lek mukolityczny), nie znalazła jak dotąd zastosowania w chorobach krążenia. Tiron jest ostatnio krytykowany jako niezbyt wybiórczy „zmiatacz wolnych rodników” (186). Zaś wokół korzystnej, antyoksydacyjnej roli witamin C i E narosło już tyle kontrowersji (wyniki kilku dużych prób klinicznych kwestionują pozytywną rolę tych witamin w zapobieganiu

chorób sercowo-naczyniowych (195)), że ich należyta ocenę należy uznać za jeszcze nie zakończoną. Z tych powodów przebadano wpływ na naczynia ludzkie jedynie dysmutazy nadadtlenkowej i N-acetylocysteiny.

Zarówno w badaniach z SOD, jak i z NAC naczynia podzielono na te z bardziej oraz z nieznacznie nasiloną dysfunkcją śródbłonna. Kryterium podziału był rodzaj odpowiedzi na wzrastające dawki acetylocholin: w naczyniach z nasiloną dysfunkcją obserwowano po acetylocholinie skurcze, u pozostałych zanotowano rozkurcze. Uczyniono tak na podstawie danych wykazujących, że naczynia silnie dysfunkcyjne odpowiadają skurczem na acetylocholiny (196).

Dodać należy, że również wśród naczyń, które rozkurczają się na acetylocholiny, także może być obecna dysfunkcja śródbłonna. Stopień tej dysfunkcji, jak przekonuje wiele z publikowanych danych, odzwierciedlony jest wielkością rozkurczowej odpowiedzi na acetylocholiny (283). Dlatego nazywanie naczyń odpowiadających rozkurczem na acetylocholiny naczyniami bez dysfunkcji, co czynimy także w tej pracy, jest tylko uproszczeniem, ułatwiającym choćby opis rycin, ale nie zawsze jest w pełni prawdziwe.

W doświadczeniach z SOD zaobserwowano zwiększenie odpowiedzi rozkurczowych na acetylocholiny w naczyniach tętnicznych wcześniej preinkubowanych z dysmutazą nadadtlenkową. Wydaje się, że SOD, usuwając wolne rodniki, zwiększa biodostępność NO w naczyniach krwionośnych (197). Z lektury niewielu publikowanych do tej pory badań *in vitro* nie sposób jednoznacznie rozstrzygnąć, czy zastosowanie dysmutazy nadadtlenkowej może przywracać prawidłowe odpowiedzi naczyniowe. Istnieją dowody na to, że podanie SOD może korzystnie wpływać na normalizowanie zaburzonych odpowiedzi śródbłonkowych. Są to jednak głównie dane pochodzące z doświadczeń na zwierzętach (198,199,200). Badania doświadczalne na naczyniach ludzkich były jak dotąd nieliczne (188,201). Opublikowane przez nas wcześniej dane sugerują, że jest możliwa poprawa czynności śródbłonna po wcześniejszym inkubowaniu naczyń w roztworze SOD, ale obserwowana jest ona głównie w naczyniach z zaburzoną funkcją śródbłonna (183). Niektórym autorom po podaniu SOD nie udało się jednak zaobserwować poprawy funkcji śródbłonkowych w naczyniach tętnicznych (188). Badacze ci jednakże nie oceniali funkcji śródbłonna u chorych w zależności od stopnia zaawansowania upośledzenia odpowiedzi rozkurczowych na acetylocholiny i to być może zadecydowało o wynikach.

W naszych badaniach po rozdzieleniu naczyń na grupy z małą i dużą dysfunkcją śródbłonna okazało się, że tylko w grupie z nasiloną dysfunkcją naczyniową, po wcześniejszej inkubacji z dysmutazą nadtlenkową, dochodzi do poprawy odpowiedzi na acetylocholinę. Prawdopodobnie jest to związane z większą produkcją anionu nadtlenkowego w naczyniach (54,183). SOD w tym przypadku, w większym stopniu mógłby korzystnie wpływać na zmiany w biodostępności tlenu azotu.

N-acetylocysteina jest użyteczna eksperymentalnie ze względu na swoje działanie „wymiatające wolne rodniki” (53). W pierwszych naszych eksperymentach próbowano określić jej wpływ na spadek produkcji anionu nadtlenkowego zarówno w żyłach, jak i tętnicach. Znamienny spadek produkcji  $O_2^-$  zaobserwowano dopiero przy najwyższym stężeniu NAC (10mM). Po uwzględnieniu podziału naczyń na te z i bez dysfunkcji śródbłonna okazało się, że spadek produkcji  $O_2^-$  zachodził po użyciu mniejszych stężeń NAC u pacjentów z lepszą funkcją śródbłonna (w tętnicach były to stężenia 100 krotnie, a w żyłach 10 krotnie niższe). NAC, działając w naczyniach z niewielką dysfunkcją śródbłonna, a zatem z ograniczoną produkcją anionu nadtlenkowego, może łatwiej (tj. w mniejszych stężeniach) przejawiać swoje działanie.

Kiedy naczynia poddano preinkubacji z dysmutazą nadtlenkową, to za wyjątkiem żył pochodzących od pacjentów z zaawansowaną dysfunkcją śródbłonna, we wszystkich naczyniach zauważalne było obniżenie skuteczności NAC. Wydaje się prawdopodobne, że za obserwowanym spadkiem detekcji  $O_2^-$  po podaniu NAC, stoi zdolność usuwania wolnego anionu nadtlenkowego przez ten „zmiatacz”.

Ponieważ tlenek azotu jest kluczowym mediatorem w homeostazie śródbłonna, oceniono wpływ zahamowania syntazy tlenu azotu (NOS) na antyoksydacyjne działanie NAC. Zaobserwowano zmniejszenie działania NAC po zahamowaniu NOS, ale tylko w naczyniach tętnicznych. Jak już wcześniej wspomniano, tętnice charakteryzują się większą produkcją NO w stosunku do żył (201,202). Po uwzględnieniu podziału naczyń według stopnia upośledzenia funkcji śródbłonna wykazano, że zmniejszenie aktywności NAC zachodziło głównie w tętnicach z nieznacznie zaznaczoną dysfunkcją śródbłonna. Biorąc dodatkowo pod uwagę interakcję pomiędzy produkowanymi NO i  $O_2^-$ , wydaje się logiczne, że zahamowanie powstawania NO spowoduje względną nadprodukcję anionu nadtlenkowego, szczególnie w naczyniach produkujących duże ilości NO (naczynia bezdysfunkcyjne), a to zmniejszy działanie NAC.

W następnym etapie badań próbowaliśmy ocenić wpływ podania N-acetylocysteiny na zmiany napięcia ściany naczyniowej. Udowodniliśmy, że w zakresie niższych stężeń, NAC powoduje rozkurcze tętnic i żył tylko w naczyniach bezdysfunkcyjnych. Istnieje szereg prac wskazujących, że NAC potencjalizuje działanie nitratów (203,204,205). Tłumaczy się to zwiększoną w obecności NAC biodostępnością grup sulfhydrylowych, co z kolei zwiększa efekt pobudzenia cyklazy guanylowej (203). Być może w sytuacji dużej produkcji natywnego NO (naczynia bez dysfunkcji), dostarczenie grup sulfhydrylowych przez NAC skutkuje większym działaniem naczyniorozszerzającym tlenu azotu.

Dożylnie podanie NAC u ludzi nie powoduje obniżenia ciśnienia tętniczego (204). Być może wynikało to z podawania NAC pacjentom z niestabilną dławicą piersiową (naczynia z dużym nasileniem dysfunkcji śródbłonna). W świetle moich badań, u takich osób NAC nie powinna powodować zmian ciśnienia tętniczego. W eksperymentach z inhibitorem syntazy tlenu azotu zaobserwowano zmniejszenie NAC-zależnych rozkurczów naczyniowych jedynie w naczyniach tętniczych. Po uwzględnieniu podziału chorych według stopnia dysfunkcji śródbłonna, stwierdzono ograniczenie NAC-zależnych rozkurczów naczyniowych w naczyniach bezdysfunkcyjnych i to zarówno w tętnicach, jak i w żyłach. Może to przemawiać za hipotezą, w myśl której NAC mógłby wzmacniać działanie rozkurczające natywnego NO, bowiem działanie NAC obserwujemy jedynie w naczyniach z dużą produkcją wewnątrznaczyniowego tlenu azotu.

Po preinkubacji naczyń z dysmutazą ponadtlenkową uzyskano całkowite zahamowanie NAC-zależnych rozkurczów w tętnicach. W żyłach zahamowanie rozkurczów występowało przy niższych stężeniach N-acetylocysteiny. Podobnie jak w przypadku L-NAME i tu również największe zahamowanie rozkurczów po NAC występowało w przypadku naczyń bezdysfunkcyjnych. Po raz kolejny potwierdza to znaczenie interakcji  $O_2^-/NO$  dla zachowania prawidłowego napięcia naczyniowego, a w szczególności w naczyniach z odpowiednio dużą (prawidłową) produkcją tlenu azotu.

Próbowano określić także dawkozależność NAC w wywoływaniu rozkurczów naczyniowych przy różnym stopniu dysfunkcji śródbłonna. Stwierdzono, że w przypadku naczyń tętniczych korelacja występowała w zakresie stężeń: 100uM – 1 mM. W badaniach naczyń żylnych korelacja towarzyszyła również stężeniom niższym (10uM-1mM).



Istnieje szereg danych zarówno eksperymentalnych, jak i klinicznych obrazujących korzystny wpływ NAC na szereg zaburzeń naczyniowych. Jednoczesne podanie NAC i azotanów u pacjentów z niestabilną dławicą piersiową, powoduje znamienne zmniejszenie ryzyka zawału mięśnia sercowego (204). Być może zachodzi to dzięki stabilizowaniu przez NAC blaszek miażdżycowych, w wyniku zahamowania ekspresji makrofagowych metaloproteinaz (206,207). Takie wspólne podawanie obu terapeutyków wydaje się mieć jeszcze inne korzystne działanie, spowalnia mianowicie powstawanie tolerancji na donory NO u pacjentów stosujących je przewlekłe (208). U pacjentów z ostrym incydem wieńcowym podawanie NAC ze streptokinazą przyspieszało z kolei reperfuzję niedokrwionego mięśnia sercowego, a także działało protekcyjnie na czynność wyrzutową lewej komory (209). Dodatkowo wykazano, że niekorzystne skutki działania TNF- $\alpha$  na mięsień sercowy są skutecznie hamowane przez podanie N-acetylocysteiny (207,210). Korzystny efekt zastosowania NAC opisywano w chorobach na tle miażdżycowym, w tym w nadciśnieniu tętniczym (207), w cukrzycy (211,212) i hipercholesterolemii (206).

#### VI.4. Współzależności pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H a produkcją ponadtlenków i dysfunkcją śródbłonna

W tej rozprawie wykazaliśmy istotną korelację występowania dysfunkcji śródbłonna, produkcji anionu ponadtlenkowego oraz aktywności oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętniczych (IMA) i żylnych (HSV) pochodzących od tego samego pacjenta. Podobne zależności w odniesieniu do funkcji śródbłonna były już wielokrotnie opisywane (183,213,214). Nieco kontrowersji przyniosły obserwacje chorych z niewydolnością krążenia (215). U takich chorych nie stwierdzono korelacji pomiędzy dysfunkcją śródbłonna w łożysku naczyń tętniczych i żylnych, ale w tym przypadku metody oceny funkcji śródbłonna różniły się między sobą w naczyniach tętniczych i żylnych. W przypadku tętnic była to metoda oceny zmian naczyniowych wywołanych siłami tarcia (*shear stress*) przepływającej krwi, natomiast w przypadku żył była to pletyzmografia. W niniejszej pracy większość eksperymentów została wykonywana metodą *in vitro*, a zatem nie uwzględniała wpływu układu autonomicznego i czynników neurohumoralnych na funkcję śródbłonna. Wpływ tych czynników w modulowaniu funkcji naczyniowych różni się istotnie w łożysku tętniczym i żylnym, co dodatkowo komplikuje ocenę tego zjawiska.

Jak dotąd tylko w jednej pracy (183), analizującej współzależność aktywności oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętniczych i żylnych, uzyskano wyniki podobne do prezentowanych w tej rozprawie. Co ciekawe, istnieją dane wskazujące na istotne różnice w molekularnej budowie oksydazy NAD(P)H w naczyniach tętniczych i żylnych (216,217), ale pomimo tego podstawowe mechanizmy regulacyjne w funkcjonowaniu tego enzymu wydają się być w obu typach naczyń podobne.

W niektórych badaniach, na przykład Huraux i wsp., nie wykazano korelacji pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna naczyń tętniczych (wyrażanej za pomocą maksymalnych odpowiedzi na acetylocholinę), a produkcją anionu ponadtlenkowego (188). Warto jednak podkreślić stosunkowo małą grupę badanych w ten sposób pacjentów (n=30), a ponadto oba porównywane parametry mierzone były odmiennymi metodami. Z kolei w pracy Guzika i wsp.(181) wykazano co prawda znamienne korelację pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna, a aktywnością oksydazy NAD(P)H i produkcją anionu ponadtlenkowego, ale przedmiotem tego badania były jedynie naczynia żyłne.

Jest nie bez znaczenia, że w niniejszej rozprawie dla oznaczenia korelacji pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna, a aktywnością oksydazy NAD(P)H używano zawsze tego samego systemu pomiarowego, tzn. pomiaru zmiany napięcia naczyniowego w odpowiedzi na acetylocholinę – dla oceny dysfunkcji śródbłonna, a dla aktywności oksydazy NAD(P)H - w odpowiedzi na egzogenny NAD(P)H. Nie ma dotychczas publikacji, w której zastosowano by podobny sposób badania korelacji.

Dysfunkcję śródbłonna z poziomem produkcji anionu ponadtlenkowego i aktywnością oksydazy NAD(P)H wiąże wielokrotnie już opisywany mechanizm, polegający na reakcji anionu ponadtlenkowego z tlenkiem azotu (54,181,186). W wyniku tej reakcji dochodzi do spadku biodostępności tlenku azotu, a substancje mogące zmniejszać poziom NO predysponują naczynie do wystąpienia nadprodukcji  $O_2^-$  i wystąpienia dysfunkcji śródbłonna. Tak więc podstawowym czynnikiem obniżającym poziom uwalnianego tlenku azotu jest reagujący z nim anion ponadtlenkowy (218). Ponieważ oksydaza NAD(P)H jest podstawowym źródłem naczyniowego  $O_2^-$  (217, 219) logiczne wydaje się występowanie zależności pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonna, a poziomem aktywności tego enzymu.

Potencjalnym mechanizmem upośledzenia śródbłonna przez nadprodukcję anionu ponadtlenkowego jest utlenianie przez  $O_2^-$  wielu układów enzymatycznych (220), w tym również syntazy tlenku azotu (221). Z drugiej strony, także sam tlenek azotu może

hamować aktywność i/lub ekspresję oksydazy NAD(P)H (222,223). W ten sposób mało prawdopodobne wydaje się, aby spadek biodostępności NO i wzrost aktywności oksydazy NAD(P)H były zjawiskami od siebie niezależnymi.

#### VI.5. Czynniki ryzyka miażdżycy a funkcja śródbłonna i produkcja ponadtlenków

W tej pracy wykazaliśmy, że stopień obserwowanej dysfunkcji śródbłonna u poszczególnych chorych istotnie koreluje ze wszystkimi współwystępującymi podstawowymi czynnikami ryzyka miażdżycy tj. hypercholesterolemią, nadwagą, cukrzycą, nadciśnieniem oraz paleniem papierosów. Współwystępowanie powyższych czynników ryzyka istotnie pogarszało odpowiedzi śródbłonkowe zarówno w naczyniach tętniczych (IMA), jak i żylnych (HSV), przy czym w większym stopniu w IMA.

Jednakże, kiedy analizę korelacji odpowiedzi śródbłonkowych z każdym z czynników ryzyka przeprowadzano oddzielnie, nie udało się uzyskać korelacji zależności w przypadku nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy - czynników ryzyka, których niewątpliwym związkiem z miażdżycą wykazały choćby badania Framingham. Nie jest to jasne, ale trzeba wziąć pod uwagę, że w wielu dotychczas publikowanych pracach, pomimo wykazania wpływu poszczególnych czynników ryzyka na powstawanie dysfunkcji śródbłonna, to nie zawsze były to te same czynniki. I tak, dla naczyń tętniczych są to: hipercholesterolemia oraz nadciśnienie (224), hipercholesterolemia oraz palenie (225), czy też samo zaburzenie gospodarki tłuszczowej (226). W przypadku żył sytuacja wydaje się być równie skomplikowana. Bierze się tu pod uwagę zaburzenie gospodarki tłuszczowej, cukrzycę, palenie papierosów (227,228). Tak więc po zestawieniu danych uzyskanych z analizy tych prac, wynik nie jest bardzo jednoznaczny. Jeśli już można się pokusić o jakieś uogólnienie, to najczęściej podkreślany jest wpływ właśnie zaburzeń gospodarki lipidowej i palenia papierosów na stopień uszkodzenia śródbłonna. Co istotne, podobnie jak w tej rozprawie, w większości przypadków udało się zaobserwować korelację stopnia dysfunkcji śródbłonna z mnogością współwystępujących czynników ryzyka. Jedynym zatem pewnym wnioskiem jest ten, że w powstawaniu zaburzeń funkcji śródbłonna nie odgrywa roli jakiś poszczególny czynnik ryzyka, ale suma ich działania, najprawdopodobniej jeszcze z nie do końca oszacowanym wpływem podłoża genetycznego.

Oczywiście, że tak niejednoznaczna ocena wpływu poszczególnych czynników ryzyka miażdżycy na dysfunkcję śródbłonna może wynikać równie dobrze

z metodologicznych błędów. W przypadku nadciśnienia czy cukrzycy, włącza się w różnych badaniach niejednokrotnie do jednej grupy, pacjentów z dobrze i źle kontrolowanym schorzeniem. Również spożycie leków, potencjalnie śródbłonkowo-protekcyjnych (np. statyny, IKA), może powodować istotne różnice w wynikach. W naszej pracy zastosowanie takich leków sięgało 100%, a w przypadku badań wcześniejszych wynosiło ono znacznie mniej (np. Guzik i wsp. (183): statyny 81%, IKA 46%; Berry i wsp. (179): statyny 52%, IKA 22%). W przypadku palenia papierosów oparcie się wyłącznie na danych z wywiadu często nie pozwala na dokładną ocenę tego czynnika ze względu na brak chęci współpracy chorego. Wreszcie zarówno liczba pacjentów poddanych analizie, czas ich obserwacji, jak i sposoby detekcji dysfunkcji śródbłonka (metody *in vitro* i *in vivo* - każda obarczona własnym błędem) różniły się istotnie w poszczególnych badaniach. Pozwala to porównać wyniki poszczególnych badań tylko ze znacznym przybliżeniem.

W prezentowanej rozprawie analizowano również związek pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H, wyrażanej zmianą napięcia naczyń mięśni gładkich w odpowiedzi na NAD(P)H, a występowaniem czynników ryzyka miażdżycy. I także tutaj wykazano znamiennej korelację pomiędzy czynnikami ryzyka, tj. nadwagą, hipercholesterolemią, nadciśnieniem, paleniem tytoniu i cukrzyce, a stopniem aktywności oksydazy NAD(P)H. W porównaniu z naczyniami żylnymi, w naczyniach tętniczych ta korelacja była również znamiennej wyższa. Korelacja aktywności oksydazy NAD(P)H z występowaniem czynników ryzyka miażdżycy nie zdziwiła nas, ponieważ, jak wykazaliśmy, aktywność NAD(P)H oksydazy koreluje z kolei ze stopniem dysfunkcji śródbłonka. Przy analizie szczegółowej pojedynczych czynników ryzyka zdołaliśmy ustalić jedynie związek pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H, a nadwagą oraz hipercholesterolemią. Znane są jednak doniesienia o istnieniu podobnej zależności dla nadciśnienia (229) i cukrzycy (230,231).

Potwierdzeniem znamiennej zależności pomiędzy aktywnością oksydazy NAD(P)H, a ilością współwystępujących czynników ryzyka miażdżycy, są nasze chemiluminescencyjne pomiary uwalniania anionu nadadtlenkowego. W tych doświadczeniach wykazaliśmy istotną korelację pomiędzy uwalnianym  $O_2^-$  (aktywowanym przez egzogenne NAD(P)H), a współwystępowaniem czynników ryzyka.

## VI.6. Nadciśnienie tętnicze a stopień dysfunkcji śródbłonka – porównanie wyników w naczyniach szczurzych i ludzkich

Zarówno w przypadku naczyń szczurzych, jak i ludzkich nie udało się nam wykazać statystycznie znamiennej zależności pomiędzy występowaniem nadciśnienia tętniczego, a stopniem dysfunkcji śródbłonka, który oceniany był przy użyciu testu na acetylocholinę. Bardzo trudno jednak odnosić się nam do tych wyników z pełnym zaufaniem. Po pierwsze, w naszych badaniach ludzkie naczynia pochodziły od pacjentów po zabiegu, a więc przeważnie cierpiących na schorzenia obciążające śródbłonek. Po drugie, w piśmiennictwie istnieją także znaczne rozbieżności w wynikach prac analizujących stopień uszkodzenia śródbłonka u szczurów nadciśnieniowych SHR, a tylko część badaczy ludzkich naczyń krwionośnych nie wykazała różnic w odpowiedzi na acetylocholinę u pacjentów z nadciśnieniem i bez tego schorzenia (232). Przytłaczająca większość danych, wskazujących na występowanie dysfunkcji śródbłonka w ludzkim nadciśnieniu tętniczym, pochodzi jednak z badań „*in vivo*”, z użyciem metody FMD i pletyzmografii (126,148), a trzeba przyznać, że bezinwazyjne metody oceny funkcji śródbłonka bez trudności stwarzają możliwość analizy funkcji śródbłonka w nadciśnieniu w porównaniu z ludźmi zdrowymi. W badaniach „*in vivo*” możliwy jest też dobór pacjentów, umożliwiający ilościowo jednakowe próby grup z nadciśnieniem i bez nadciśnienia. To wszystko nie jest możliwe, gdy naczynia pobierane są do badań podczas zabiegu pomostowania i stąd wiele naszych wątpliwości.

Nasze badania nie wykazały również znamiennej zależności pomiędzy występowaniem NAD(P)H-zależnych rozkurczów naczyniowych i nadciśnieniem tętniczym. Stwierdziliśmy jednak, że odpowiedzi na NAD(P)H, typowe dla naczyń szczurów zdrowych (kontrola WKY), występują w ludzkich naczyniach o niewielkiej dysfunkcji śródbłonka. W ten, być może nieco zawiły sposób, można dojść do wniosku, że to, co dla śródbłonka naczyń szczurów zdrowych (WKY) oznacza brak nadciśnienia, dla naczyń ludzkich może oznaczać funkcjonalny śródbłonek. Spekulując dalej, wywołanie eksperymentalnego stresu oksydacyjnego w zdrowym śródbłonku doprowadza do ciągu przemian, w wyniku których powstaje rozszerzający naczynia nadtlenek wodoru i tlenek azotu. W dysfunkcyjnym śródbłonku warunki stresu oksydacyjnego mogą powodować powstawanie nadmiernych ilości naczyniokurczącego anionu ponadtlenkowego i wynikające z tego niekorzystne konsekwencje. Potwierdzeniem roli śródbłonka w zmniejszaniu konsekwencji stresu oksydacyjnego jest

zaobserwowana przez nas w naczyniach ludzkich silna korelacja pomiędzy stopniem dysfunkcji śródbłonka, a odpowiedzią kurczącą i produkcją anionu nadadtlenkowego po podaniu NAD(P)H.

Na zakończenie chciałbym dać wyraz kilku moim przemyśleniom związanym z użyciem w badaniach naczyń od pacjentów z nadciśnieniem i pochodzących od zwierząt z samoistnym nadciśnieniem tętniczym.

Po pierwsze, kontrolą dla pacjentów nadciśnieniowych powinni być chorzy różniący się od nich brakiem wyłącznie tylko tego jednego schorzenia. Jednakże takie zadanie jest całkowicie niewykonalne i jedynym wyjściem z tej sytuacji musi być porównywanie chorych z nadciśnieniem z pacjentami normotensyjnymi, odpowiednio dobranymi pod względem wieku, płci czy też pozostałych czynników ryzyka rozwoju patologii naczyniowych. Ile jest tych czynników nie wiadomo, nie mówiąc już o ogromnych różnicach genetycznych, których znaczenia możemy na razie jedynie się domyślać. Co więcej, z każdą chwilą przybywa doniesień o odkrywaniu nowych, niezależnych, czynników mogących powodować wystąpienie lub pogłębienie nadciśnienia. Należy pamiętać, że każdy z naszych dawców naczyń przeszedł ciężką operację serca, spowodowaną miażdżycą naczyń wieńcowych. Stąd efekt nadciśnienia nakłada się na wpływ innych czynników. Razem współdecydują one o funkcji naczyń, zatem nie do końca możliwa jest przejrzysta ocena wyników.

W modelu szczurzym wiele z tych zastrzeżeń traci swe znaczenie. Wiemy, że szczury są jednakowej płci i wieku. Co ważniejsze, poza niewątpliwą międzygrupową zmiennością materiału genetycznego (różnice genetyczne pomiędzy szczurami WKY i SHR) istnieje tylko stosunkowo niewielka zmienność międzyosobnicza w obrębie każdej z grup, co wynika ze wsobnego sposobu hodowli tych zwierząt. Wreszcie wszystkie mają takie same warunki bytowe, jak na przykład dostępność pokarmu, czy jednakowe środowisko. W rezultacie model szczurzego nadciśnienia tętniczego znakomicie nadaje się do oceny wpływu samego nadciśnienia na biologię naczyń, kontrole są wiarygodne, bardzo dobra jest powtarzalność wyników.

Inną ważną sprawą jest dobór naczyń do oceny funkcji śródbłonka. Ze względów praktycznych, w przypadku szczurów były to tętnice główne, a w przypadku ludzi, tętnice piersiowe wewnętrzne i żyły odpiszczelowe. Dotychczas u ludzi w celu badania funkcji naczyniowych metodami „*in vitro*” stosowane były, oprócz wymienionych, także

tętnice wieńcowe uzyskane od chorych przechodzących zabieg przeszczepu serca (233) oraz niewielkie tętnice obwodowe skóry (232). Ponieważ możliwość uzyskania naczyń wieńcowych jest bardzo mała, nie gwarantuje to przeprowadzenia odpowiedniej ilości doświadczeń. Uznano więc, że najlepiej odpowiadającymi celom tej pracy będą IMA i HSV. Wiadomo co prawda, że są to naczynia dotknięte procesem miażdżycowym tylko w niewielkim stopniu, stąd z resztą głównie ich użyteczność w pomostowaniu naczyń wieńcowych, ale jak wykazano w wielu już pracach, bardzo dobrze nadają się też do ogólnoustrojowej oceny stopnia rozwoju miażdżycy. Nie bez znaczenia było dla nas i to, że ich funkcje postanowiono porównywać ze szczurzymi tętnicami głównymi, które jako naczynia przewodzące także tylko w niewielkim stopniu objęte są zmianami miażdżycowymi.

Trzecią, niezwykle istotną sprawą jest, że w przypadku doświadczeń z naczyniami ludzkimi, na funkcje śródbłonna mogą wpływać leki zażywane przez pacjentów. Dla kilku z tych leków istnieją dowody na ich niewątpliwe działanie protekcyjne dla śródbłonna naczyniowego. Na przykład do takich leków zaliczane są statyny i inhibitory konwertazy angiotensyny, a w naszych badaniach były one stosowane przed i po zabiegu u wszystkich pacjentów. Nie sposób zatem u nich oddzielić naturalnej funkcji śródbłonna, od funkcji skorygowanej przez zażywanie leków. Co więcej, nie była dla nas dostępna informacja przez jak długi okres pacjenci zażywali leki, a więc w jakim stopniu prawidłowa funkcja śródbłonna mogła zostać już przywrócona w trakcie terapii .

Wreszcie pragnę zwrócić uwagę, że wnioski z badania naczyń „*in vitro*” winny być uogólniane bardzo ostrożnie, zważywszy, że takie naczynia są chociażby odnerwione, a także, że w większym lub mniejszym stopniu, zawsze są nieco uszkodzone podczas preparowania.

Ostatecznie ośmielam się jednak wyrazić pogląd, że pomimo szeregu niedoskonałości, podjęcie przeze mnie próby oceny wpływu nadciśnienia tętniczego na funkcję naczyń przy użyciu identycznych technik badawczych, jednocześnie u ludzi i u zwierząt, pozwoliło mi dostrzec zupełnie nowe obszary poznania.

## VII. WNIOSKI

- 1) Pomiar odpowiedzi naczynioruchowej oraz produkcji anionów nadadtlenkowych w izolowanych naczyniach krwionośnych podczas farmakologicznej stymulacji oksydazy NAD(P)H jest dobrym doświadczalnym sposobem wykrywania dysfunkcji śródbłoka naczyniowego w samoistnym nadciśnieniu tętniczym
  
- 2) Dysfunkcji śródbłoka naczyniowego towarzyszy zmniejszona aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu i jednocześnie wzmożona produkcja anionów nadadtlenkowych, których głównym źródłem jest naczyniowa oksydaza NAD(P)H. Obserwacje te dotyczą dysfunkcyjnych naczyń krwionośnych pochodzących zarówno od szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym, jak i od ludzi
  
- 3) W ludzkich naczyniach krwionośnych dysfunkcja śródbłoka koreluje z ilością współistniejących u chorych czynników ryzyka miażdżycy. Skuteczna okazała się doświadczalna próba przywrócenia prawidłowej funkcji śródbłoka w tętnicach ludzkich, polegająca na ograniczeniu efektywności oksydazy NAD(P)H przez dysmutazę nadadtlenkową (SOD)



## VIII. STRESZCZENIE

Zaburzenia wydzielniczej funkcji śródbłonna naczyniowego i stres oksydacyjny wydają się być odpowiedzialne za występowanie wielu schorzeń układu krążenia, w tym naczyniowych incydentów zakrzepowych. W niniejszej rozprawie podjęto próbę opracowania nowej metody oceny stopnia dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w warunkach doświadczalnego stresu oksydacyjnego, wywołanego farmakologiczną aktywacją naczyniowej oksydazy NAD(P)H.

Pierwszą część badań przeprowadzono na izolowanych aortach szczurów kontrolnych (WKY, n = 60) i szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym (SHR, n = 60). Następnie, metodę zdyskontowano, oceniając dysfunkcję naczyń ludzkich, uzyskanych od pacjentów po chirurgicznym zabiegu pomostowania tętnic wieńcowych. Badaniami objęto tętnice piersiowe wewnętrzne i żyły odpiszczelowe, uzyskane od 160 chorych, o różnej ilości czynników ryzyka miażdżycy i różnym stopniu możliwej dysfunkcji śródbłonna naczyń.

Stopień dysfunkcji śródbłonna oceniano poprzez porównanie naczynioruchowych odpowiedzi naczyń na NADPH i acetylocholinę, techniką łaźni narządowej (organ bath). Dla tych samych naczyń dokonywano pomiaru produkcji anionów nadadtlenkowych metodą chemiluminescencji zależnej od lucygeniny.

Wykazano, że u szczurów z genetycznie uwarunkowanym samoistnym nadciśnieniem tętniczym produkcja anionów nadadtlenkowych jest około 2,5-krotnie większa niż w kontroli, a głównym źródłem produkcji  $O_2^-$  jest oksydaza NAD(P)H.

Po raz pierwszy zaobserwowano całkowicie przeciwstawne odpowiedzi naczyń z dysfunkcją śródbłonna i naczyń kontrolnych na aktywację śródbłonkowej oksydazy NAD(P)H. Izolowane aorty od szczurów nadciśnieniowych były kurczone przez NADPH, natomiast u szczurów z prawidłowym ciśnieniem tętniczym egzogenne NADPH wywoływało rozkurcz. Wykazaliśmy, że za skurcze naczyń szczurów nadciśnieniowych po NADPH odpowiedzialna jest zaktywowana oksydaza NAD(P)H i produkowany przez nią anion nadadtlenkowy, natomiast w rozkurczach na NADPH (u szczurów z prawidłowym ciśnieniem krwi) przewagę osiąga tlenek azotu oraz, co ciekawe, nadtlenek wodoru. Interesujące jest też, że rozkurcz aorty szczura wywołany *per se* w niewielkich stężeniach nadttlenku wodoru ( $10^{-5}$  –  $10^{-3}$  M) jest zależny od tlenu

azotu. Jeśli przyjąć powszechnie akceptowany pogląd, że obserwowana odpowiedź naczyniowa na stres oksydacyjny jest wypadkową działania śródbłonkowych czynników naczyniorozszerzających, przede wszystkim NO, i wazokonstrykcyjnych, np. anionów nadtlenkowych, to indukcja skurczu aorty przez NADPH w prosty sposób potwierdza istnienie znacznej dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, polegającej na istotnym ograniczeniu wydolności śródbłonkowych czynników naczyniorozszerzających, a zwiększeniu naczyniokurczących. W naszej opinii opracowana metoda jest przydatna do doświadczalnego wykrywania dysfunkcji śródbłonka naczyniowego.

W drugiej części badań, które przeprowadzono na naczyniach ludzkich potwierdzono, że podobnie jak u zwierząt, produkcja anionów nadtlenkowych jest wynikiem głównie aktywacji oksydazy NAD(P)H, ale w odróżnieniu od szczurów, w produkcji nadtlenków w naczyniach ludzkich wykazano znaczący udział także oksydazy ksantynowej.

Ponadto, w naczyniach ludzkich stwierdzono znamiennej korelację pomiędzy dysfunkcją śródbłonka, a produkcją anionów nadtlenkowych (dla tętnic  $R=0.67$ ,  $p<0.001$ ; dla żył  $R=0.54$ ,  $p<0.001$ ) przez oksydazę NAD(P)H, a także, że tlenek azotu pośredniczy w rozkurczu naczyń wywołanym NADPH.

Wykazano istotne różnice pomiędzy ludzkimi naczyniami tętniczymi i żylnymi w NO-zależnej naczynioruchowej odpowiedzi na acetylocholinę. W odpowiedzi na acetylocholinę rozkurcze naczyń tętniczych były większe niż naczyń żylnych, przy jednocześnie zmniejszonej generacji anionów nadtlenkowych.

W ludzkich naczyniach krwionośnych stopień dysfunkcji śródbłonka istotnie koreluje z ilością czynników ryzyka miażdżycy (dla tętnic  $R=0.56$ ,  $p<0.0005$ ; dla żył  $R=0.49$ ,  $p<0.0005$ ) i jest podobny w tętnicach i żyłach ( $R=0.74$ ,  $p<0.0001$ ). Z niejasnych jednak przyczyn w naczyniach ludzkich, zarówno żylnych jak i tętniczych, nie znaleziono statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy dysfunkcją śródbłonka, a obecnością jako czynnika ryzyka nadciśnienia tętniczego.

Skuteczna okazała się doświadczalna próba przywrócenia prawidłowej funkcji śródbłonka w izolowanych tętnicach ludzkich, polegająca na ograniczeniu efektywności oksydazy NAD(P)H przez dysmutazę nadtlenkową (SOD).

Mamy nadzieję, że opracowana metoda oraz nasze obserwacje przyczynią się do poznania mechanizmów patogenezy dysfunkcji śródbłonka naczyniowego w chorobach krążenia.

## IX. SUMMARY

Disturbances of the secretory function of the vascular endothelium and oxidative stress seem to be responsible for occurrence of many diseases of the circulatory system, in this vascular thrombotic incidents. In the hereby elaboration an effort was undertaken to work out a new evaluation method of a degree of the endothelial dysfunction in conditions of the experimental oxidative stress caused by the pharmacological activation of vascular oxidase NAD(P)H.

The first part of research was carried out on isolated aortas of control rats (WKY, n = 60) and rats with idiopathic hypertension (SHR, n = 60). Then this method was discounted evaluating the dysfunction of human vessels, obtained from patients after the surgical procedure of coronary arteries bridging. Research included the internal thoracic arteries and saphenous veins, obtained from 160 patients, with various number of atheromatosis risk factors and various degree of the possible endothelial dysfunction.

The dysfunction degree of the endothelium was evaluated by comparison of vasomotor answers of vessels to NADPH and acetylcholine by a technique of the organ bath. There was performed for the same vessels measurement of superoxide anions production by the chemiluminescence method depending on lucigenine.

It was proved that at rats with genetically conditioned idiopathic hypertension production of superoxide anions is about 2.5 times higher than during control, and the main source of  $O_2^-$  production is oxidase NAD(P)H.

For the first time there were observed totally contrary answers of vessels with the endothelial dysfunction and control vessels during activation of the endothelium oxidase NAD(P)H. Isolated aortas from rats with hypertension were contracted by NADPH, whereas at rats with correct blood pressure the exogenous NADPH caused decontraction. We proved that activated oxidase NAD(P)H and superoxide anion produced by it, is responsible for vessels contractions of the rats with hypertension after NADPH, whereas in decontractions after NADPH (at rats with correct blood pressure) nitric oxide dominates and, what is interesting hydrogen peroxide. It is also interesting that decontraction of a rat's aorta caused *per se* in little concentration of hydrogen peroxide ( $10^{-5}$  -  $10^{-3}$  M) depends on nitric oxide. If one assumes a commonly accepted opinion that the observed vessels answer to oxidative stress is a resultant of the activity of endothelial

vasodilating factors, first of all NO and vasoconstrictive, e.g. superoxide anions, then induction of aorta's contraction by NADPH in a simple way certifies existence of an essential endothelial dysfunction consisting in significant efficiency limitation of endothelial vasodilating factors and enlargement of vasocontracting ones. In our opinion the elaborated method is useful for experimental detection of the vascular endothelial dysfunction.

In the second part of research, which were performed on human vessels, it was certified that similarly as in animals production of superoxide anions is mainly the result of oxidase NAD(P)H, but differently than at rats, in superoxides production in the human vessels a significant participation of xanthine oxidase was also proved.

Moreover, in human vessels a significant correlation was found between the endothelial dysfunction and production of superoxide anions (for arteries  $R=0.67$ ,  $p<0.001$ ; for veins  $R=0.54$ ,  $p<0.001$ ) by oxidase NAD(P)H and also that nitric oxide mediates in decontraction of vessels caused by NADPH.

Essential differences were proved between the human arteries and veins in the NO-dependent vasomotor answer on acetylocholine. In answer to acetylocholine decontractions of arteries were larger that of veins at simultaneous decreased production of the superoxide anions.

In the human arteries the endothelial dysfunction degree really correlates with a number of atheromatosis risk factors (for arteries  $R=0.56$ ,  $p<0.0005$ ; for veins  $R=0.49$ ,  $p<0.0005$ ) and is similar in arteries and veins ( $R=0.74$ ,  $p<0.0001$ ). However, because of obscure reasons there was not found any statistically essential correlation between the endothelial dysfunction and existence of hypertension as a risk factor both in human arteries and veins.

An effective proved to be an experimental effort to return a correct function of the endothelium in the isolated human arteries, consisting in limitation of oxidase effectiveness NAD(P)H by superoxide dismutase (SOD).

We hope that the elaborated method and our findings will be helpful to learn pathogenesis mechanisms of the vascular endothelial dysfunction in the circulation diseases.

## X. SPIS SKRÓTÓW

Ach – acetylocholina  
ADMA – asymetryczna dimetyl-arginina  
ANOVA – analiza wariancji  
ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny  
APO – apocynina  
AGII – angiotensyna II  
ATII – receptor dla angiotensyny II  
ATP – adozynotrójfosforan  
BH<sub>4</sub> – tetrahydrobiopteryna  
β-FGF – czynnik wzrostu fibroblastów beta  
CABG – pomostowanie aortalno-wieńcowe  
cAMP – cykliczny adozynomonofosforan  
cGMP – cykliczny guanozyno-5'-monofosforan  
Chele – chelerytryna – inhibitor PKC  
COX – cyklooksigenaza  
Cu/Zn SOD – dysmutaza ponadtlenkowa z Cu/Zn w centrum aktywnym  
CzR – czynniki ryzyka miażdżycy  
DETC – dietylokarbamid  
DOCA-salt - szczury z nadciśnieniem uwarunkowanym nadmiarem mineralokortykoidów  
e- - naczynia ze sztucznie usuniętym śródbłonkiem  
EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący  
EDRF – śródbłonkowy czynnik naczyniorozkurczający  
eNOS – śródbłonkowa syntaza NO  
ERP – spinowy rezonans paramagnetyczny  
ET - endotelina  
FMD – badanie rozkurczów t. ramiennej wywołanych przepływem krwi  
GM-CSF – makrofagowo-granulocytowy czynnik wzrostu  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – woda utleniona  
HMG-CoA – hydroksymetyloglutarylo koenzym A  
HSV – ludzka żyła odpiszczelowa długa  
IMA – ludzka tętnica piersiowa wewnętrzna  
ICAM - cząsteczka adhezyjna międzykomórkowa  
IFN γ - interferon γ  
IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostowy 1  
IKA – inhibitory konwertazy angiotensyny  
IL - interleukina  
iNOS – indukowalna syntaza NO  
LDL – lipoproteina o niskiej gęstości  
L-NAME – ester metylowy L-NG-nitroargininy  
Lucygenina – bis-N-metyloakrydyna  
M:K – liczba mężczyzn do liczby kobiet  
MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami  
MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów  
MMP - mieloperoksydazy  
NAC – N-acetylocysteina

NADPH – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego  
NFκβ – czynnik transkrypcyjny κβ  
nNOS – neuronalna syntaza NO  
NO – tlenek azotu  
NOS – syntaza tlenku azotu  
NOS I – vide nNOS  
NOS II – vide iNOS  
NOS III – vide eNOS  
NOX – oksydaza nefagocytarna  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - anion nadadtlenkowy  
ONOO<sup>-</sup> - nadtlenoazotyn  
Oxy – oxypurynol  
PAF - czynnik aktywujący płytki  
PAI-1 – inhibitor aktywatora płytkowego 1  
PDGF –płytkowy czynnik wzrostu  
PE – fenylefryna  
PEG-SOD – dysmutaza nadadtlenkowa sprzężona z glikolem polietylenowym  
PGH<sub>2</sub> – prostaglandyna H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub> – prostacyklina  
PKC – kinaza białkowa C  
PTCA – przezskórna angioplastyka naczyń wieńcowych  
R – współczynnik korelacji  
RLU – jednostki świetlne chemiluminescencji  
ROS – wolne rodniki tlenowe  
RR – ciśnienie tętnicze  
SD – odchylenie standardowe  
SEM – błąd standardowy średniej  
SHR – szczury z samoistnym nadciśnieniem tętniczym  
sm – sucha masa  
SOD – dysmutaza nadadtlenkowa  
TEA – tetraetylamonu  
TGFβ – transformujący czynnik wzrostowy beta  
Tiron – kwas 4,5-dihydro-1,3-benzeno disulfonowy  
TNFα – czynnik martwicy nowotworów alfa  
t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu  
TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>  
VCAM-1 – naczyniowa cząsteczka adhezyjna 1  
VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu  
WKY – szczury Wistar-Kyoto – szczury normotensyjne, stanowiące kontrolę dla SHR

## XI. Piśmiennictwo:

1. Verma S., Anderson T.J.: Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation* 2002, 105:546-549.
2. Cines D.B., Pollak E.S. i wsp.: Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998, 91, 3527-3561.
3. Bednarska-Chabowska D., Adamiec R. i wsp.: Wybrane aspekty czynności śródbłonna. Rola śródbłonna w utrzymaniu równowagi hematologicznej i krążeniowej. *Pol. Merk. Lek.* 2001, 70, 322-327.
4. Kirkpatrick C.J, Wagner M. i wsp.: Physiology and cell biology of the endothelium: a dynamic interface for cell communication. *Int. J. Microcirc.* 1997, 17, 231-240.
5. 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.
6. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
7. Förstermann U, Closs EI, i wsp.: Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension.* 1994;23:1121-1131.
8. Govers R., Rabelink T.J.: Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.* 2001, 280, F193-F206.
9. Stroes E., Hijmering M., Vanzandvoort M. i wsp.: Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1998, 438, 161-164.
10. Huk I., Nanobashvili J., Neumayer C. i wsp.: L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 1997, 96, 667-675.
11. Wever R.M.F., Vandam T., Vanrijn H.J.M. i wsp.: Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 237, 340-344.
12. Katusic Z.: Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *A J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281, H981-H986.
13. Wink D.A., Mitchell J.B.: Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1998, 25, 434-456.
14. Davis K.L., Martin E., Turko I.V. i wsp.: Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41, 203-236.
15. Gow A.J., Ischiropoulos H.: Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J. Cell. Physiol.* 2001, 187, 277-282.
16. Beckman J.S., Koppenol W.H.: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 1996, 40, C1424-C1437.
17. Michel T., Feron O.: Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J. Clin. Invest.* 1997, 9, 2146-2152.
18. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 1992;70:705-707.
19. Traub O., Berk B.C.: Laminar shear stress-mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18, 677-685.
20. Urbański N.K, Beręsewicz A.: Analityczne metody pomiaru ustrojowej produkcji tlenku azotu. *Kardiologia Polska* 48 (Suppl. II) 1998, II-57-II60.
21. Boger R.H., Bodeboger S.M., Szuba A. i wsp.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998, 98, 1842-1847.
22. Cooke J.P.: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, 2032-2037.
23. Fard A., Tuck C.H., Donis J.A. i wsp.: Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, 2039-2044.
24. Boger R.H., Sydow K., Borlak J., i wsp.: LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells- involvement of s-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res.* 2000, 87, 99-105.

25. Moncada S., Gryglewski R., Bunting S., Vane J.R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandins endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976, 263, 663-665.
26. Chlopicki S., Gryglewski R.J., Endothelial secretory function and atherothrombosis. *The Eicosanoids*, 2003, 23, 267-276.
27. Chendrasekharen NV., Dai H. i wsp.: Cox3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad USA* 2002, 99, 13926-13931.
28. Cosentino F., Barker J.E. i wsp.: Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 496-502.
29. Inokuchi K., Hirooka Y., i wsp.: Role of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Forearm Circulation. *Hypertension*. 2003 Nov;42(5):919-24.
30. Morikawa K., Shimokawa H., i wsp.: Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J. Clin. Invest.* 2003, 112: 1871-1879.
31. Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ.: Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Feb 4; 100(3): 1426-31.
32. Sinzinger H., Kaliman J., Silberbauer K., Oppolzer R.: Diminished prostacyclin formation in forearm venous tissue of patients with peripheral occlusive arteriopathy. *Exp. Pathol. (Jena)* 1980, 18,254-255.
33. Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K. i wsp.: Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, 104, 2673-2678.
34. Schumacher A., Seljeflot I., Sommervoll L., i wsp.: Increased levels of endothelial haemostatic markers in patients with coronary heart disease. *Thromb. Res.* 2002, 105, 25-31.
35. Lerman A., Holmes D.R. Bell M.R. i wsp.: Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995, 92, 2426-2431
36. Blake G.J., Ridker P.M.: Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ. Res.* 2001, 89, 763-771.
37. Ridker P.M.: High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001, 103, 1813-1818.
38. Fichtlscherer S., Rosenberger G., Walter D.H., i wsp.: Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000, 102, 1000-1006.
39. Kelm M.: Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002,282, H1-H5.
40. Drexler H., Hornig B., : Endothelial dysfunction in human disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999, 31, 51-60.
41. Quyyumi A.A.: Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am. J. Med.* 1998, 105, 32S-39S.
42. Schachinger V., Britten M.B., Zeither A.M.: Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000, 101, 1899-1906.
43. Stuart D. Katz, Katarzyna Hryniewicz, i wsp.: Vascular Endothelial Dysfunction and Mortality Risk in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation*, Jan 2005; 111: 310 - 314.
44. Stephan Fichtlscherer, Susanne Breuer, i wsp.: Prognostic Value of Systemic Endothelial Dysfunction in Patients With Acute Coronary Syndromes: Further Evidence for the Existence of the "Vulnerable" Patient. *Circulation*, Oct 2004; 110: 1926 - 1932.
45. Vita J.A., Loscalzo J.: Shouldering the risk factor burden: infection, atherosclerosis, and the vascular endothelium. *Circulation* 2002, 106, 164-166.
46. Prasad A., Ahu J., i wsp.: Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation* 2002, 106, 184-190.
47. Celermajer D.S., Sorensen K.E. i wsp.: Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interactions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994, 24, 1468-1474.
48. Maron D.J., Fazio S., Linton M.F.: Current perspectives on statins. *Circulation* 2000, 101, 207-213.
49. Takemoto M., Liao J.K.: Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 1712-1719.
50. Gryglewski R.J., Uracz W., Swies J. i wsp.: Comparison of endothelial pleiotropic actions of angiotensin converting enzyme inhibitors and statins. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 2001,947, 229-245.
51. Faggionato A., Paoletti R.: State-of-the-Art lecture. Statins and blockers of the rennin-angiotensin system: vascular protection beyond their primary mode of action. *Hypertension* 1999, 34, 987-996.
52. Pasierski T.: Znaczenie kliniczne modyfikacji czynności śródbłonna naczyniowego w świetle medycyny faktów. *Kardiol. Pol.*, 2002, 57, 29-35.



53. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN.1995.
54. Cai H., Harrison DG.: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000, 87, 840-844.
55. Groemping Y. i wsp.: Molecular basis of phosphorylation-induced activation of NAD(P)H oxidase. *Cell* 2003, 113, 343-355.
56. Touyz R.M. i wsp.: Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ. Res.* 2002, 90, 1205-1213.
57. Wassmann S. i wsp.: Cellular antioxydant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 300-305.
58. Pagano PJ. i wsp.: Localization of a constitutively active, phagocyte-like NAD(P)H oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 14483-14488.
59. Suh YA i wsp.: Cell transformation by superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 1999 Sep 2;401(6748):79-82.
60. Griendling K.K i wsp.: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 2000, 86, 494-501.
61. Griendling K.K i wsp.: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1994, 74, 1141-1148
62. Fukui T i wsp.: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hipertensive rats. *Circ. Res.* 1997, 80, 45-51.
63. Wingler K. i wsp.: Upregulation of the vascular NAD(P)H oxidase isoforms Nox 1 and Nox 4 by the rennin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 1456-1464.
64. Mollnau H. i wsp.: Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ. Res.* 2002, 90, E58-E65.
65. Touyz R.M., Schiffrin E.L.: Ang II stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999, 34, 976-982.
66. Seshiah P.N i wsp.: Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ. Res.* 2002, 91, 406-413.
67. Bouloumie A., Bauersachs J. i wsp.: Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide production. *Hypertension* 1997, 30, 934-941.
68. Kunsch C, Medford RM. i wsp.: Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.* 1999, 85, 753-766.
69. Spiecker M. Darius H. i wsp.: Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leuko Biol.* 1998, 63, 732-739.
70. Galis ZS i wsp.: Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induces in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerosis lesions. *Am N Y Acad Sci* 1995, 748, 501-507.
71. Guzik TJ., West NEJ. i wsp.: Functional effect of the C242T subunit on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000, 102, 1744-1747.
72. Schachinger V, Britten MB. i wsp.: NADH/NADPH oxidase p22phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur. Heart. J.* 2001, 22, 96-101.
73. 2003 European Society of Hypertension - European Society of Cardiology Guidelines for the management of arterial hypertension. *J. Hypertens.* 2003, 21, 1011-1053.
74. Nadciśnienie tętnicze. Red: A Januszewicz, W. Januszewicz, E. Szczepańska-Sadowska, M. Sznajderman. *Medycyna Praktyczna* 2000. ISBN 83-88092-32-4.
75. G. Herold: *Choroby wewnętrzne*. Warszawa. PZWL 2001.
76. Rizzoni D., Porteri E., Castellano M., i wsp.: Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension*, 1998, 31, 335-
77. Shepherd JT.: Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. *J Hypertens.* 1990, 8, S15-S27.
78. Rudic DR., Shesely EG. i wsp.: Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 731-736.
79. Mulvany M.J.: Vascular remodeling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc. Res.* 1999, 41, 9-13.
80. JH Laragh: Lewis K. Dahl Memorial Lecture. The renin system and four lines for hypertension research. Nephron heterogeneity, the calcium connection, the prorenin vasodilator limb, and plasma renin and heart attack. *Hypertension*, Sep 1992; 20: 267 - 279.
81. Lixin Li, James J. Galligan, i wsp.: Vasopressin Induces Vascular Superoxide Via Endothelin-1 in Mineralocorticoid Hypertension. *Hypertension*, Mar 2003; 41: 663 - 668.
82. Dahl LK., Heine M., Tassinari L.: Effects of chronic salt ingestion. Evidence that genetic factors play important role in susceptibility to experimental hypertension. *J. Exp. Med.* 1962, 115, 1173-1190.

83. Mark AL.: Sympathetic neural contribution to salt-induced hypertension in Dahl rats. *Hypertension*, 1991, 17, 186-190.
84. Zhenmin N, Fariba Oveisi, i wsp.: Nitric Oxide Synthase Isozyme Expression in Salt-Sensitive and Salt-Resistant Dahl Rats. *Hypertension*, Oct 1999; 34: 552 - 557.
85. Thomson MW, Merrill DC, Yang G.: Transgenic animals in the study of blood pressure regulation and hypertension. *Am. J. Physiol.* 1995, 269, E793-E803.
86. Yamori Y., Lovenberg W.: Spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1987, 9, I13-I14.
87. CM Wei, CH Kim, AA Khraibi, i wsp.: Atrial natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats and their vasorelaxing actions in vitro. *Hypertension*, Jun 1994; 23: 903 - 907.
88. Ulker S. McMaster D. i wsp.: Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc. Res.* 2003, 59, 488-500.
89. M.R. Tschudi, T.F. Lüscher: Age and Hypertension Differently Affect Coronary Contractions to Endothelin-1, Serotonin, and Angiotensins. *Circulation*, May 1995; 91: 2415 - 2422.
90. Chou TC., Yen MH. i wsp.: Alterations of NOS expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998, 31, 643-648.
91. Gil-Longo J., Fernandez GD. I wsp.: Study of in vivo and in vitro resting vasodilator NO tone in normotensive and genetically hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1996, 310, 175-183.
92. Radaelli A., Mircoli L. i wsp.: NO- dependent vasodilatation in young SHR. *Cardiovasc. Res.* 1998, 32, 735-739.
93. Soubrier F.: Search for the genes of human essential hypertension. *J. Hypertens.* 1993, 11, S20-S26.
94. Favaro R.: Saphenous vein autograph replacement of severe segmental coronary artery occlusion. *Ann. Thorac. Surg.* 1968, 5 334-339.
95. H. Werner GS, Wiegand V, Kreuzer H.: Effect of acetylcholine on arterial and venous grafts and coronary arteries in patients with coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 1990, 11, 127-137.
96. Shapira OM., Xu A. i wsp.: Enhanced nitric oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Circulation* 1999, 100, II322-II327
97. Perticone F., Ceravolo R. i wsp.: Prognostic Significance of Endothelial Dysfunction and Hypertensive Patients. *Circulation* 2001; 104: 191 - 196.
98. Christiane P. Tiefenbacher i wsp.: Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation*, 2000, 102, 2172-2179.
99. Guzik TJ., Sadowski J., i wsp.: Regulation of oxidative stress in human venous and arterial bypass conduits: Differential role of vascular oxidase and protein kinase C signaling. Artykuł jeszcze niepublikowany.
100. Szyguła-Jurkiewicz B., Wilczek K., Jarski P. i wsp.: Wpływ nadciśnienia tętniczego na wczesne i odległe wyniki pomostowania tętnic wieńcowych. *Folia Cardiol.* 2002, tom9, nr 6, 521-528.
101. Savage D.D., Garrison RJ., Kannel W.B. i wsp. The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample: The Framingham study. *Circulation*. 1987; 75, J26-J33.
102. Weintraub W.S., Clements S.D. i wsp.: Twenty-year survival after coronary artery surgery: an institutional perspective from Emory University. *Circulation*, 2003, 107, 1271-1277.
103. J. Stamou C.S., Hill P.C. i wsp.: Stroke after coronary artery bypass: incidence, predictors and clinical outcome. *Stroke*, 2001, 32, 1508-1513.
104. Pompilio G., Rossoni G. i wsp.: Comparison of endothelium-dependent vasoactivity of internal mammary arteries from hypertensive, hypercholesterolemic and diabetic patients. *Ann Thorac. Surg.* 2001, 72, 1290-1297.
105. Vallance P., Collier J., Moncada S.: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989, 2 997-1000.
106. Salom MG, Lahera V. i wsp.: Blockade of pressure natriuresis induced by inhibition of renal synthesis of nitric oxide in dogs. *Am J. Physiol.* 1992, 262, F718-F722.
107. Johnson FK, Durante W, Peyton KJ, Johnson RA., i wsp.: Heme oxygenase-mediated endothelial dysfunction in DOCA-salt, but not in spontaneously hypertensive rat arterioles. *Am J Hypertens.* 2004 ,17(1):25-30
108. Tschudi MR., Criscione L. I wsp.: Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in coronary arteries of spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 1994, 89, 2212-2218.
109. Zalba G., Beaumont F.J., i wsp.: Vascular NADH/NADPH Oxidase Is Involved in Enhanced Superoxide Production in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*, 2000, 35, 1055-1061.
110. Lin. K i wsp.: Prolonged reduction of high blood pressure, with human nitric oxide synthase delivery. *Hypertension*, 1997, 30, 307-313.

111. Mc Intyre M., Dominiczak A. i wsp.: Sex differences in the Abundance of Endothelial Nitric Oxide in a Model of Genetic Hypertension. *Hypertension* 1997, 30, 1517-1524.
112. Hamilton C., Brosnan M. i wsp.: Superoxide Excess in Hypertension and Aging. A common Cause of Endothelial Dysfunction. *Hypertension* 2001,
113. Wassman S., Larfs U.: Raloxifen Improves Endothelial Dysfunction in Hypertension by Reduced Oxidative Stress and Enhanced Nitric Oxide Production. *Circulation*. 2002 Apr 30;105(17):2083-91.
114. Iaccarino G., Cipolletta E. i wsp.:  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Gene Delivery to the Endothelium Corrects Impaired Adrenergic Vasorelaxation in Hypertension. *Circulation*, 2002; 106: 349 – 355
115. Januszewicz A., Szmigielski C., Łoń I.: Endokrynną rolą śródbłonna w patogenezie nadciśnienia nadciśnienia tętniczego. *Kardiologia Polska*, 1998, 48, 1172-1175.
116. Somers M.J, Mavromatis K., i wsp.: Vascular Superoxide Production and Vasomotor Function in Hypertension Induced by Deoxycorticosterone Acetate–Salt. *Circulation*, Apr 2000; 101: 1722 - 1728.
117. Beswick R.A, Dorrance A.M, i wsp.: NADH/NADPH Oxidase and Enhanced Superoxide Production in the Mineralocorticoid Hypertensive Rat. *Hypertension*, Nov 2001; 38: 1107 - 1111.
118. Hermann M., Camici G., Fratton A., i wsp.: Differential Effects of selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors on Endothelial Function in Salt-Induced Hypertension. *Circulation*, 2003, 108, 2308-
119. Calver A. i wsp.: Effect of local intra-arterial N-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilatator mechanism appears abnormal. *J. Hypertens.*, 1992, 10, 1025-1031.
120. Quyyumi A. i wsp.: Nitric oxide activity in the human coronary circulation. *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 1747-1755.
121. Taddei S. i wsp.: The role of endothelium in human hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 1998, 7, 203-209.
122. Ghiadoni L., Magagna A., Versari D., i wsp. Different Effect of Antihypertensive Drugs on Conduit Artery Endothelial Function. *Hypertension*,
123. Urbina EM., Brinton TJ i wsp.: Brachial artery distensibility and relaxation to cardiovascular risk factors in healthy young adults. *Am. J. Cardiol.* 2002, 89, 946-951.
124. Linder L. i wsp.: Indirect evidence for the release of endothelium-derived relaxing factor in the human forearm circulation in vivo: blunted response in essential hypertension. *Circulation*, 1990, 81, 1762-1767.
125. Panza J. i wsp.: Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323, 22-27.
126. Taddei S. i wsp.: Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*, 1993, 21, 929-933.
127. Creager M., Roddy M.: Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension*, 1994, 24, 499-505.
128. Panza J. i wsp.: Impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*, 1995, 91, 1732-1738.
129. Panza J. i wsp.: Impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension: evidence that the abnormality is not at the muscarinic receptor level. *J. Am. Coll. Cardiol.* , 1994, 23, 1610-1616.
130. Zeiher A i wsp.: Endothelium mediated coronary blood flow modulation in humans. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92, 652-662.
131. Rossi M. i wsp.: Cutaneous vasodilatation to acetylcholine in patients with essential hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* , 1997, 29, 406-411.
132. Rizzoni D. i wsp.: Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*, 1996, 28, 785-790.
133. Mimran A. Ribstein. J, DuCailar G.: Contrasting effect of antihypertensive treatment on renal response to L-arginine. *Hypertension*, 1995, 26, 937-941.
134. Node K. I wsp.: Reduced plasma concentration of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension*, 1997, 30, 405-408.
135. Blum A., Hathaway L., i wsp.: Oral L-Arginine in Patients With Coronary Artery Disease on Medical Management. *Circulation*. 2000;101:2160.
136. Taddei S, Virdis A, i wsp.: Endothelium dependent forearm vasodilation is reduced normotensive subjects with familial history of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 20: S193–S195.
137. Schlaich M.P., Parnell M.M., i wsp.: Impaired L-Arginine Transport and Endothelial Function in Hypertensive and Genetically Predisposed Normotensive Subjects. *Circulation*. 2004;110:3680-3686.
138. H. Werner GS, Wiegand V, Kreuzer H.: Effect of acetylcholine on arterial and venous grafts and coronary arteries in patients with coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 1990, 11, 127-137.

139. Schiffrin EL, Deng LY. Comparison of effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and  $\beta$ -blockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients. *Hypertension*. 1995; 25: 699–703.
140. Ghiadoni L, Taddei S, et al. Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1998 Jul;32(1):25-32.
141. Schiffrin E.L. Role of Endothelin-1 in Hypertension. *Hypertension*, Oct 1999; 34: 876 - 881.
142. JS Li, R Lariviere, EL Schiffrin: Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension*, Aug 1994; 24: 183 - 188.
143. Schiffrin EL.: Endothelin: role in hypertension. *Biol Res*. 1998;31(3):199-208.
144. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, et al.: Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*. 1995;346:732–736.
145. R Lariviere, G Thibault, EL Schiffrin: Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats *Hypertension*, Mar 1993; 21: 294 - 300.
146. Campia U., Cardillo C., Panza J.A.: Ethnic Differences in the Vasoconstrictor Activity of Endogenous Endothelin-1 in Hypertensive Patients. *Circulation*, Jun 2004; 109: 3191 - 3195.
147. Iwai N, Katsuya T, et al.: Human prostacyclin synthase gene and hypertension : the Suita Study. *Circulation*. 1999 Nov 30;100(22):2231-6.
148. Widlansky ME, Price DT, et al.: Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension*. 2003 Sep;42(3):310-5.
149. McCord JM.: the evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med*. 2000, 108, 652-659.
150. Somers MJ, Mavromatis K.: Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation*. 2000; 101: 1722–1728.
151. Rajagopalan S, Kurz S.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996; 97: 1916–1923.
152. Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001; 19: 741–748.
153. Heitzer T, Wenzel U. :Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int*. 1999; 55: 252–260.
154. Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 25: 1083–1089.
155. Kerr S, Brosnan MJ.: Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: the role of the endothelium. *Hypertension*. 1999; 33: 1353–1358.
156. Mehta JL, Lopez LM, Chen L, Cox OE. Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. *Am J Cardiol*. 1994; 74: 901–905.
157. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*. 1998; 16: 291–303.
158. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, et al.: Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002; 40: 511–515.
159. Griendling K.K, FitzGerald G.A.: Oxidative Stress and Cardiovascular Injury .Part II: Animal and Human Studies. *Circulation* 2003;108:2034.
160. Paniagua O.A., Bryant M.B., Panza J.A.: Transient Hypertension Directly Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation of the Human Microvasculature. *Hypertension*, Dec 2000; 36: 941 - 944.
161. Gyllenhammar H.: Effects of extracellular pH on neutrophil superoxide anion production, and chemiluminescence augmented with luminol, lucigenin or DMNH. *J Clin Lab Immunol*. 1989 Feb;28(2):97-102.
162. Li Y, Zhu H, Kuppasamy P, et al.: Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2015-23.
163. Li Y, Zhu H, Trush MA.: Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jun 28;1428(1):1-12.
164. Spasojevic I, Liochev SI, Fridovich I.: Lucigenin: redox potential in aqueous media and redox cycling with O<sub>2</sub>(-2) production. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Jan 15;373(2):447-50.
165. Morawietz H, Weber M et al.: Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3;285(5):1130-5

166. Graham DA, Rush JW.: Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol.* 2004 Jun;96(6):2088-96.
167. Ülker S., McKeown P.P. i wsp.: Vitamins Reverse Endothelial Dysfunction Through Regulation of eNOS and NAD(P)H Oxidase Activities. *Hypertension*, Mar 2003; 41: 534 - 539.
168. Adler S, Huang H: Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Nov;287(5):F907-13.
169. Wirth KJ, Linz W i wsp.: Differences in acetylcholine- and bradykinin-induced vasorelaxation of the mesenteric vascular bed in spontaneously hypertensive rats of different ages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996 Jun;354(1):38-43.
170. Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME. Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension.* 2001 Feb;37(2):313-21.
171. Rees D., Ben-Ishay D., Moncada S.: Nitric Oxide and the Regulation of Blood Pressure in the Hypertension-Prone and Hypertension-Resistant Sabra Rat. *Hypertension*, Sep 1996; 28: 367 - 371.
172. McIntyre M., Hamilton C.A., i wsp.: Sex Differences in the Abundance of Endothelial Nitric Oxide in a Model of Genetic Hypertension. *Hypertension*, Dec 1997; 30: 1517 – 1524.
173. W Auch-Schwelk, ZS Katusic, i wsp.: Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, Jun 1989; 13: 859 - 864.
174. Paravicini T.M., Chrissobolis S., i wsp.: Increased NADPH-Oxidase Activity and Nox4 Expression During Chronic Hypertension Is Associated With Enhanced Cerebral Vasodilatation to NADPH In Vivo. *Stroke*, Feb 2004; 35: 584 - 589.
175. Yada T., Shimokawa H., i wsp.: Hydrogen Peroxide, an Endogenous Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Plays an Important Role in Coronary Autoregulation In Vivo Circulation, Feb 2003; 107: 1040 - 1045.
176. Miura H., Bosnjak J.J. i wsp.: Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circ. Res.*, Feb 2003; 92: 31 - 40.
177. Cosentino F., Barker J.E. i wsp.: Reactive Oxygen Species Mediate Endothelium-Dependent Relaxations in Tetrahydrobiopterin-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Apr 2001; 21: 496 - 502.
178. Cai H., Davis M.E., i wsp.: Induction of Endothelial NO Synthase by Hydrogen Peroxide via a Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II/Janus Kinase 2-Dependent Pathway *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Oct 2001; 21: 1571 - 1576.
179. Berry C., Hamilton C.A., i wsp.: Investigation Into the Sources of Superoxide in Human Blood Vessels : Angiotensin II Increases Superoxide Production in Human Internal Mammary Arteries. *Circulation*, May 2000; 101: 2206 - 2212.
180. Tarpey M.M., White C.R., i wsp.: Chemiluminescent Detection of Oxidants in Vascular Tissue : Lucigenin But Not Coelenterazine Enhances Superoxide Formation. *Circ. Res.*, May 1999; 84: 1203 - 1211.
181. Guzik T.J., West N., i wsp.: Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-1094.
182. Skatchkov MP, Sperling D: Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 19;254(2):319-24.
183. Guzik T.J, Sadowski J., i wsp.: Systemic Regulation of Vascular NAD(P)H Oxidase Activity and Nox Isoform Expression in Human Arteries and Veins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Sep 2004; 24: 1614 - 1620.
184. Guzik T.J, Sadowski J i wsp.: Coronary Artery Superoxide Production and Nox Isoform Expression in Human Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Nov 2005, artykuł w trakcie publikacji.
185. Guzik T.J., Mussa S., i wsp.: Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in Human Diabetes Mellitus: Role of NAD(P)H Oxidase and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*, Apr 2002; 105: 1656 - 1662.
186. Cai H, Griendingl KK, Harrison DG.: The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Sep;24(9):471-8.
187. Hamilton C.A., Brosnan M.J., i wsp.: NAD(P)H Oxidase Inhibition Improves Endothelial Function in Rat and Human Blood Vessels. *Hypertension*, Nov 2002; 40: 755 - 762.
188. Huraux C., Makita T., i wsp.: Superoxide Production, Risk Factors, and Endothelium-Dependent Relaxations in Human Internal Mammary Arteries. *Circulation*, Jan 1999; 99: 53 - 59.

189. Jayakody L, Kappagoda T. i wsp.: Impairment of endothelium-dependent relaxation: an early marker for atherosclerosis in the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1988 Jun;94(2):335-46.
190. Katusic ZS.: Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):443-8.
191. Gutterman D.D.: Vascular Dysfunction in Hyperglycemia: Is Protein Kinase C the Culprit? *Circ. Res.*, Jan 2002; 90: 5 - 7.
192. West N.E.J., Guzik T.J., i wsp.: Enhanced Superoxide Production in Experimental Venous Bypass Graft Intimal Hyperplasia : Role of NAD(P)H Oxidase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Feb 2001; 21: 189 - 194.
193. Patterson C, Ruef J i wsp.: Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9;274(28):19814-22.
194. Bhan A, Gupta V, i wsp.: Radial artery in CABG: could the early results be comparable to internal mammary artery graft? *Ann Thorac Surg.* 1999 Jun;67(6):1631-6.
195. Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. :Nitric oxide in coronary artery disease: effects of antioxidants. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 Oct 11;;1-7
196. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986; 315: 1046–1051.
197. McIntyre M., Bohr D.F., Dominiczak A.F.: Endothelial Function in Hypertension : The Role of Superoxide Anion. *Hypertension*, Oct 1999; 34: 539 - 545.
198. M Galinanes, Y Qiu, A Ezrin, DJ Hearse: PEG-SOD and myocardial protection. Studies in the blood- and crystalloid-perfused rabbit and rat hearts. *Circulation*, Aug 1992; 86: 672 - 682.
199. Zanetti M, Sato J, i wsp.: Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Jun;280(6):H2516-23.
200. Laukkanen MO, Kivela A, i wsp.: Adenovirus-mediated extracellular superoxide dismutase gene therapy reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation.* 2002 Oct 8;106(15):1999-2003.
201. Hamilton CA, Berg G, McIntyre M, i wsp.: Effects of nitric oxide and superoxide on relaxation in human artery and vein. *Atherosclerosis.* 1997;133:77–86.
202. Oz M, Shapira , Xu A., i wsp.: Enhanced Nitric Oxide–Mediated Vascular Relaxation in Radial Artery Compared With Internal Mammary Artery or Saphenous Vein. *Circulation*, Nov 1999; 100: 322 - 327.
203. JD Horowitz, EM Antman, i wsp.: Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine. *Circulation*, Dec 1983; 68: 1247 - 1253.
204. JD Horowitz, CA Henry, i wsp.: Combined use of nitroglycerin and N-acetylcysteine in the management of unstable angina pectoris. *Circulation*, Apr 1988; 77: 787 - 794.
205. Mehra A, Shotan A, i wsp.: Potentiation of isosorbide dinitrate effects with N-acetylcysteine in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 1994 Jun;89(6):2595-600.
206. Galis Z.S., Asanuma K., i wsp.: N-Acetyl-Cysteine Decreases the Matrix-Degrading Capacity of Macrophage-Derived Foam Cells : New Target for Antioxidant Therapy? *Circulation*, Jun 1998; 97: 2445 - 2453.
207. Bourraindeloup M., Adamy C., i wsp.: N-Acetylcysteine Treatment Normalizes Serum Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Level and Hinders the Progression of Cardiac Injury in Hypertensive Rats. *Circulation*, Oct 2004; 110: 2003 - 2009.
208. S Boesgaard, J Aldershvile, HE Poulsen: Preventive administration of intravenous N-acetylcysteine and development of tolerance to isosorbide dinitrate in patients with angina pectoris. *Circulation*, Jan 1992; 85: 143 - 149.
209. Arstall M.A., Yang J., i wsp.: N-Acetylcysteine in Combination With Nitroglycerin and Streptokinase for the Treatment of Evolving Acute Myocardial Infarction : Safety and Biochemical Effects. *Circulation*, Nov 1995; 92: 2855 - 2862.
210. Cailleret M., Amadou A., i wsp.: N-Acetylcysteine Prevents the Deleterious Effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  on Calcium Transients and Contraction in Adult Rat Cardiomyocytes. *Circulation*, Jan 2004; 109: 406 - 411.
211. Li L., Sawamura T., Renier G.: Glucose Enhances Human Macrophage LOX-1 Expression: Role for LOX-1 in Glucose-Induced Macrophage Foam Cell Formation. *Circ. Res.*, Apr 2004; 94: 892 - 901.
212. Wong RK, Pettit AI, i wsp.: Advanced glycation end products stimulate an enhanced neutrophil respiratory burst mediated through the activation of cytosolic phospholipase A2 and generation of arachidonic Acid. *Circulation.* 2003 Oct 14;108(15):1858-64.
213. SW Werns, JA Walton, i wsp.: Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation*, Feb 1989; 79: 287 - 291.

214. Anderson TJ, Uehata A i wsp.: Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995 Nov 1;26(5):1235-41.
215. Nightingale AK, Blackman DJ i wsp.: Preservation of venous endothelial function in the forearm venous capacitance bed of patients with chronic heart failure despite arterial endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Mar 15;37(4):1062-8
216. Griendling KK: Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart.* 2004 May;90(5):491-3.
217. Griendling K.K, Sorescu D., Ushio-Fukai M.: NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ. Res.*, Mar 2000; 86: 494 - 501.
218. Gryglewski R.J., Palmer R.M., Moncada S.: i wsp: Superoxide anion is involved in the breakdown of peroxynitrite-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, 320, 454-456.
219. Luscher TF, Tanner FC.: Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens.* 1993 Jul;6(7 Pt 2):283S-293S.
220. Griendling K.K., FitzGerald G.A.: Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. *Circulation*, Oct 2003; 108: 1912 - 1916.
221. Landmesser U, Dikalov S, i wsp.: Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1201-9.
222. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB.: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):1116-21.
223. Fujii H, Ichimori K, i wsp.: Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J Biol Chem.* 1997 Dec 26;272(52):32773-8.
224. Seiler C, Hess OM, i wsp.: Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation.* 1993 Nov;88(5 Pt 1):2139-48.
225. Celermajer DS, Sorensen KE i wsp.: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.
226. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG i wsp.: Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation.* 1990; 81: 491-497.
227. Motwani JG, Topol EJ.: Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation.* 1998 Mar 10;97(9):916-31.
228. Guzik T.J., West N.E.J., i wsp.: Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase : Association With Endothelial Dysfunction and Clinical Risk Factors. *Circ. Res.*, May 2000; 86: 85 - 90.
229. Pagano PJ, Chanock SJ, i wsp.: Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension.* 1998 Aug;32(2):331-7.
230. Kashiwagi A, Shinozaki K, i wsp.: Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999 Sep;45(2-3):199-203.
231. Kojda G, Harrison D.: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999 Aug 15;43(3):562-71.
232. Angus JA, Jennings GL, Sudhir K.: Enhanced contraction to noradrenaline, serotonin and nerve stimulation but normal endothelium-derived relaxing factor response in skin small arteries in human primary hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1992;19:39-47.
233. Mangoush O, Nakamura K. i wsp.: Effect of ascorbic acid on endothelium-dependent vasodilatation of human arterial conduits for coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003 Oct; 24(4):541-6.

