



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
PRACOWNIA WSTĘPNYCH BADAŃ FARMAKOLOGICZNYCH
KATEDRY FARMAKODYNAMIKI



*Wpływ kwasu α -liponowego
na rozwój tolerancji na nitroglicerynę
w badaniach in vivo i in vitro*

Magdalena Dudek

Promotor:
Prof. dr hab. Barbara Filipek

Kraków 2008

*Dziękuję
Pani Profesor Barbarze Filipek
oraz
Pani Profesor Lidii Włodek
za życzliwość i uśmiech
za możliwość wykonania niniejszej pracy*

Spis treści

I. Wstęp	6
II. Cel pracy	17
III. Materiały	18
III.1. Zwierzęta doświadczalne	18
III.2. Użyte leki i związki	18
III.3. Dawkowanie leków i drogi podania	19
III.4. Grupy	19
III.5. Obliczenia statystyczne	20
III.6. Aparatura	20
IV. Wzory badanych leków	21
V. Metodyka	22
V.1. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi i pobranie narządów	22
V.2. Oznaczenie wpływu nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze krwi szczura	22
V.3. Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na ciśnienie tętnicze szczura po wielokrotnym podaniu	22
V.4. Indukcja tolerancji na nitroglicerynę <i>in vivo</i> u szczurów	22
V.5. Wpływ kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny	23
V.6. Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na hipotensyjny efekt nitrogliceryny po jednokrotnym i wielokrotnym podaniu	23
V.7. Oznaczenie poziomu peroksydacji lipidów (MDA) w tkankach i osoczu szczurów	23
V.8. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)	24
V.9. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej	24
V.10. Oznaczenie aktywności katalazy	24
V.11. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)	25
V.12. Oznaczenie poziomu grup tiolowych	25
V.13. Oznaczenie aktywności S-transferazy glutationowej	25
V.14. Oznaczenie aktywności γ -glutamylotranspeptydazy	26
V.15. Oznaczenie poziomu azotanów III i V	26

V.16	<i>Oznaczenie poziomu S-nitrozotoli</i>	27
V.17	<i>Oznaczenie poziomu siarki sulfanowej</i>	27
V.18	<i>Oznaczenie aktywności rodanazy</i>	27
VI.	Wyniki	29
VI.1.	<i>Wpływ nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze szczura po jednokrotnym jej podaniu</i>	29
VI.2.	<i>Wpływ nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze szczura po wielokrotnym jej podawaniu</i>	30
VI.3.	<i>Wpływ kwasu α-liponowego na ciśnienie tętnicze krwi u szczurów</i>	30
VI.4.	<i>Tolerancja na nitroglicerynę u szczurów w badaniach in vivo</i>	31
VI.5.	<i>Wpływ podawania kwasu α-liponowego na rozwój tolerancji na nitroglicerynę</i>	33
VI.6.	<i>Wpływ podawania kwasu α-liponowego na efekt hipotensyjny nitrogliceryny</i>	36
VI.7.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na procesy peroksydacyjne oraz enzymy antyoksydacyjne w aortach, osoczu i sercach szczurów</i>	38
VI.8.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na poziom tioli niebiałkowych, aktywność S-transferazy glutationowej oraz aktywność γ-glutamylotranspeptydazy w osoczu i sercach szczurów</i>	52
VI.9.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na poziom tlenku azotu (NO) w aortach, osoczu, sercach oraz poziom S-nitrozotoli w osoczu i sercach szczurów</i>	58
VI.10.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na procesy peroksydacyjne oraz enzymy antyoksydacyjne w wątrobach, nerkach i mózgach szczurów</i>	63
VI.11.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na poziom tioli niebiałkowych, aktywność S-transferazy glutationowej oraz aktywność γ-glutamylotranspeptydazy w wątrobach i nerkach szczurów</i>	77
VI.12.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na poziom tlenku azotu (NO) oraz S-nitrozotoli w wątrobach i nerkach szczurów</i>	83
VI.13.	<i>Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α-liponowego na poziom siarki sulfanowej oraz aktywność rodanazy w sercach, wątrobach, nerkach i mózgach szczurów</i>	87

VII.	Dyskusja	95
VIII.	Wnioski	104
IX.	Streszczenie	106
X.	Literatura	108

I. Wstęp

Nitrogliceryna jest jednym z najczęściej stosowanych leków w niedotlenieniu mięśnia sercowego [3, 26, 38, 40, 61, 85, 90, 116, 135], gdyż działa szybko i skutecznie w ostrych napadach dusznicy bolesnej. Od ponad wieku wykorzystuje się jej właściwości rozszerzające naczynia w takich chorobach układu sercowo-naczyniowego, jak choroba wieńcowa, zastoinowa niewydolność serca, czy zawał serca [1, 28, 40, 47, 81, 91, 135].

Rozluźnia ona mięśnie gładkie naczyń, głównie żylnych, co prowadzi do rozszerzenia żył trzewnych, brzusznych oraz w kończynach, wzrostu objętości krwi w tych regionach, a także do zmniejszenia ilości krwi powracającej do serca i płuc. Wiąże się to ze spadkiem ciśnienia żylnego oraz tętniczego krwi i zmniejszeniem wyrzutu z serca. Dochodzi do spadku wypełnienia serca i zmniejszenia obciążenia wstępnego, co przekłada się na zmniejszenie objętości wyrzutowej. Obciążenie wstępne i następne zmniejsza się w obu komorach, skutkuje spadkiem zużycia tlenu w mięśniu sercowym. Działa ona także bezpośrednio na naczynia wieńcowe, z największą siłą w najbardziej dystalnych naczyniach nasierdza. Wykazuje działanie przeciwpłytkowe i przeciwwzakrzepowe. Nitrogliceryna zmniejsza nadwrażliwość naczyń miażdżycowych na czynniki naczyniokurczące [2, 40].

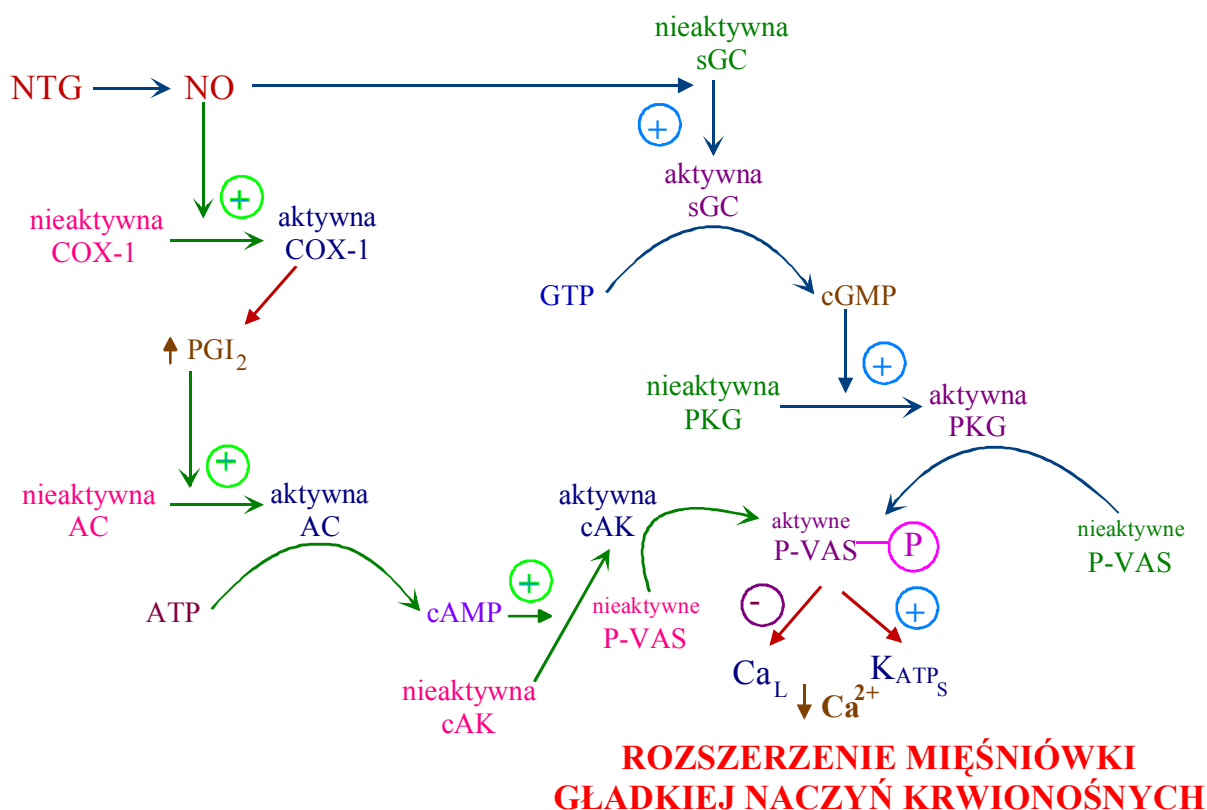
Nitrogliceryna reaguje z grupami –SH związków tiolowych w komórkach mięśni gładkich. Reakcje te ułatwiają powstawanie reaktywnych produktów pośrednich: tlenku azotu (NO) i S-nitrozotiole, które aktywują cyklazę guanylanową (CG), nasilają produkcję cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP). Prowadzi to do fosforylacji białek przez kinazę białkową I zależną od cGMP, które regulują poziomy wewnątrzkomórkowe wapnia i do spadku dostępności jonów wapnia w komórce oraz rozszerzenia naczyń [19, 47, 51, 61, 83, 115].

Sugeruje się także, iż nitrogliceryna i NO wywołują rozszerzenie naczyń przez aktywację cyklooksygenazy-1. Wykazano, że nitrogliceryna oraz NO silnie stymulują syntazę prostacykliny 2 (PGI₂), i że rozszerzenie naczyń indukowane nitrogliceryną w znaczącej części związane jest z uwalnianiem PGI₂ [47].

Nitrogliceryna wywołuje uwalnianie CGRP (peptyd związany z genem kalcytoniny) [20, 30, 39, 53, 72, 136], na drodze NO/cGMP [30, 94]. Ma on silne działanie naczyniorozszerzające i ochronne na miocyty oraz komórki śródbłonna. Uwalnianie tego peptydu jest zaburzone w stanie tolerancji na nitroglicerynę [14, 20, 72, 94, 136], co jest prawdopodobnie związane z zahamowaniem dehydrogenazy aldehydowej ALDH-2 i

spadkiem poziomu cGMP [20]. Sugeruje się, że uwalnianie CGRP przez nitroglicerynę jest związane z jej działaniem naczyniorozszerzającym, antyagregacyjnym i wywoływaniem bólu głowy [49].

S-nitrozotiole, powstające podczas metabolizmu nitrogliceryny jako produkty pośrednie, są także zdolne do aktywacji cyklazy guanylanowej i rozszerzania naczyń [40].



Rys. 1. Schemat działania nitrogliceryny.

NTG – nitrogliceryna, sGC – cyklaza guanylanowa, GTP – 5’trifosforan guanozyny, cGMP – cykliczny monofosforan guanozyny, PKG – kinaza białkowa G cGMP zależna, COX-1 – cyklooksygenaza 1, PGI₂ – prostacyklina 2, AC – cyklaza adenyłowa, cAMP – cykliczny monofosforan adenozy, cAK – kinaza białkowa cAMP zależna, P-VAS – białka stymulujące rozszerzanie naczyń, Ca_L – kanały wapniowe typu L, K_{ATPs} – kanały potasowe ATP-zależne.

Proces biotransformacji nitrogliceryny do NO nie jest do końca wyjaśniony [25, 81, 115]. W literaturze światowej podaje się coraz większą liczbę potencjalnych enzymów

mogących brać udział w tym procesie, włączając: niescharakteryzowany system naczyniowych enzymów mikrosomalnych [23, 25], enzymy podobne do cytochromu P-450 [19, 25, 28, 47, 82, 86, 87, 91, 115], S-transferazę glutationową [19, 25, 28, 47, 63, 115], oksydoreduktazę ksantynową [19, 28, 47, 115,]. Ostatnie wyniki badań sugerują, że uwalnianie NO z organicznych azotanów odbywa się przy udziale mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH-2) [6, 18, 19, 34, 47, 54, 62, 88, 89, 90, 91, 101, 115, 118, 127].

W chwili obecnej jest sprawą bezsporną, że związki tiolowe wspomagają uwalnianie NO z nitrogliceryny [11]. Do bioaktywacji przez nitroglicerynę cyklazy guanylanowej bezwzględnie konieczna jest obecność tioli [112]. W czasie inkubacji związków tiolowych z nitrogliceryną dochodzi do spontanicznego, nieenzymatycznego uwalniania tlenu azotu. Tiole jako antyoksydanty przeciwdziałają utlenieniu cyklazy guanylanowej, zachowując jej funkcję oraz chronią NO przed inaktywacją do ONOO⁻ przez reaktywne formy tlenu [11].

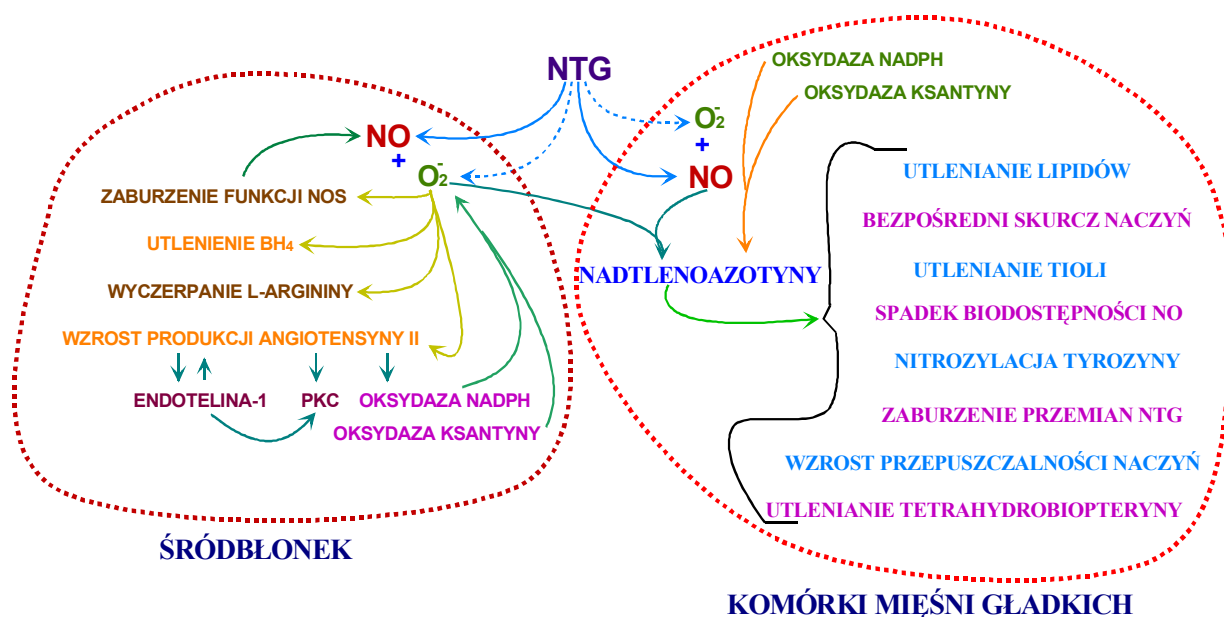
Zjawisko tolerancji na nitroglicerynę

Przewlekłe i zbyt częste stosowanie nitrogliceryny prowadzi do rozwoju tolerancji [1, 3, 25, 27, 35, 39, 42, 43, 83, 115, 116, 118, 127, 135], objawiającej się spadkiem siły działania klinicznego i hemodynamicznego leku [25, 47]. Z farmakologicznego punktu widzenia tolerancja może być określona jako zaburzenie działania po wielokrotnym lub ciągłym podawaniu leku [35].

Tolerancja na nitroglicerynę może wynikać ze zmniejszenia zdolności mięśni gładkich naczyń krwionośnych do przekształcania nitrogliceryny i uwalniania NO, co zwane jest rzeczywistą tolerancją naczyniową oraz z aktywacji mechanizmów pozanaczyniowych, tj. pseudotolerancji. Nitrogliceryna może także znosić wrażliwość naczyń na inne donory tlenu azotu, czym wywołuje tzw. tolerancję krzyżową [27, 90, 115]. Nasilenie tolerancji jest funkcją dawki i częstotliwości stosowania.

Mechanizm powstawania tolerancji na nitroglicerynę nie jest do końca wyjaśniony [38, 61, 90], dlatego rozważa się różne możliwe jej przyczyny [3, 35, 61, 83, 90, 92, 101, 118, 127,]. Prowadzone przez lata badania wskazują, że tolerancja na nitroglicerynę jest związana z: 1) zaburzeniem biotransformacji nitrogliceryny [34, 115], 2) „wyczerpaniem” grup tiolowych, a przez to ze zmniejszeniem przemian metabolicznych nitrogliceryny [2, 11, 25, 135], 3) rozszerzeniem objętości osocza [2, 25, 33, 102], 4) aktywacją mechanizmów wyrównujących spadek ciśnienia, czyli czynników naczyniokurczących, jak angiotensyna, katecholaminy i endotelina [25, 33, 103], 5) zaburzeniami w przekazywaniu sygnału w

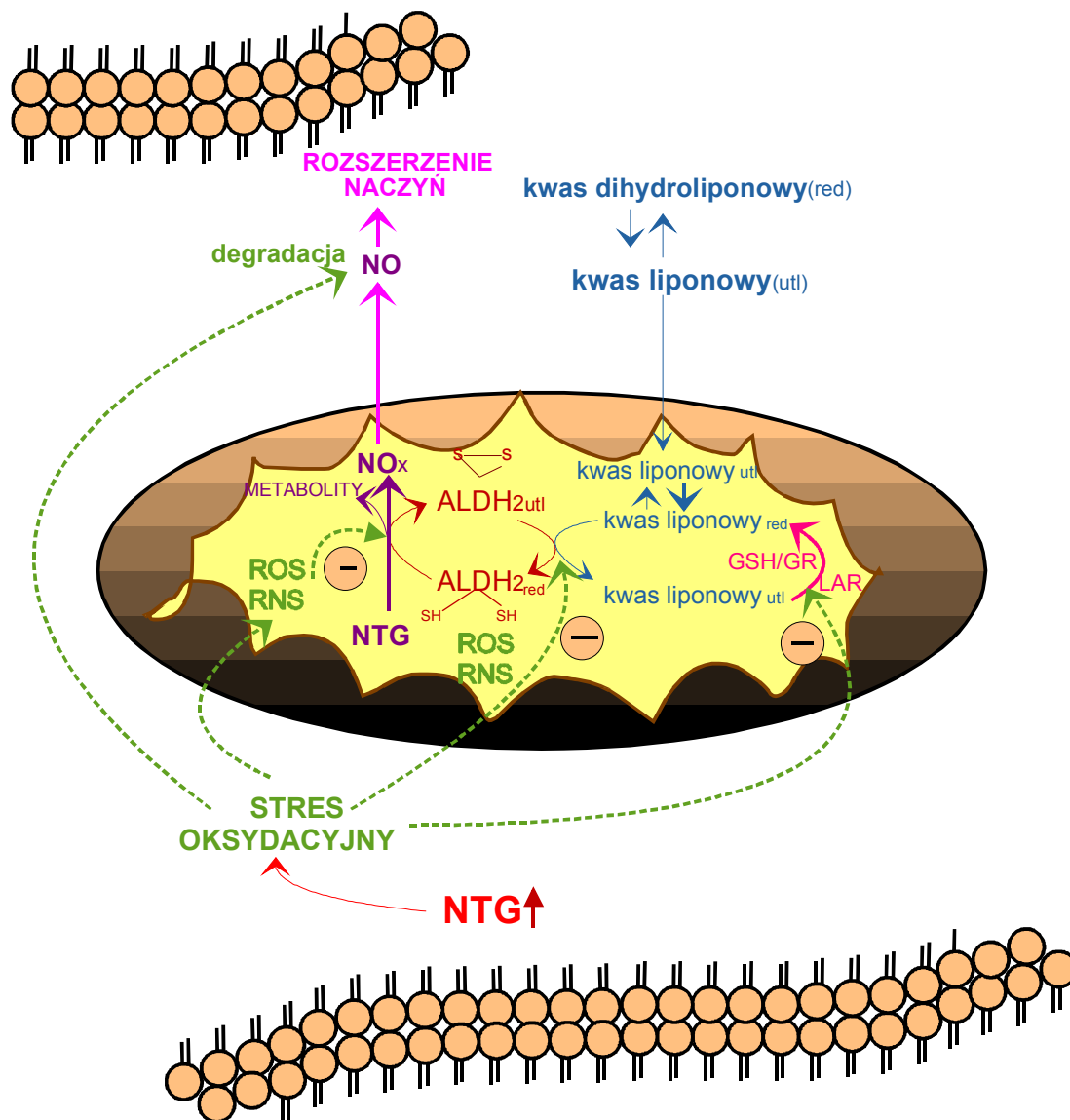
procesie kurczenia mięśni na poziomie cyklicznego monofosforanu guanozyny cGMP [25], 6) wzrostem aktywności fosfodiesterazy 1A1 [2, 42, 115], 7) spadkiem aktywności kinazy guanylanowej zależnej od cGMP [2, 47], 8) spadkiem biodostępności tlenu azotu [25, 47]. Jednakże, obecnie za najbardziej prawdopodobną teorię rozwoju tolerancji na nitroglicerynę, uznawana jest teoria związana ze stresem oksydacyjnym [28, 43, 47, 48, 59, 88, 101, 90, 92, 115, 116, 127].



Rys. 2. Proponowane drogi prowadzące do tolerancji na nitroglicerynę w teorii związanej ze stresem oksydacyjnym [101 - modyfikacja rysunku].

Doświadczenia z udziałem zarówno zwierząt jak i ludzi dowodzą, że w stanie tolerancji na nitroglicerynę wzrasta dostępność anionorodnika nadtlenowego ($\bullet\text{O}_2^-$) [1, 42, 83, 91, 92, 116]. Jako potencjalne przyczyny tego wzrostu sugeruje się indukcję naczyniowych oksydaz NADPH [47, 91, 116] i syntazy NO [91, 116]. Powstawanie NO z nitrogliceryny jest związane z tworzeniem się małych ilości wolnych rodników tlenowych, a przewlekłe podawanie nitrogliceryny prowadzi do wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu i załamania mechanizmów obronnych organizmu [42, 118]. Do tolerancji dochodzi zatem w skutek zaburzenia procesu uwalniania NO z nitrogliceryny, przy podniesionym stężeniu reaktywnych form tlenu i zahamowania aktywności enzymów biorących udział w biotransformacji nitrogliceryny, jak np.: dehydrogenazy aldehydowej (ALDH-2) [18, 34, 48, 88, 89, 90, 101, 115, 118, 127, 128]. Do prawidłowego działania tego enzymu niezbędna jest obecność zredukowanych tioli, np.: kwasu liponowego [6, 47, 88, 127, 128]. Grupy tiolowe w centrum

aktywnym ALDH-2 są utleniane w czasie biotransformacji nitrogliceryny do NO, a aktywność tego enzymu jest odzyskiwana przez redukcję wiązania disiarczkowego S-S przez kwas dihydroliponowy [88, 127]. W stanie tolerancji, wzrost stężenia nitrogliceryny wywołuje stan stresu oksydacyjnego, co prowadzi do inaktywacji ALDH-2 bezpośrednio oraz pośrednio przez spadek stężenia kwasu dihydroliponowego oraz zmniejszenie możliwości redukcji tego kwasu [88].



Rys. 3. Udział ALDH-2 w zjawisku tolerancji na nitroglicerynę [na podstawie 88]

Nitrogliceryna ulega bioaktywacji przy udziale ALDH₂ (dehydrogenazy aldehydowej). Enzym ten wymaga dwóch grup tiolowych, które są utleniane, podczas przemiany NTG do NO, NO₂⁻ oraz innych metabolitów. Aktywność enzymu jest odzyskiwana przez redukcję wiązania S-S przy udziale zredukowanego kwasu liponowego (dihydroliponowego). Kwas liponowy jest ponownie redukowany przy udziale reduktazy liponianu (LAR) oraz układu glutation (GSH)/ reduktaza glutationu (GR).

Sugeruje się szczególną rolę śródbłonka naczyń w pojawianiu się tolerancji [27, 90, 101, 116]. Przewlekłe stosowanie nitrogliceryny powoduje dysfunkcję endotelium [47, 48, 90, 115, 125], co przyczynia się do poważnych zaburzeń klinicznych. Istnieje hipoteza, iż endotelium może albo uwalniać przewlekłe czynniki naczyniokurczące lub też NO zostaje inaktywowany zanim może stymulować cyklazę guanylanową w mięśniówce naczyń. Usunięcie endotelium zapobiega powstawaniu nadtlenczków w naczyniach z tolerancją [90]. Podawanie tetrahydrobiopteryny (BH_4) odwraca dysfunkcję endotelium wywołaną podaniem nitrogliceryny, co wskazuje, iż dysfunkcja ta może być następstwem wewnątrzkomórkowego wyczerpania BH_4 [44, 125]. Także kwas foliowy, substrat dla BH_4 , zapobiega dysfunkcji endotelium, a jego podawanie również zapobiega powstawaniu tolerancji na nitroglicerynę [41].

Stres oksydacyjny wywołany nitrogliceryną stymuluje produkcję endoteliny-1 w śródbłonku i komórkach mięśni gładkich, co prowadzi do łatwiejszej aktywacji kinazy białkowej C (PKC) [27, 90, 125]. PKC może aktywować oksydazy NADPH w naczyniach, prowadząc do wzrostu powstawania nadtlenczków [90].

Przewlekłemu stosowaniu nitrogliceryny towarzyszy także zwiększona aktywność fosfodiesterazy IA1. Powoduje to spadek dostępności cGMP, gdyż ulega on szybszemu katabolizmowi. Enzym ten jest zależny od jonów wapnia i czynniki zwiększające poziom Ca^{2+} w cytoplazmie (np. angiotensyna II) indukują go [42, 43]. Obniżony poziom cGMP ogranicza aktywność kinazy zależnej od cGMP, co wiąże się z zahamowaniem powstawania fosfobiałek stymulujących rozszerzanie naczyń (P-VAS) [42, 43, 48].

Spadek biodostępności NO może być także spowodowany degradacją NO przez reaktywne formy tlenu w naczyniach [25, 47, 90, 118]. Dodatkowo $\cdot O_2^-$ wiąże NO i powstaje bardzo reaktywny i niebezpieczny ONOO⁻ (anion nadtlenoazotynowy) [27, 47, 85, 89, 90, 91, 118, 137], który między innymi hamuje śródbłonkową syntazę prostacykliny - enzymu niezbędnego do produkcji naczyniorozszerzającej prostacykliny (PGI_2) [27, 47, 90, 91, 137], co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia powstawania PGI_2 i nasilenia powstawania prostaglandyny H_2 (PGH_2) [27, 90, 137] oraz wzrostu napięcia naczyń [27, 90]. Anion nadtlenoazotynowy jest silnym oksydantem grup tiolowych i powoduje nitrowanie związków aromatycznych, jak tyrozyna, tryptofan czy guanina. Nitracja tyrozyny może prowadzić do zahamowania enzymów, takich jak np. dysmutaza ponadtlenkowa, a utlenianie krytycznych grup tiolowych jest przyczyną zahamowania enzymów mitochondrialnych, włączając dehydrogenazę aldehydową [137].

Nadtlenoazotyny zaburzają funkcję syntazy tlenku azotu (eNOSIII) poprzez utlenienie jej kofaktora - BH_4 do dihydrobiopteryny (BH_2) [27, 42, 43, 48]. W wyniku dysfunkcji eNOSIII następuje przenoszenie elektronów na tlen cząsteczkowy, ale późniejsza reakcja z L-argininą nie jest możliwa i w konsekwencji dochodzi do peroksydacji – eNOSIII uwalnia $\cdot\text{O}_2^-$ oraz inne reaktywne formy tlenu [27, 90]. $\cdot\text{O}_2^-$ oraz nadtlenoazotyny bezpośrednio hamują także ALDH-2 [115].

Zarówno $\cdot\text{O}_2^-$ jak i nadtlenoazotyny są silnymi, bezpośrednimi inhibitorami cykazy guanylanowej, zmniejszając zarówno jej podstawową, jak i stymulowaną tlenkiem azotu aktywność [27, 90].

Wykazanie wzrostu produkcji wolnych rodników w tolerancji na nitroglicerynę sugeruje możliwość zapobiegania rozwojowi tolerancji poprzez podawanie antyoksydantów [27, 38, 90, 101, 125]. Zostało to zbadane dla kilku antyoksydantów [7, 38, 86, 90, 99]. Dlatego nasuwa się pytanie: Czy związki zmniejszające stres oksydacyjny, takie jak: inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, blokery receptorów AT_1 , statyny, L-arginina, BH_4 , askorbinian, ebselen, kwas moczowy, które mogą odzyskiwać aktywność NTG, mogą też redukować przyczyny powstawania tolerancji?

Dehydrogenaza aldehydowa (ALDH-2)

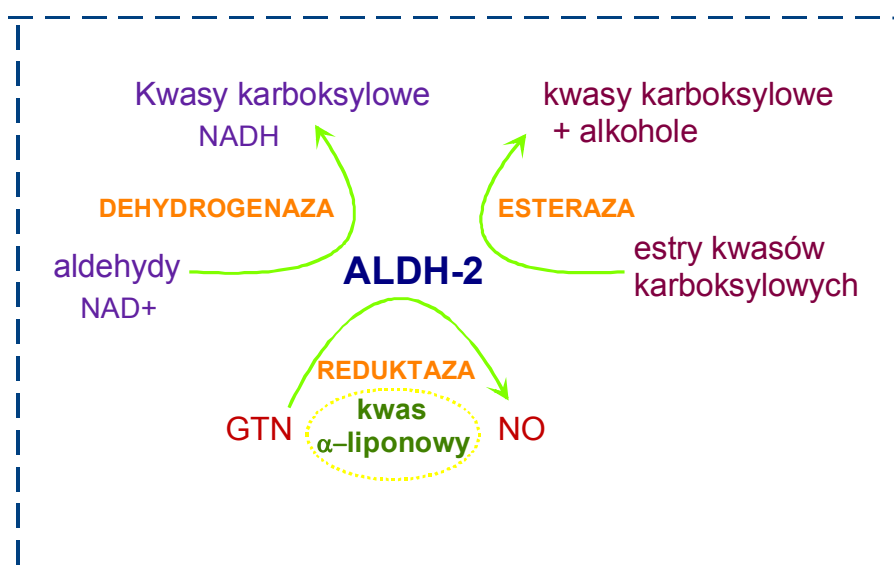
Dehydrogenaza aldehydowa (ALDH) jest metaloflawoproteinowym homotetramerem, związanym z dinukleotydem flawinoadeninowym (FAD). W grupie prostetycznej tego enzymu znajduje się molibden i żelazo. ALDH jest głównym enzymem katalizującym reakcję utlenienia aldehydów, odgrywa ważną rolę w biotransformacji leków i ksenobiotyków. Zidentyfikowano 12 izoenzymów ALDH, o zróżnicowanej specyficzności substratowej [26].

ALDH-2 jest mitochondrialną izoformą dehydrogenazy aldehydowej i do tej pory poznano jej trzy aktywności enzymatyczne: 1. dehydrogenazy, która wymaga jako kofaktora NAD^+ , 2. esterazy oraz 3. reduktazy. Enzym ten posiada w centrum aktywnym grupy sulfhydrylowe reszt Cys, niezbędne do jego aktywności, które mogą być utleniane do disiarczku, co prowadzi do zahamowania aktywności [89, 127].

Główną rolą ALDH-2 jest eliminacja toksycznych aldehydów, jak np. aldehyd octowy, główny metabolit etanolu [26, 59, 81, 89, 128]. Na tej drodze spełnia bardzo ważną rolę, gdyż zapobiega akumulacji toksycznych aldehydów, jak dialdehyd malonowy lub 4-hydroksynonenal prowadzących do powstawania adduktów z białkami i następnie peroksydacji lipidów, dysfunkcji białek (w tym enzymów), zniszczeń strukturalnych i apoptozy [128]. ALDH-2 ma także właściwości antyoksydacyjne [116, 128].

ALDH-2 jest odpowiedzialna za biotransformację nitrogliceryny [19, 76, 81, 116], w tym procesie wykorzystuje aktywność reduktazy [48, 127]. Niezbędnym kofaktorem jest np. kwas dihydroliponowy, który odzyskuje aktywność enzymu, przez redukcję grup tiolowych w jego centrum aktywnym [127]. Mechanizm bioaktywacji nitrogliceryny i uwalniania NO przy udziale tego enzymu nie jest jeszcze do końca znany [81].

ALDH-2 jest hamowana w stresie oksydacyjnym, a także przez NO, w wyniku utlenienia grup tiolowych w centrum aktywnym tego enzymu [80].



Rys. 4. Aktywności ALDH-2

Kwas α -liponowy

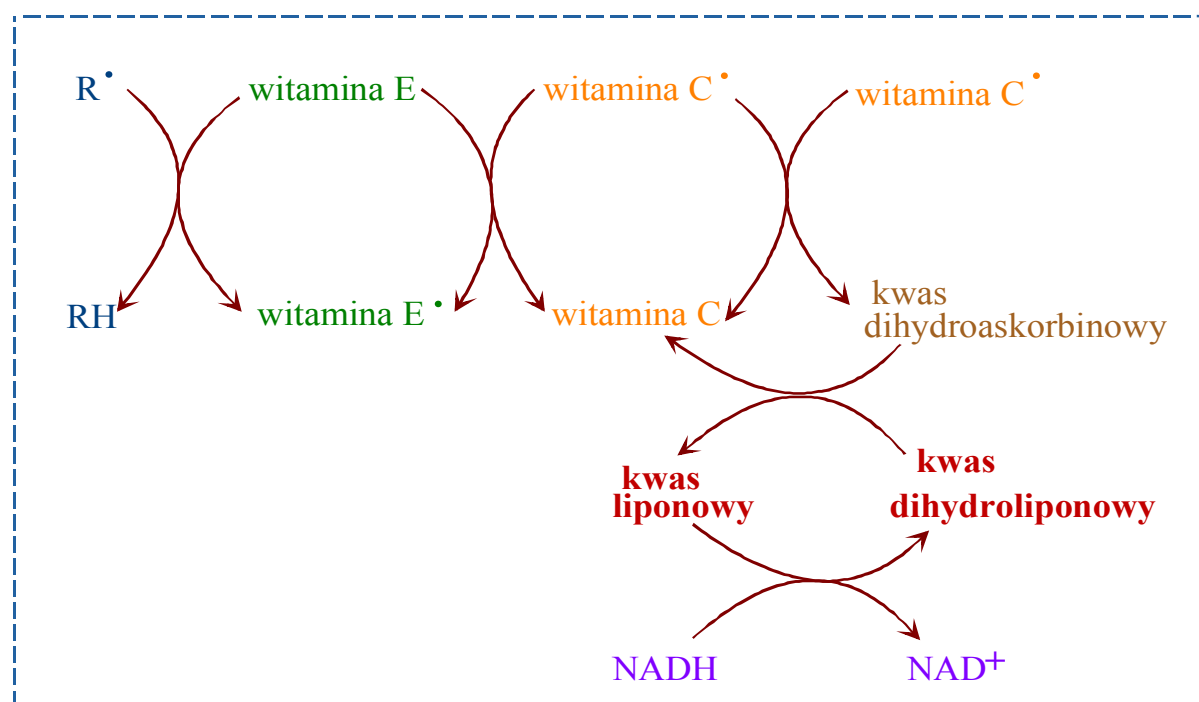
Kwas α -liponowy jest organicznym, ośmiowęglowym, nasyconym kwasem tłuszczowym. Nazwa chemiczna to: kwas 1,2-ditiolano-3-pentanowy, a systematyczna: kwas 6,8-ditiooktanowy. W swojej budowie chemicznej posiada pierścień ditiolowy, a występujące w nim atomy siarki mogą ulegać redukcji do grup $-SH$, dając zredukowaną formę kwasu liponowego – kwas dihydroliponowy.

Kwas α -liponowy ma dwa enancjomery, biologicznie aktywny R oraz S [17, 129].

Kwas α -liponowy i dihydroliponowy mają silne właściwości antyoksydacyjne [4, 8, 9, 15, 78, 93, 100, 123, 129]. Naturalnie występuje we wszystkich rodzajach komórek eukariotycznych i prokariotycznych [93]. Uważa się, że jest on syntetyzowany przez organizmy z kwasu oktanowego i cysteiny [9, 93, 100]. Jest koenzymem w wieloenzymatycznych kompleksach enzymatycznych dehydrogenaz, jak np.: dehydrogenazy α -ketoglutaranu, dehydrogenazy purynowej [4, 78, 123, 129], dehydrogenazy α -ketokwasów

o rozgałęzionych łańcuchach, dehydrogenazy pirogronianowej oraz w kompleksie rozszczepiającym glicynę.

Wykazano korzystny efekt kwasu α -liponowego w terapii wielu chorób, włączając cukrzycę, miażdżycę tętnic [8, 9, 15, 100, 132], choroby neurodegeneracyjne [8, 9, 15, 17, 73, 78, 100,], chorobę Alzheimera [52], zawał serca, udar niedokrwieny mózgu [8, 15, 100], choroby stawów [9], nabyty zespół braku odporności (AIDS) [8, 9, 73, 78], zatrucie alkoholowe, zapalenie wątroby [8, 15, 100], chorobę Wilsona, kwasicę mleczanową [73] oraz w stanach zatrucia lekami [4, 77]. Kwas α -liponowy poprawia funkcję śródbłonna zaburzone w procesie starzenia się [113], w miażdżycy [106], w otyłości [69]. Zmniejsza otyłość [132], hamuje łaknienie [69]. Zapobiega utlenianiu frakcji LDL cholesterolu [106, 129], zapobiega powstawaniu dyslipidemii [131], korzystnie wpływa na metabolizm glukozy [123], działa przeciwnadciśnieniowo [84, 117, 122, 123, 129], wykazuje działanie przeciwzapalne [133, 134].

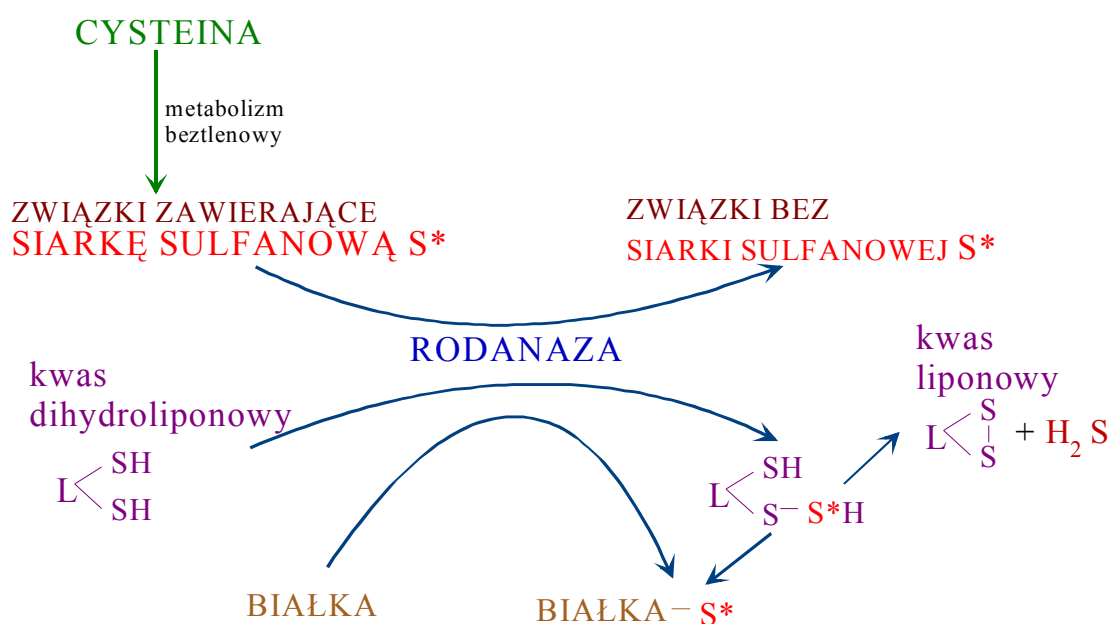


Rys. 5. Rola kwasu liponowego w odzyskiwaniu aktywności antyoksydacyjnej witamin [122 – modyfikacja rysunku].

Zainteresowanie współczesnej farmakologii doświadczalnej oraz medycyny kwasem α -liponowym wiąże się głównie z jego wyjątkową siłą redukcyjną oraz niskim potencjałem oksydo-redukcyjnym [9, 15, 93]. Potencjał redukcyjny kwasu dihydroliponowego / kwasu liponowego wynosi $-0,29V$, więc jest on najsilniejszym reduktorem w komórkach [9].

Dodatkowo kwas ten jest rozpuszczalny zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach, co jest wyjątkową cechą wśród antyoksydantów [9, 93, 100, 123]. Charakteryzuje się on wysoką reaktywnością przeciw wolnym rodnikom i zdolnością regeneracji witamin C i E oraz zredukowanej formy glutationu (GSH) [8, 9, 15, 73, 78, 90, 100, 123, 129] i koenzymu Q [73]. Zapobiega powstawaniu oksydantów, niszczy oksydanty lub hamuje ich aktywność chemiczną, chroni enzymy przed utlenieniem [73]. Z tych powodów nazywany jest antyoksydantem antyoksydantów [9, 100].

Kwas α -liponowy podnosi poziom siarki sulfanowej oraz zwiększa aktywność rodanazy w tkankach, a także współdziała z rodanazą w przemianach siarki sulfanowej [10, 24], odgrywając istotną rolę w uwalnianiu siarkowodoru [10], który ma działanie naczyniorozszerzające [21, 75], uczestniczy w regulacji kurczliwości kardiomiocytów, neurotransmisji, wydzielaniu insuliny [75].



Rys. 6. Rola kwasu liponowego w przemianach siarki sulfanowej.

Kwas dihydroliponowy służy jako akceptor siarki sulfanowej w reakcji katalizowanej przez rodanazę. Następnie uwalnia siarkę sulfanową w formie H_2S . Uczestniczy także w przenoszeniu siarki sulfanowej na grupy tiolowe białek (receptorów, enzymów), zmieniając ich aktywność.

Kwas α -liponowy zwiększa katabolizm aldehydów, może bezpośrednio wiązać aldehydy [123], włączając bardzo reaktywny metyloglioksal, prowadząc do ich wydalania z żółcią i moczem. Zmniejszając poziom aldehydów w tkankach, chroni grupy SH białek kanałów wapniowych. Zachowuje ich funkcje, co prowadzi do zmniejszenia wolnych jonów wapnia w komórce i spadku napięcia naczyń. Kwas α -liponowy przez zmniejszenie poziomu aldehydów w tkankach zapobiega inaktywacji enzymów antyoksydacyjnych zawierających w centrum aktywnym grupy SH, jak np. peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa, syntaza NO, cyklaza guanylanowa, zapewniając ich właściwe funkcjonowanie. Zapobiega także zmniejszeniu ilości argininy, substratu dla syntazy NO, a zachowanie syntezy NO w odpowiedniej ilości utrzymuje właściwą, prawidłową oporność naczyń [122].

Dodatkowymi zaletami kwasu α -liponowego jest to, że może on być podawany doustnie, ponieważ jest łatwo wchłaniany w żołądku [9, 100] i nie wykazuje działania toksycznego w dawkach stosowanych w profilaktyce i proponowanych w terapii [9]. Dawka śmiertelna (LD_{50}) po podaniu dożołądkowym wynosi 1130 i 502 mg/kg, a po podaniu dootrzewnowym 200 i 160 mg/kg, odpowiednio dla szczurów i myszy. Co w przełożeniu oznacza, że przyjęcie przez człowieka kilku gramów doustnie jest dobrze tolerowane [129].

Kwas α -liponowy wybrano do badań, ponieważ jest on związkiem tiolowym z silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. W procesie biotransformacji nitrogliceryny do NO niezbędne są grupy tiolowe, których jest donorem. Jako antyoksydant antyoksydantów, o niskim potencjale oksydo-redukcyjnym może także odzyskiwać zdolność redukcijną innych bardzo istotnych antyoksydantów w organizmie. Co jest bardzo istotne w świetle najnowszych teorii powstawania zjawiska tolerancji na nitroglicerynę. Dodatkowo odzyskuje on aktywność ALDH-2, enzymu, który obecnie jest uznawany jako kluczowy w rozwoju tolerancji na nitroglicerynę.

I. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji u szczurów po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny oraz próba wyjaśnienia mechanizmu jej powstawania.

Badania farmakologiczne obejmowały:

- Oznaczenie wpływu nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze szczura
- Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na ciśnienie tętnicze szczura po wielokrotnym podaniu
- Wywoływanie tolerancji na nitroglicerynę u szczurów w badaniach in vivo
- Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji na nitroglicerynę
- Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na hipotensyjny efekt nitrogliceryny po jednokrotnym i wielokrotnym podaniu

Badania biochemiczne obejmowały:

- Oznaczenie wpływu wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na procesy peroksydacyjne oraz enzymy antyoksydacyjne w tkankach i osoczu szczurów
- Oznaczenie wpływu wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom niebiałkowych tioli, aktywność S-transferazy glutationowej oraz aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w tkankach i osoczu szczurów
- Oznaczenie wpływu wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom NO oraz S-nitrozotiole w tkankach i osoczu szczurów
- Oznaczenie wpływu wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom siarki sulfanowej oraz aktywność rodanazy w tkankach i osoczu szczurów.

III. Materiały

1. Zwierzęta doświadczalne

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach o masie ciała 180-220g. Zwierzęta przebywały w standardowych klatkach, odpowiednich do ich rozmiarów, w pomieszczeniach klimatyzowanych, o temperaturze 20 – 24 °C i cyklu świetlnym 12/12 godzin. Zwierzęta karmiono paszą Muligran lub LSH przeznaczoną dla zwierząt laboratoryjnych, przy wolnym dostępie do wody wodociągowej. Grupy liczyły 6 – 8 zwierząt.

2. Użyte leki i związki

Nitrogliceryna (Nitroglycerinum, tabletki podjęzykowe, Lek S.A.), Nitrogliceryna (Nitroglycerinum, roztwór do wlewów dożylnych, Pliva Kraków), Kwas α -liponowy (Neurex, roztwór do wstrzykiwań, Hexal® AG), Heparyna (Heparinum, Polfa S.A.), Tiopental sodu (Thiopental Natrium, HEFA-Frenon Arzneimittel).

Kwas tiobarbituranowy (Sigma-Aldrich), 1,1',3,3'-tetraetoksyproman (Sigma-Aldrich), Kwas trichlorooctowy (Sigma-Aldrich), Diocetan 2',7'-dichlorohydrofluoresceiny (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich), Dichlorofluorescein (Sigma-Aldrich), CDNB (Sigma-Aldrich), Glutation zredukowany (GSH) (Sigma-Aldrich), 2,3-Diaminonaftalen (Sigma-Aldrich), Chlorek rtęci (Sigma-Aldrich), Kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (Sigma-Aldrich), Sulfanilamid (Sigma-Aldrich), N-(1-naftylo)-etylenediamina (Sigma-Aldrich), Reduktaza azotynowa (Sigma-Aldrich), L- γ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilid (Fluka), Gly-Gly (Fluka), Chlorek magnezu (Sigma-Aldrich), Cytochrom c (Sigma-Aldrich), Ksantyna (Sigma-Aldrich), Oksydaza ksantyny (Sigma-Aldrich), Reduktaza glutationowa (Sigma-Aldrich), NADPH (Sigma-Aldrich), EDTA (POCH), Odczynnik Folin-Ciocalteu'a (POCH). Pozostałe odczynniki pochodziły z firmy POCH S.A. (Polskie Odczynniki Chemiczne).

3. Dawkowanie leków i drogi podania

Nitroglicerynę podawano podskórną (s.c.), w dawce 30 mg/kg m.c./dzień, w trzech dawkach podzielonych (3 x 10 mg/kg m.c.), w postaci zawiesiny w soli fizjologicznej oraz dożylnie (i.v.), w dawce 150 µg/kg m.c.

Kwas α-liponowy podawano dootrzewnowo (i.p.) w dawce 35 mg/kg m.c./dzień oraz 100 mg/kg m.c./dzień, w dwóch dawkach podzielonych (2 x 50 mg/kg m.c.).

Do znieczulenia ogólnego zwierząt używano tiopentalu sodu, w dawce 70 mg/kg m.c., który wstrzykiwano dootrzewnowo.

Heparynę stosowano w celu zapobiegania powstawania zakrzepu w tętnicy szyjnej szczurów podczas pomiaru ciśnienia tętniczego krwi.

4. Grupy doświadczalne

Zwierzęta podzielone na poszczególne grupy eksperymentalne otrzymywały:

Grupa 1 (grupa kontrolna): Sól fizjologiczna (0,9% NaCl), 0,6 ml s.c., przez 8 dni. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 2 (NTG4): Nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień w trzech dawkach podzielonych, s.c., przez 4 dni. Piątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 3 (NTG8): Nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień w trzech dawkach podzielonych, s.c., przez 8 dni. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 4 (NTG+KL): Nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień w trzech dawkach podzielonych, s.c., przez 8 dni. Kwas α-liponowy jednorazowo w 8 dniu w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, i.p.. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 5 (NTG+KL35): Nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień w trzech dawkach podzielonych, s.c. i kwas α-liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, i.p., przez 8 dni. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 6 (KL35): Kwas α-liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, i.p., przez 8 dni. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 7 (NTG+KL100): Nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień w trzech dawkach podzielonych, s.c. i kwas α-liponowy w dawce 100 mg/kg m.c./dzień w dwóch dawkach podzielonych, i.p., przez 8 dni. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

Grupa 8 (KL100): Kwas α-liponowy w dawce 100 mg/kg m.c./dzień w dwóch dawkach podzielonych, i.p., przez 8 dni. Dziewiątego dnia 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny i.v.;

5. Obliczenia statystyczne

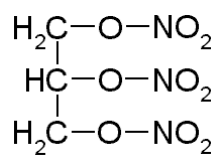
Wyniki przedstawiono jako średnie pomiarów $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM). Przy porównaniu wartości średnich stosowano test ANOVA. Różnice średnich uznawano za zmienną statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

6. Aparatura

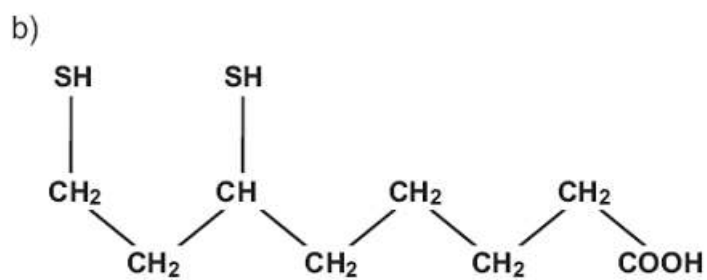
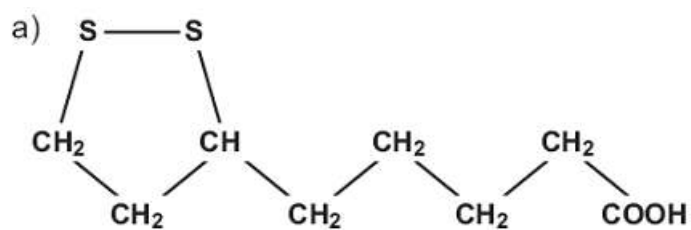
- Aparat do pomiaru ciśnienia tętniczego u małych zwierząt DATAMAX BPL-8, firmy Columbus Instruments, Ohio
- Spektrofotometr Marcel 330
- Spektrofotometr Hitachi U-2800
- Spektrofotometr fluorescencyjny Hitachi F-2000
- Chemiluminometr Lucy 1

IV. Wzory badanych leków

NITROGLICERYNA



KWAS α -LIPONOWY (a) i jego zredukowana forma – KWAS DIHYDROLIPONOWY (b).



V. Metodyka

1. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi

Szczury normotensyjne poddano znieczuleniu ogólnemu poprzez podanie dootrzewnowe tiopentalu sodu (70 mg/kg). Do tętnicy szyjnej wspólnej wprowadzono polietylenową kapilarę wypełnioną heparyną w celu pomiaru ciśnienia tętniczego. Ciśnienie tętnicze krwi we wszystkich grupach mierzono przed dożylnym podaniem nitrogliceryny (150 µg/kg) oraz przez 20 minut po jej podaniu.

Zwierzęta poddano eutanazji przez skrwawienie i pobierano krew do próbek heparynizowanych oraz narządy tj.: wątroba, serce, aorta, nerki, mózg. Narządy przepłukiwano w 0,9% NaCl i natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Krew wirowano w celu oddzielania osocza. Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C, aż do wykonania oznaczeń biochemicznych.

2. Oznaczenie wpływu nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze krwi szczura

Wpływ nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze krwi szczura oznaczono przed oraz po dożylnym podaniu 150 µg/kg m.c. nitrogliceryny.

3. Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na ciśnienie tętnicze szczura po wielokrotnym podaniu

Ciśnienie tętnicze krwi mierzono w tętnicy szyjnej wspólnej dziewiątego dnia u szczurów, którym podawano przez 8 dni kwas α -liponowy w dawkach 35 mg/kg m.c./dzień oraz 2 x 50 mg/kg m.c./dzień.

4. Indukcja tolerancji na nitroglicerynę in vivo u szczurów

Tolerancję wywoływano podając podskórnie szczurom nitroglicerynę, w dawce 10 mg/kg m.c. trzy razy dziennie, przez 4 kolejne dni (grupa 2) lub przez 8 kolejnych dni (grupa 3). Grupa kontrolna zwierząt otrzymywała podskórnie sól fizjologiczną, trzy razy dziennie

przez 8 dni, w objętości 0,6 ml (grupa 1). Odpowiednio piątego lub dziewiątego dnia u zwierząt z grup badanych i grupy kontrolnej, mierzono ciśnienie krwi w tętnicy szyjnej wspólnej, przed i po podaniu dożylnym nitrogliceryny w dawce 150 μ g/kg m.c., przez okres 20 minut.

5. Wpływ kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny

Szczurom podawano nitroglicerynę w dawce 10 mg/kg m.c. trzy razy dziennie przez 8 dni. Dodatkowo zwierzęta otrzymywały kwas α -liponowy dootrzewnowo: jednokrotnie w ósmym dniu doświadczenia, w dawce 35 mg/kg m.c. (grupa 4) lub codziennie (równolegle z nitrogliceryną) przez okres 8 dni, jeden raz w ciągu dnia, w dawce 35 mg/kg m.c./dzień (grupa 5) oraz w dawce 50 mg/kg m.c. dwa razy dziennie (grupa 7). Grupom kontrolnym podawano podskórną sól fizjologiczną, trzy razy dziennie przez 8 dni, w objętości 0,6 ml (grupa 1) lub tylko kwas α -liponowy: codziennie przez okres 8 dni, jeden raz w ciągu dnia, w dawce 35 mg/kg m.c./dzień (grupa 6) oraz w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień (grupa 8). Dziewiątego dnia u wszystkich zwierząt mierzono ciśnienie krwi w tętnicy szyjnej wspólnej, przed i po podaniu dożylnym nitrogliceryny w dawce 150 μ g/kg m.c., przez okres 20 minut.

6. Oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na hipotensyjny efekt nitrogliceryny po jednokrotnym i wielokrotnym podaniu

Dziewiątego dnia u zwierząt leczonych przez 8 dni kwasem α -liponowym w dawce 35 mg/kg m.c./dzień oraz 2 x 50 mg/kg m.c./dzień mierzono ciśnienie krwi w tętnicy szyjnej wspólnej, przed i po podaniu dożylnym nitrogliceryny w dawce 150 μ g/kg m.c., przez okres 20 minut.

7. Oznaczenie poziomu peroksydacji lipidów (MDA) w tkankach i osoczu szczurów

Poziomy MDA mierzono metodą spektrofotometryczną z użyciem kwasu tiobarbiturowego. Jako standard zastosowano 1,1',3,3'-tetraetoksypropan [96]. Do 250 μ l

próbki dodano 250 μ l wody destylowanej, 500 μ l 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) w 0,25M HCl i 500 μ l 0,37% TBA w 0,25M HCl. Próbkę gotowano w łaźni wodnej przez 10 minut, a następnie wirowano przez 10 minut (10000 g). Absorbancję supernatantu mierzono przy długości fali 535 nm.

8. Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)

Dioctan 2',7'-dichlorohydrofluoresceiny (DCFH-DA) w homogenacie ulega deestryfikacji do dichlorohydrofluoresceiny, a następnie jest utleniany do dichlorofluoresceiny przez RFT [13]. 10 μ l próbki dodawano do 900 μ l 0,1M buforu fosforanowego (pH 7,4). Następnie dodawano 10 μ l DCFH-DA. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w 37°C przez 30 minut, a następnie wirowano (12000 g, 8 minut). Fluorescencję mierzono przy długościach fali 488 nm i 525 nm. Poziom RTF odczytano z krzywej wzorcowej dla dichlorofluoresceiny.

9. Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej

Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej wykonywano metodą pośrednią pomiaru spadku absorbancji NADPH. W metodzie tej utleniony glutation GSSG tworzący się w reakcji katalizowanej przez peroksydazę glutationową jest redukowany przez reduktazę glutationową przy jednoczesnym utlenieniu NADPH. Oksydacja NADPH powoduje spadek absorbancji przy 340 nm w temp. 37 °C [5]. W kuwecie spektrofotometrycznej umieszczano: 500 μ l 0,1M buforu fosforanowego (pH 7,0) zawierającego 0,1mM EDTA, 100 μ l 10mM GSH (zredukowanego glutationu), 100 μ l 1,5mM NADPH w 0,1% NaHCO₃, 100 μ l reduktazy glutationowej (2,4 U/ml), 100 μ l homogenatu lub osocza i 100 μ l 1,5mM H₂O₂. Spadek absorbancji mierzono przez 2 minuty. Aktywność enzymu obliczono na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji dla NADPH, wynoszącego 6,22 mmol/cm.

10. Oznaczenie aktywności katalazy

Oznaczenie aktywności katalazy bazuje na pomiarze szybkości rozpadu substratu – H₂O₂ [5]. 650 μ l 0,05M buforu fosforanowego (pH 7,0) i 300 μ l 54 mM H₂O₂ w buforze umieszczono w kuwecie spektrofotometrycznej i następnie dodawano 50 μ l homogenatu tkankowego lub osocza. Spadek absorbancji mierzono przy długości fali 240 nm w 25 °C. Za

jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu minuty rozkłada 1 μmol nadtlenu wodoru.

11. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oznaczano pośrednio poprzez pomiar hamowania redukcji cytochromu c [5]. 0,97 μl mieszaniny roztworu ksantyny w 1 mM NaOH i roztworu cytochromu c w 0,05M buforze fosforanowym (pH 7,8) umieszczano w kuwecie spektrofotometrycznej i dodawano 16,6 μl roztworu oksydazy ksantynowej (0.2U/ml) i 16,6 μl homogenatu lub osocza. Mierzono wzrost absorbancji przez 2 minuty przy długości fali 550 nm w temperaturze 25°C. Względną szybkość redukcji (W) cytochromu c obliczono według poniższego wzoru:

$$W[\%] = \frac{\Delta A_b}{\Delta A_c} \times 100\%, \text{ gdzie } A_b \text{ jest próby badanej, a } A_c \text{ próby kontrolnej.}$$

12. Oznaczenie poziomu grup tiolowych

Oznaczenie oparte jest na metodzie Ellman'a: kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DTMB) ulega redukcji przy udziale grup tiolowych do kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego [111]. 25 μl kwasu tiooctowego (TCA) dodawano do 475 μl homogenatu lub osocza i następnie próbki wirowano (10000 x g, 10 min, 0°C). Następnie 100 μl supernatantu, 800 μl 0,2M buforu fosforanowego (pH 8,2) mieszano z 100 μl 6 mM DTNB. Absorbancję mierzono przy długości fali 412 nm. Ilość powstającego w reakcji kwasu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego obliczono z krzywej wzorcowej wyznaczonej dla 1mM roztworu GSH w 2,5% TCA.

13. Oznaczenie aktywności S-transferazy glutationowej

S-transferaza glutationowa katalizuje reakcję pomiędzy glutationem i CDNB, w której powstaje 2,4-dinitrofenylo-S-glutation, wykazujący maksimum absorbancji przy długości fali 340 nm [45]. 50 μl 20 mM roztworu GSH, 50 μl 20 mM roztworu CDNB i 50 μl rozcieńczonego 50 razy homogenatu lub osocza dodawano do 850 μl 0,1M buforu fosforanowego (pH 6,5). Absorbancję zmierzono trzydzieści i dziewięćdziesiąt sekund

później przy długości fali 340 nm. Aktywność enzymu oznaczono jako różnicę pomiędzy wzrostem absorbancji próby badanej i kontrolnej podzieloną przez wartość milimolowego współczynnika absorpcji dla powstającego koniugatu (9,6 mmol/cm).

14. Oznaczenie aktywności γ -glutamylotranspeptydazy

W tej metodzie bezbarwny substrat L- γ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilid ulega enzymatycznej przemianie do p-nitroaniliny [97]. Mieszanina reakcyjna (450 μ l) zawierała 5 mM L- γ -glutamyl-3-karboksy-4-nitroanilid, 11 mM $MgCl_2$ i 22,2 mM Gly-Gly w 111 mM buforze Tris-HCl (pH 9). Homogenat lub osocze (50 μ l) inkubowano z mieszaniną reakcyjną przez 5 minut w temperaturze 37°C. Reakcję przerywano dodając 1 ml 1,5 M kwasu octowego. Próbkę wirowano przez 5 minut (12000xg), po czym mierzono absorbancję p-nitroaniliny przy długości fali 410 nm. Aktywność enzymu określono w μ molach produktu reakcji (odczytanych z krzywej standardowej dla p-nitroaniliny) powstającego w czasie 1 minuty inkubacji.

15. Oznaczenie poziomu azotanów III i V

Azotany III (NO_2^-) i V (NO_3^-) – końcowe produkty metabolizmu tlenku azotu (NO) oznaczono metodą Griess'a. Test opiera się na reakcji azotanów III z sulfanilamidem i dihydrochlorem N-(1-naftylo)-etylodiaminy, które tworzą kolorowy produkt [60]. 750 μ l podwójnie destylowanej wody i 250 μ l homogenatu tkankowego lub osocza gotowano w łaźni wodnej w temperaturze 100 °C przez 15 minut. Po ochłodzeniu próbki wirowano przez 10 minut (10000 x g). Oznaczenie azotanów III: 75 μ l supernatantu i 75 μ l podwójnie destylowanej wody inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali 492 nm i dodawano po 50 μ l odczynnika Griess'a (1% roztwór sulfanilamidu w 2,5% H_2PO_3) i 0,1% roztwór dihydrochloranu N-(1-naftylo)-etylodiaminy w 2,5% H_2PO_3 . Po 15 minutach inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej ponownie mierzono absorbancję przy długości fali 492 nm. Oznaczenie azotanów V: Azotany V redukowano do azotanów III przy pomocy reduktazy azotanów III. 75 μ l supernatantu, 4 μ l reduktazy (4U), 50 μ l 0,017% roztworu NADPH i 21 μ l wody podwójnie destylowanej inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali 492 nm i dodawano po 50 μ l odczynnika

Griess'a (1% roztwór sulfanilamidu w 2,5% H_2PO_3) i 0,1% roztwór dihydrochloranu N-(1-naftylo)-etylodiaminy w 2,5% H_2PO_3 . Po 15 minutach inkubacji w ciemności, w temperaturze pokojowej ponownie mierzono absorbancję przy długości fali 492 nm. Krzywą wzorcową przygotowano dla roztworu azotanu III sodu.

16. Oznaczenie poziomu S-nitrozotoli

S-nitrozotiole oznaczano wg Marzinzig'a. W metodzie tej DAN (2,3-diaminonaftalen) jest nitrowany do 2,3-naftotrizolu (NAT), co pozwala oznaczyć poziom azotanów III. S-nitrozotiole ulegają rozpadowi w obecności jonów rtęci (Hg^{2+}). Różnica poziomów azotanów III w obecności i nieobecności jonów rtęci wyraża poziom S-nitrozotoli [79]. 50 μl homogenatu tkankowego zmieszano z 750 μl wody podwójnie destylowanej i 250 μl 1,58 mM roztworu DAN w 0,62 M HCl lub 250 μl DAN + HgCl_2 (1,11mM) (mieszanina 4:1). Inkubowano przez 10 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Reakcję przerywano dodając 50 μl 10 M roztworu NaOH. Fluorescencję mierzono przy długościach fali 364 i 410 nm. Poziom S-nitrozotoli obliczono z krzywej wzorcowej przygotowanej dla mieszaniny 10 μM L-cysteiny i 10 μM NaNO_2 w 0,62 M HCl.

17. Oznaczenie poziomu siarki sulfanowej

Poziom siarki sulfanowej oznaczano metodą zimnej cyjanolizy [130]. Zmieszano 400 μl homogenatu tkankowego z 420 μl wody destylowanej, 80 μl 1N roztworu NH_3 i 100 μl 0,5M roztworu KCN. Następnie powstałą mieszaninę inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodano 20 μl 38% roztworu formaldehydu i 200 μl odczynnika Goldsteina ($\text{Fe}(\text{NO})_3 + \text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$). Wirowano 10 minut (12000g), a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 460 nm. Krzywą wzorcową przygotowano dla 1 mM roztworu KSCN.

18. Oznaczenie aktywności rodanazy

Aktywność rodanazy oznaczono wg Sörbo [114]. Mieszaninę reakcyjną zawierającą: 50 μl homogenatu tkankowego rozcieńczonego 100x, 150 μl wody destylowanej, 125 μl 0,25M roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 125 μl 0,2 M roztworu KH_2PO_4 i 75 μl 0,5 M roztworu KCN

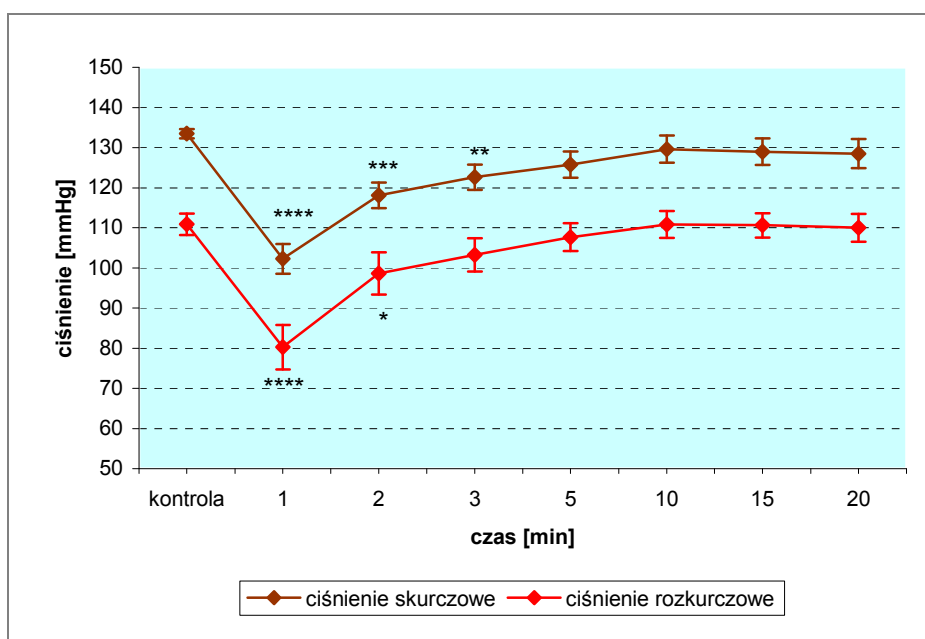
inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 125 μ l 38% roztworu formaldehydu i 600 μ l odczynnika Golsteina ($\text{Fe}(\text{NO})_3 + \text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$). Produkt reakcji (tiocyjanek) tworzył z jonami Fe kolorowy kompleks, którego absorbancję mierzono przy długości fali 460 nm. Aktywność enzymu wyrażono w μ molach produktu powstałego w czasie 1 minuty inkubacji na 1 mg białka. Krzywą wzorcową wykonano dla tiocyjanku.

VI. Wyniki

1. Wpływ nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze szczura po jednokrotnym jej podaniu

Nitrogliceryna podana dożylnie w pojedynczej dawce 150 $\mu\text{g/kg}$ m.c. powodowała istotny statystycznie spadek ciśnienia tętniczego krwi u normotensyjnych szczurów, (Wykres 1).

Wykres 1. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny 150 $\mu\text{g/kg}$ m.c., u szczurów w grupie 1 (kontrola).



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamionna w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce 150 $\mu\text{g/kg}$ m.c.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$.

2. Wpływ nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze szczura po wielokrotnym jej podawaniu

Ciśnienie tętnicze krwi u zwierząt, którym podawano nitroglicerynę podskórną w dawce 30 mg/kg m.c./dzień, w trzech podzielonych dawkach przez 4 (grupa 2) oraz przez 8 dni (grupa 3), było znamienne statystycznie niższe w porównaniu do ciśnienia u szczurów kontrolnych (grupa 1), (Tabela 1).

Tabela 1. Średnie skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi u szczurów

Grupa	Średnie ciśnienie tętnicze [mmHg]	
1 - K	skurczowe	133,50 ± 1,15
	rozkurczowe	110,88 ± 2,68
2 - NTG4	skurczowe	97,75 ± 2,32****
	rozkurczowe	77,25 ± 1,80****
3 - NTG8	skurczowe	104,33 ± 3,93****
	rozkurczowe	88,83 ± 2,85****

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do ciśnienia w grupie kontrolnej; ****p<0,001

K – kontrola; NTG8 – nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni; NTG4 – nitrogliceryna w dawce 30 mg/kg m.c./dzień przez 4 dni;

3. Wpływ kwasu α -liponowego na ciśnienie tętnicze krwi u szczurów

Kwas α -liponowy, podawany szczurom dootrzewnowo przez 8 dni w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, obniżał skurczowe ciśnienie tętnicze krwi, (Tabela 2).

Kwas α -liponowy, podawany szczurom dootrzewnowo przez 8 dni w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień, nie wpływał znamienne statystycznie na ciśnienie tętnicze krwi. Po tym czasie, ciśnienie tętnicze krwi było porównywalne z ciśnieniem w grupie kontrolnej (brak istotnych różnic statystycznych), (Tabela 2).

Tabela 2. Średnie skurczowe i rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi u szczurów

Grupa	Średnie ciśnienie tętnicze [mmHg]	
1 - K	skurczowe	133,50 ± 1,15
	rozkurczowe	110,88 ± 2,68
6 - KL35	skurczowe	125, 13 ± 3,24**
	rozkurczowe	110,75 ± 3,14
8 - KL100	skurczowe	133,86 ± 1,44
	rozkurczowe	110,57 ± 2,76

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do ciśnienia w grupie kontrolnej; **p<0,02

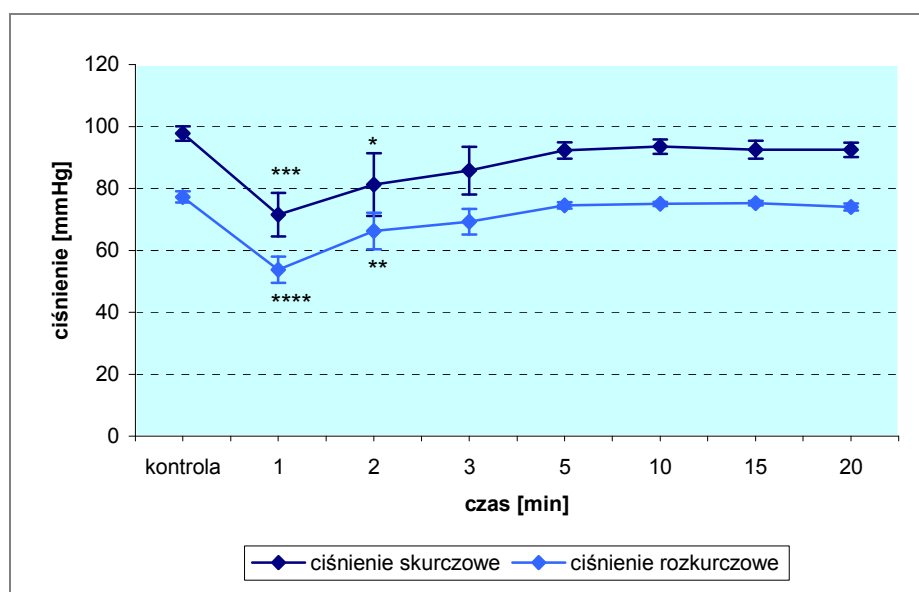
K – kontrola; KL35 – kwas α -liponowy, w dawce 35 mg/kg m.c./dzień; KL100 – kwas α -liponowy, w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień

4. Tolerancja na nitroglicerynę u szczurów w badaniach in vivo

U szczurów, którym podawano podskórną nitroglicerynę przez 4 dni, w dawce 30 mg/kg m.c./dzień, w trzech dawkach na dobę (grupa 2), nie obserwowano rozwoju tolerancji, (Tabela 3 oraz Wykres 2). Po dożylnym podaniu nitrogliceryny w 5 dniu, w dawce 150 μ g/kg m.c., dochodziło do istotnego statystycznie spadku ciśnienia tętniczego krwi. Procenty spadku ciśnienia tętniczego w tej grupie były porównywalne do procentów spadku ciśnienia w grupie kontrolnej (grupa 1). W grupie kontrolnej, w pierwszych minutach po podaniu dożylnym, nitrogliceryna istotnie statystycznie obniżała ciśnienie tętnicze krwi.

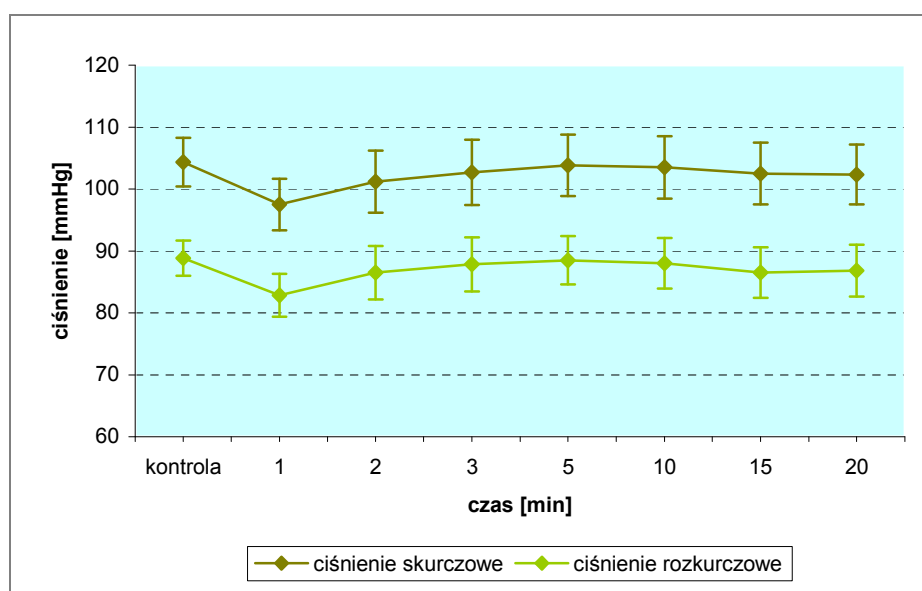
Podawanie nitrogliceryny przez 8 dni w dawce 30 mg/kg m.c./dzień, w trzech dawkach na dobę, (grupa 3), prowadziło do rozwoju tolerancji, (Tabela 3 oraz wykres 3). Po dożylnym podaniu nitrogliceryny w 9 dniu, w dawce 150 μ g/kg m.c., **nie dochodziło** do istotnego statystycznie spadku ciśnienia tętniczego krwi, co wskazuje na rozwój tolerancji.

Wykres 2. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w piątym dniu, u szczurów w grupie 2 (NTG4).



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce 150 μ g/kg m.c.; *p<0.05; **p<0.02; ***p<0.01; ****p<0.001.

Wykres 3. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, u szczurów w grupie 3 (NTG8).



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie;

Tabela 3. Procentowy spadek ciśnienia tętniczego krwi u szczurów po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dawce 150 µg/kg m.c. w 9 dniu badania

Grupa	Ciśnienie	Procent spadku ciśnienia tętniczego krwi [%]						
		Czas obserwacji [min]						
		1	2	3	5	10	15	20
1	skurczowe	23,41	11,51	8,14	5,80	2,90	3,37	3,74
	rozkurczowe	27,62	11,05	6,88	2,93	0,05	0,23	0,79
2	skurczowe	26,85	16,88	12,28	5,63	4,35	5,37	5,37
	rozkurczowe	30,42	14,24	10,36	3,56	2,91	2,59	4,21
3	skurczowe	6,55	3,03	1,59	0,48	0,80	1,75	1,92
	rozkurczowe	6,75	2,62	1,13	0,37	0,93	2,62	2,25
4	skurczowe	5,79	1,27	0,99	1,27	1,41	2,26	1,84
	rozkurczowe	3,49	-0,34	-0,50	0,16	0,33	1,65	2,15

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 8 zwierząt w grupie;

Grupa 1: 0,9% NaCl 0,6 ml, s.c., 3 razy dziennie przez 8 dni + nitrogliceryna 150 µg/kg m.c., i.v. w 9 dniu – kontrola;

Grupa 2: nitrogliceryna – 30 mg/kg m.c./dzień, s.c., przez 4 dni + nitrogliceryna 150 µg/kg m.c., i.v. w 9 dniu – NTG4;

Grupa 3: nitrogliceryna – 30 mg/kg m.c./dzień, s.c., przez 8 dni + nitrogliceryna 150 µg/kg m.c., i.v. w 9 dniu – NTG8;

Grupa 4: nitrogliceryna 30 mg/kg m.c./dzień, s.c., przez 8 dni + nitrogliceryna 150 µg/kg m.c., i.v. w 9 dniu + kwas α-liponowy 1 raz w 8 dniu - 35 mg/kg m.c., i.p. – NTG+KL;

5. Wpływ kwasu α-liponowego na rozwój tolerancji na nitroglicerynę

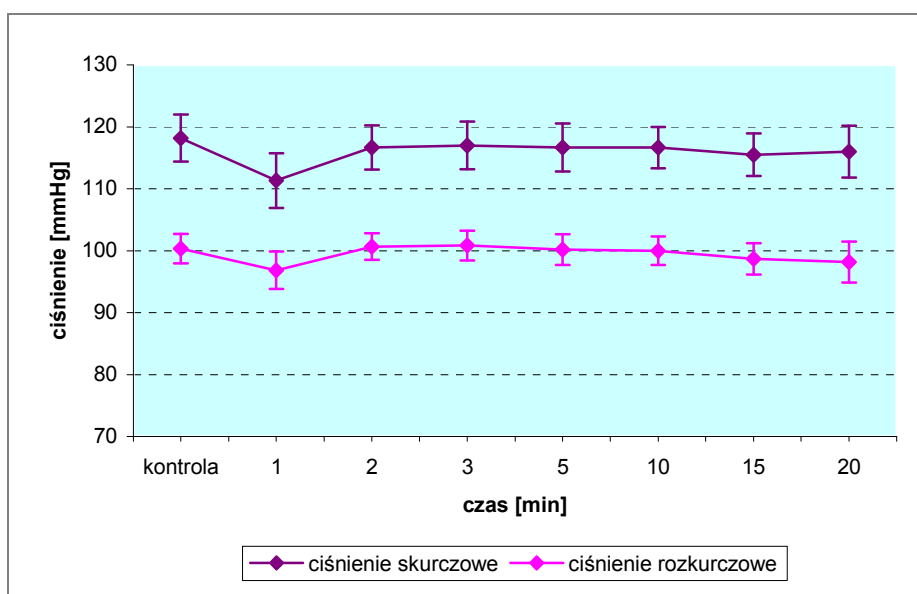
Jednokrotne podanie kwasu α-liponowego, w dawce 35 mg/kg m.c., i.p., w ósmym dniu wywoływania tolerancji u szczurów nie przywróciło efektu hipotensyjnego nitrogliceryny, (Tabela 3 oraz Wykres 4). Po dożylnym podaniu nitrogliceryny w 9 dniu, w dawce 150 µg/kg m.c., **nie dochodziło** do istotnego statystycznie spadku ciśnienia tętniczego krwi, tak jak w grupie 3 (NTG8).

W grupie 5, której podawano kwas α-liponowy w dawce 35 mg/kg m.c., i.p., przez 8 dni jeden raz dziennie równolegle z nitrogliceryną w dawce 3 x 10 mg/kg m.c./dzień, s.c., nie

doszło do rozwoju całkowitej tolerancji na nitroglicerynę, (Wykres 5). Po podaniu nitrogliceryny w dawce 150 $\mu\text{g/kg}$ m.c., i.v., obserwowano istotny statystycznie spadek ciśnienia tętniczego krwi. Efekt hipotensyjny był jednak mniej nasilony niż w grupie kontrolnej. Tolerancja na nitroglicerynę nie rozwinęła się, ale działanie nitrogliceryny było osłabione.

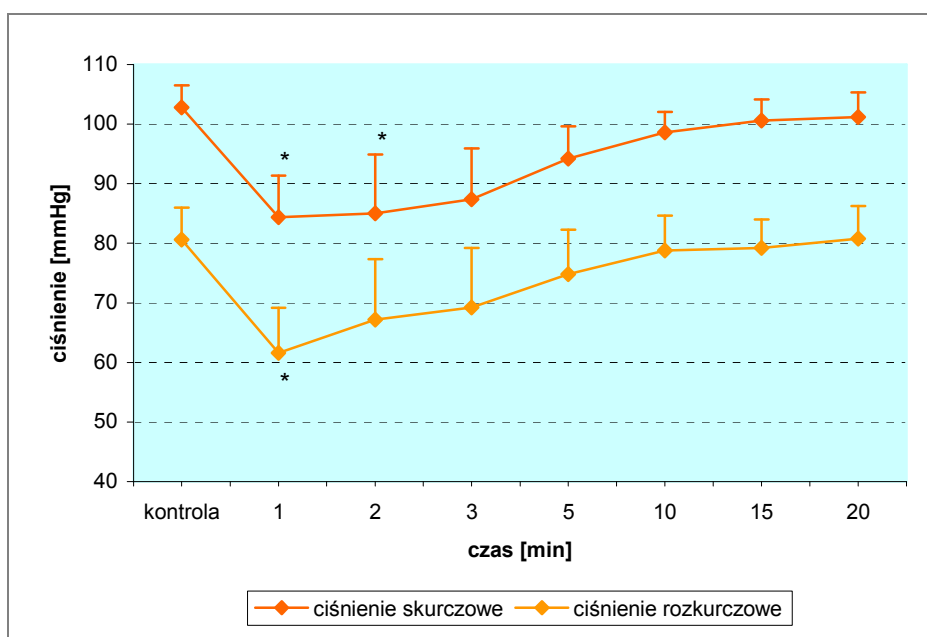
W grupie 7, której podawano kwas α -liponowy w dawce 100 mg/kg m.c./dzień, i.p., w dwóch podzielonych dawkach, przez 8 dni równoległe z nitrogliceryną, w dawce 3 x 10 mg/kg m.c./dzień, s.c., **nie doszło** do rozwoju tolerancji na nitroglicerynę, (Wykres 6). Po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, w dawce 150 $\mu\text{g/kg}$ m.c., **obserwowano** istotny statystycznie spadek ciśnienia tętniczego krwi. Działanie hipotensyjne nitrogliceryny w tej grupie było porównywalne do działania w grupie kontrolnej.

Wykres 4. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, u szczurów w grupie 4 (NTG+KL).



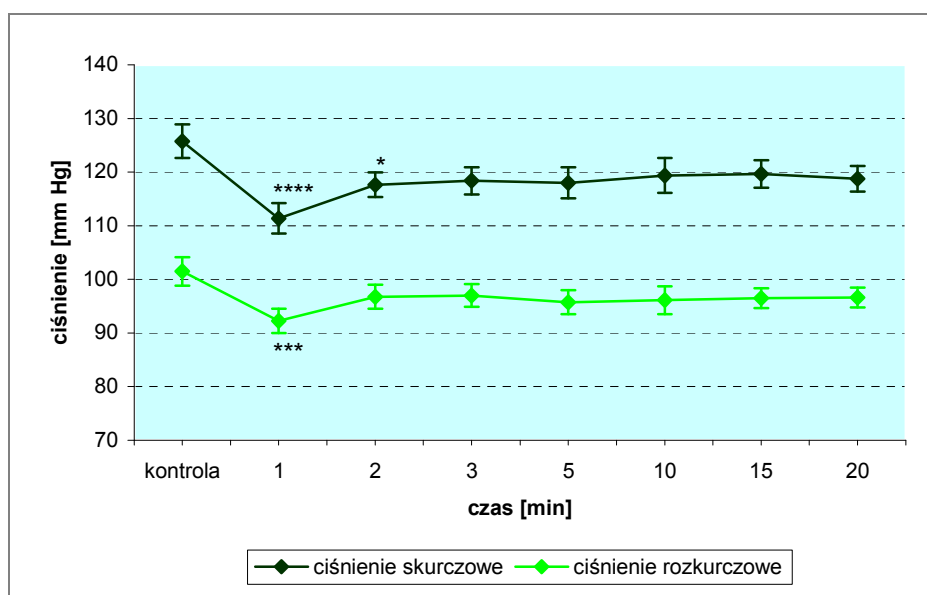
Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie;

Wykres 5. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, u szczurów w grupie 5 (NTG+KL35).



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce 150 µg/kg m.c.; * $p < 0.05$.

Wykres 6. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, u szczurów w grupie 7 (NTG+KL100).

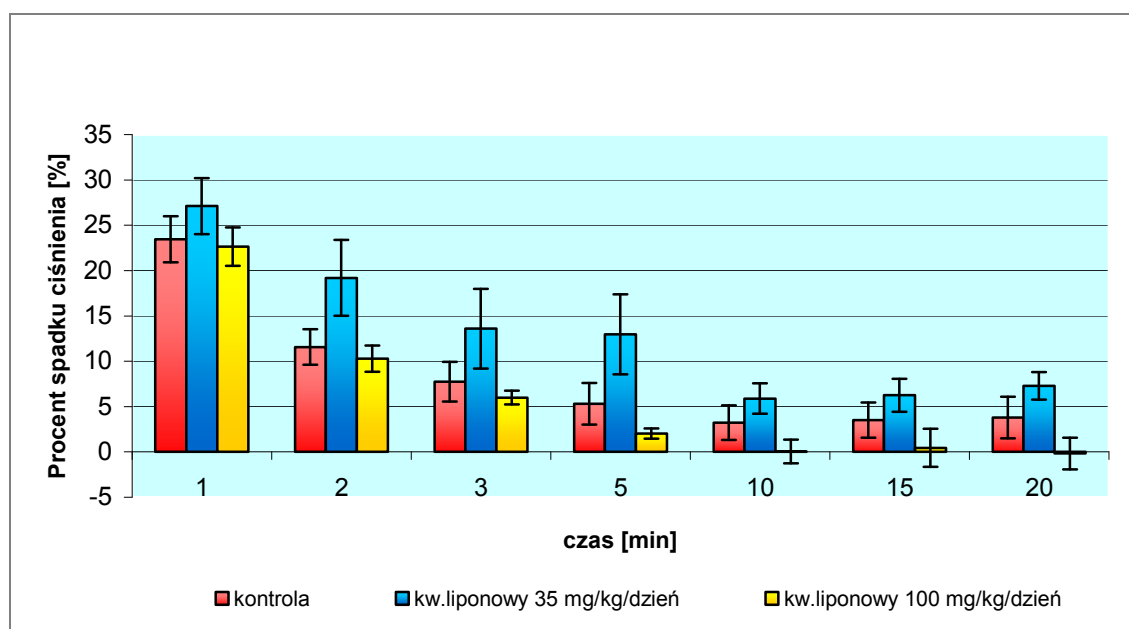


Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce 150 µg/kg m.c.; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$.

6. Wpływ kwasu α -liponowego na efekt hipotensyjny nitrogliceryny

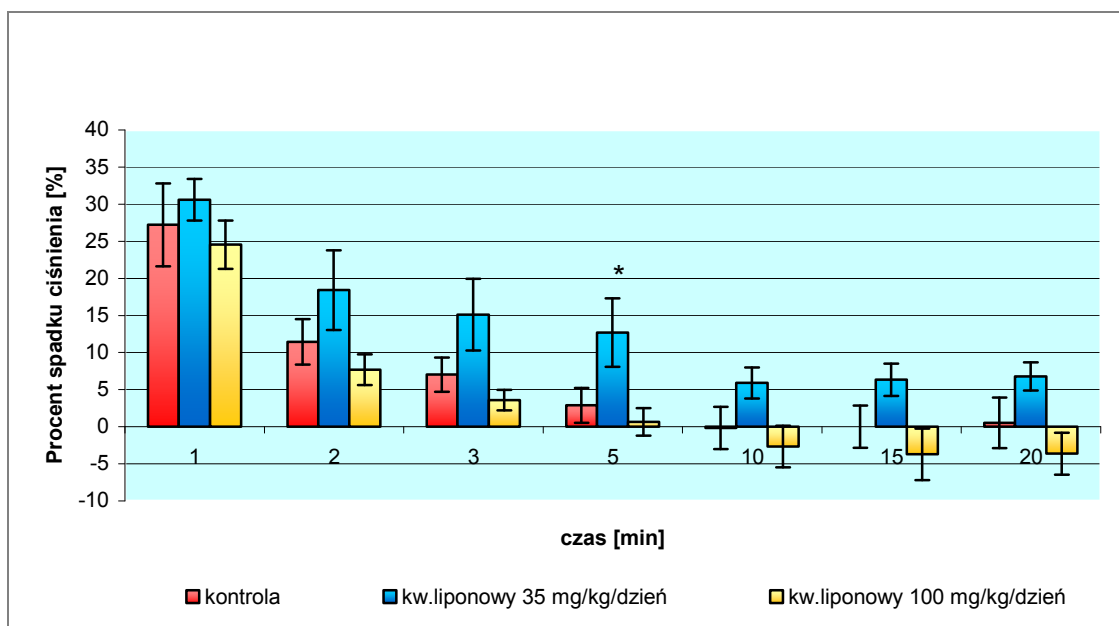
W obu grupach, w których podawano zwierzętom przez 8 dni tylko kwas α -liponowy, odpowiednio w dawkach 35 mg/kg m.c./dzień oraz 2 x 50 mg/kg m.c./dzień – grupa 6 i grupa 8, nie obserwowano wpływu na efekt hipotensyjny podawanej dożylnie nitrogliceryny. Nie było istotnych statystycznie różnic spadków ciśnienia tętniczego w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa 1), (Wykresy 7, 8, 9, 10).

Wykres 7. Spadki skurczowego ciśnienia tętniczego krwi po podawaniu kwasu α -liponowego przez 8 dni (grupa 6 i grupa 8), po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu (150 μ g/kg m.c.).



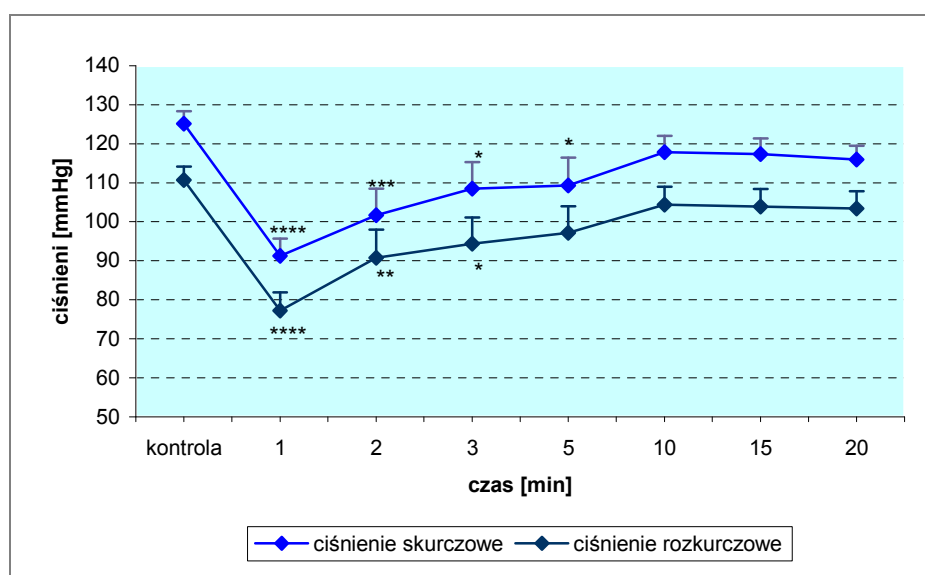
Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie;

Wykres 8. Spadki rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi po podawaniu kwasu α -liponowego przez 8 dni (grupa 6 i grupa 8), po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu ($150 \mu\text{g/kg m.c.}$).



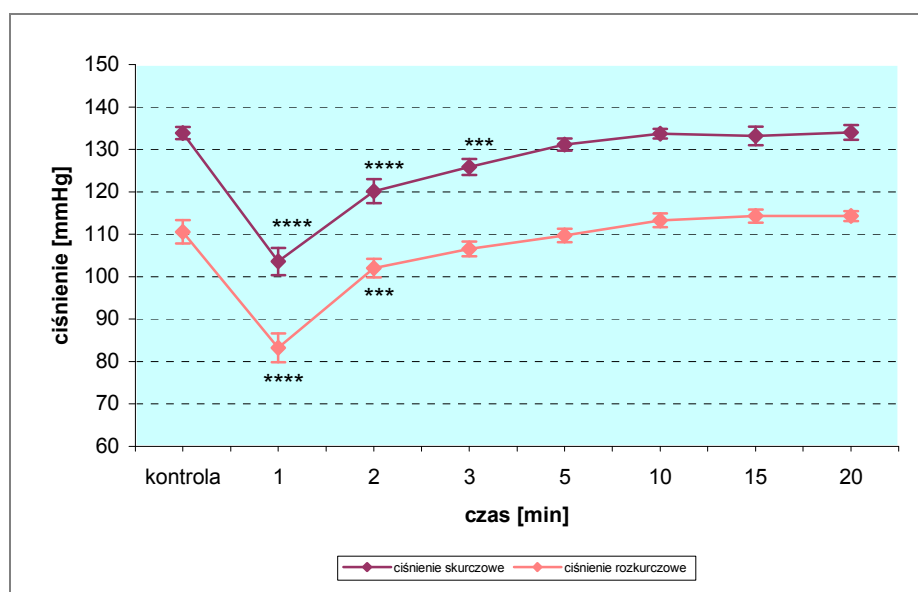
Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamionna w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce $150 \mu\text{g/kg m.c.}$; * $p<0.05$.

Wykres 9. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, u szczurów w grupie 6 (KL35).



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamionna w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce $150 \mu\text{g/kg m.c.}$; * $p<0.05$; ** $p<0.02$; *** $p<0.01$; **** $p<0.001$.

Wykres 10. Ciśnienie tętnicze krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dziewiątym dniu, u szczurów w grupie 8 (KL100).

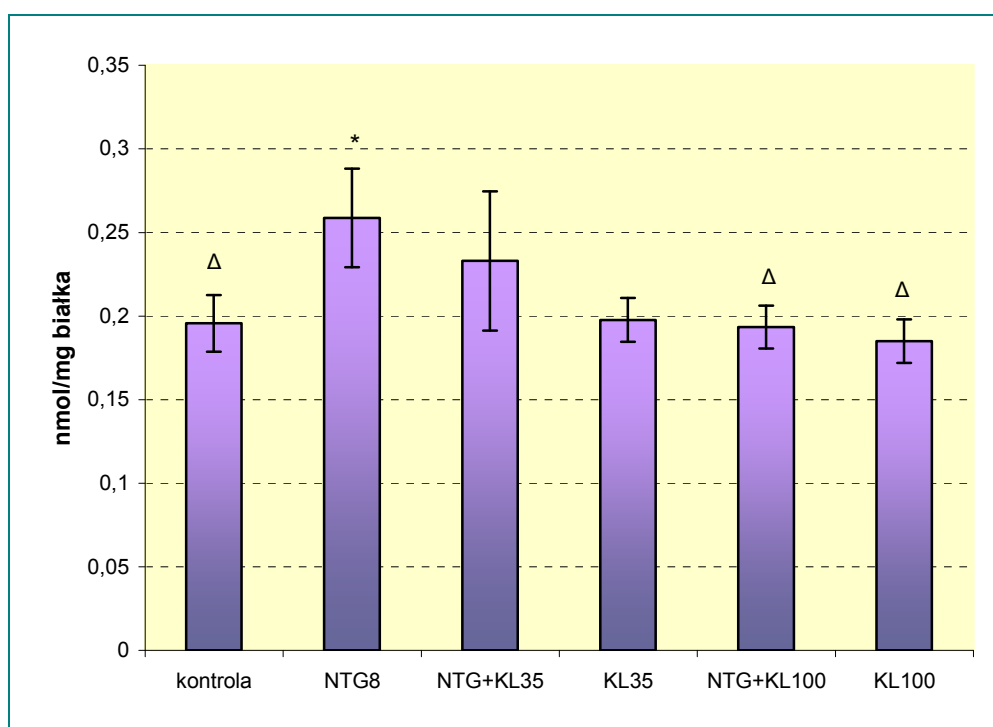


Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do ciśnienia kontrolnego zmierzonego przed podaniem nitrogliceryny i.v. w dawce 150 $\mu\text{g/kg}$ m.c.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$.

7. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na procesy peroksydacyjne oraz enzymy antyoksydacyjne w aortach, osoczu i sercach szczurów

Stężenie RFT w aortach zwierząt w grupie kontrolnej oznaczono na poziomie 0,19575 nmoli/mg białka. W grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę (NTG8) stężenie RFT w aortach istotnie statystycznie wzrosło w porównaniu do stężenia kontrolnego. Kwas α -liponowy obniżał stężenie RFT w aortach, (Wykres 11).

Wykres 11. Stężenia RTF w aortach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) - Δ ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

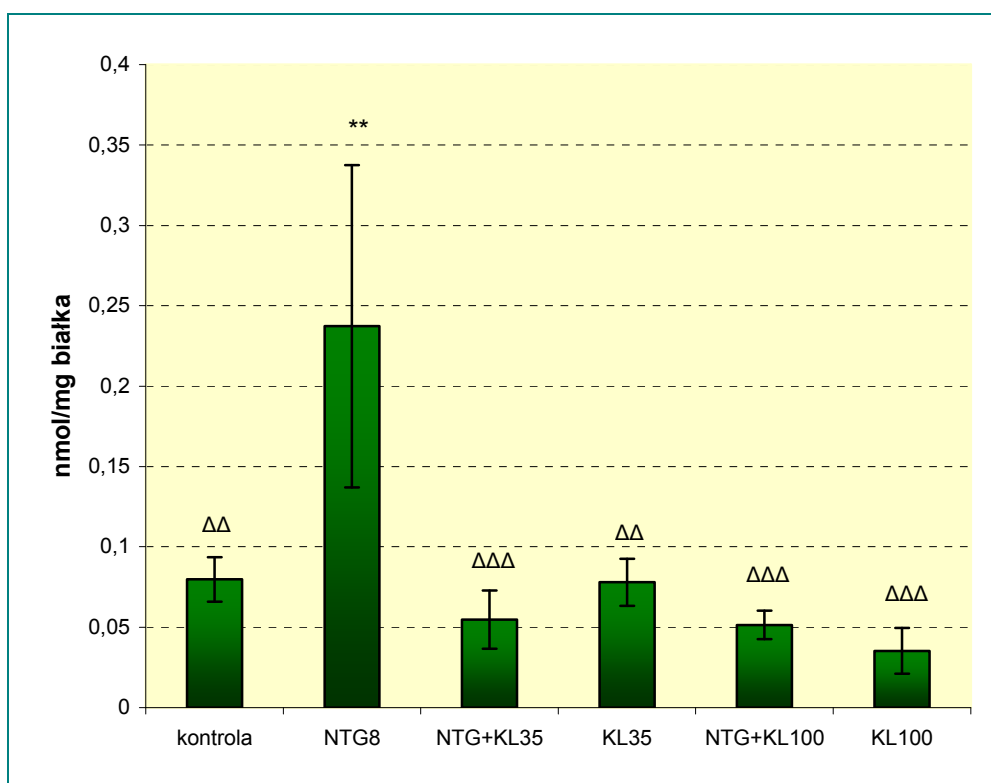
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziom stężenie MDA istotnie statystycznie wzrósł w osoczu, w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę (NTG8), w stosunku do stężenia w grupie kontrolnej, (Wykres 12). Stężenie MDA w grupie kontrolnej w osoczu oznaczono na poziomie 0,08 nmola/mg białka. W grupie NTG8 stężenie MDA znamienne statystycznie wzrosło w porównaniu do kontroli i stanowiło średnio 298% stężenia kontrolnego. W grupach, które otrzymywały nitroglicerynę i kwas α -liponowy przez 8 dni (NTG+KL35 i NTG+KL100), nie dochodziło do istotnego statystycznie wzrostu stężeń MDA w osoczu. We wszystkich grupach zwierząt otrzymujących kwas α -liponowy poziomy stężenie MDA w osoczu były porównywalne z poziomem w grupie kontrolnej.

Wykres 12. Stężenia MDA w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) - Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

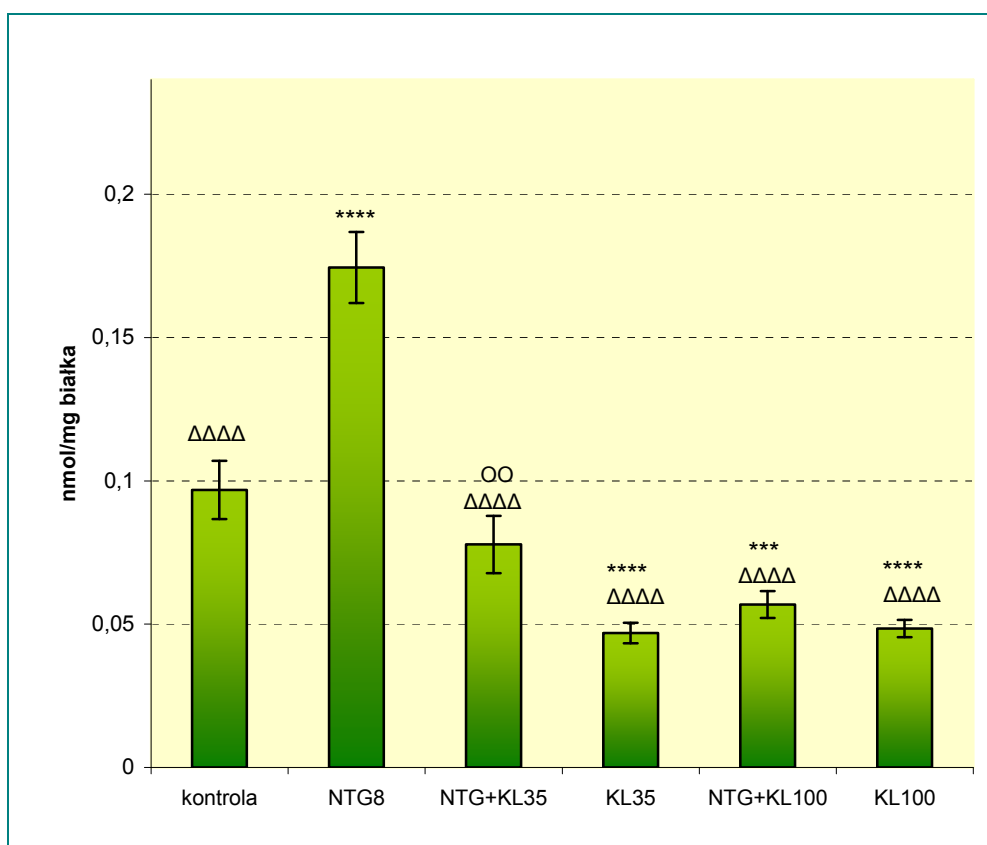
KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziomy stężenie MDA oraz RFT istotnie statystycznie wzrosły w sercach, w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę (NTG8), w stosunku do stężenia w grupie kontrolnej, (Wykresy 13 i 14).

Poziom stężenie MDA w sercach szczurów w grupie kontrolnej wynosił średnio 0,09678 nmoli/mg białka. W grupie NTG8 wzrósł o 45% i wyniósł średnio 0,17447 nmola/mg białka. Podawanie kwasu α -liponowego prowadziło do statystycznie znaczącego spadku poziomów stężenia MDA w stosunku do poziomu w tolerancji, we wszystkich grupach, które go otrzymywały. W grupie NTG+KL35, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, stężenie MDA było porównywalne do stężenia kontrolnego. Procentowy spadek stężenia w tej grupie w porównaniu do stężenia w

grupie z tolerancją wynosił 55%. W grupie NTG+KL100, która otrzymywała równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień, stężenie MDA było istotnie statystycznie niższe w porównaniu z grupami: NTG8 oraz kontrolną. Poziom stężenia MDA w tej grupie wynosił 59% poziomu kontrolnego. Także w grupach KL35 i KL100, które były otrzymywały tylko kwas α -liponowy doszło do istotnego statystycznie spadku stężeń MDA w sercach, w porównaniu z grupami: kontrolną i NTG8.

Wykres 13. Stężenia MDA w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; * p <0.05; ** p <0.02; *** p <0.01; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

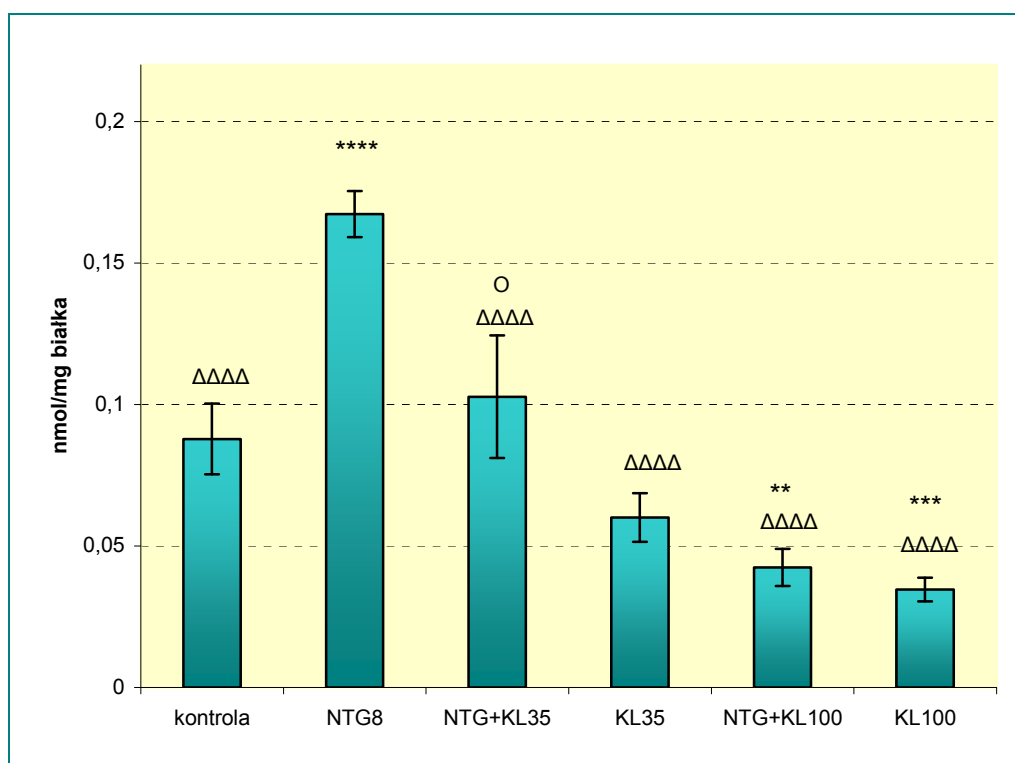
NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Wykres 14. Stężenia RFT w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

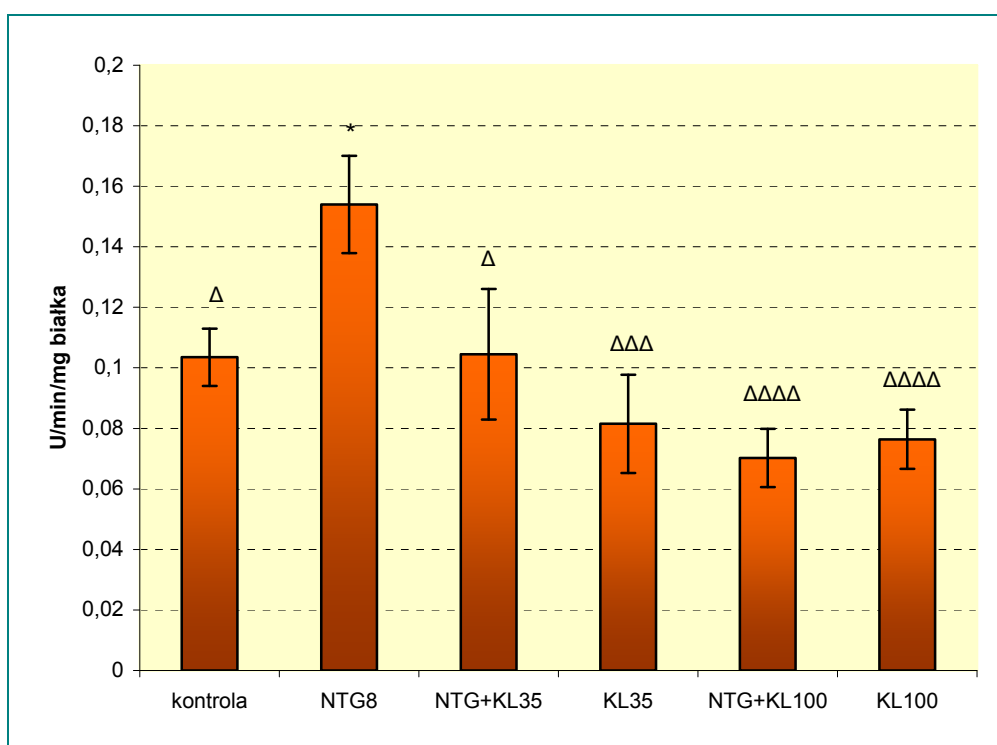
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie RFT w sercach szczurów z grupy kontrolnej wynosiło średnio 0,0878 nmola/mg białka. W grupie NTG8, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę, poziom tego stężenia istotnie statystycznie wzrósł i wynosił 190% poziomu kontrolnego, (Wykres 14). W grupie NTG+KL35, kwas α -liponowy podawany równolegle z nitrogliceryną obniżył poziom RFT do poziomu kontrolnego. Natomiast w grupie NTG+KL100, gdzie kwas α -liponowy był podawany równolegle z nitrogliceryną w większej dawce (2 x 50 mg/kg m.c./dzień) stężenie RFT spadło znamienne statystycznie w porównaniu z grupą NTG8 oraz z grupą kontrolną. Podobny poziom stężenia RFT oznaczono w grupie KL100, która otrzymywała tylko kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień.

Aktywność peroksydazy glutationowej w aortach szczurów w grupie kontrolnej oznaczono na poziomie 0,1035 U/min/mg białka, (Wykres 15). U zwierząt, u których rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę aktywność tego enzymu w aortach istotnie statystycznie wzrosła w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej (ok. 149% poziomu kontrolnego). Kwas α -liponowy istotnie statystycznie obniżał poziom tego enzymu w aortach szczurów w porównaniu do grupy NTG8. Spadek aktywności w grupach otrzymujących równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w porównaniu do grupy NTG8 wynosił ok. 32 i 54, odpowiednio w grupie NTG+KL35 i NTG+KL100.

Wykres 15. Aktywność peroksydazy glutationowej w aortach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * p <0.05; ** p <0.02; *** p <0.01; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

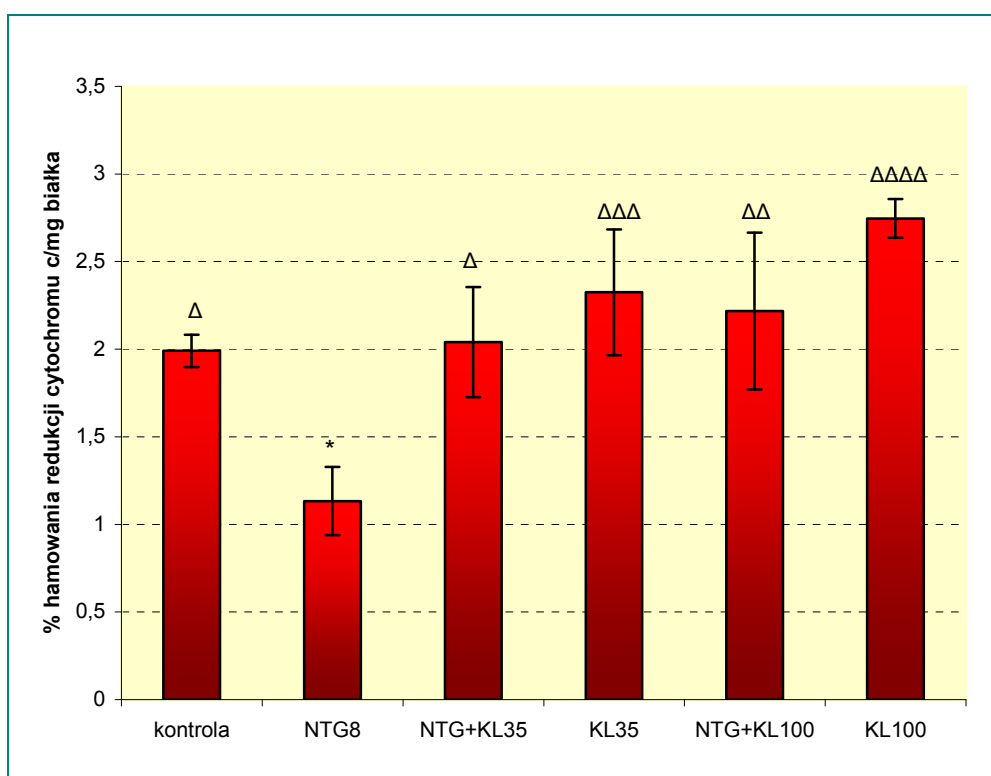
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Procent hamowania redukcji cytochromu c, a więc także aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w aortach był znamienne statystycznie niższy w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej, (Wykres 16). W grupach, które otrzymywały kwas α -liponowy równolegle z nitrogliceryną, procent hamowania redukcji cytochromu c był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do procentu hamowania redukcji cytochromu c w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę. W grupach, którym podawano kwas α -liponowy aktywność SOD nie różniła się istotnie statystycznie od aktywności w kontroli.

Wykres 16. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w aortach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

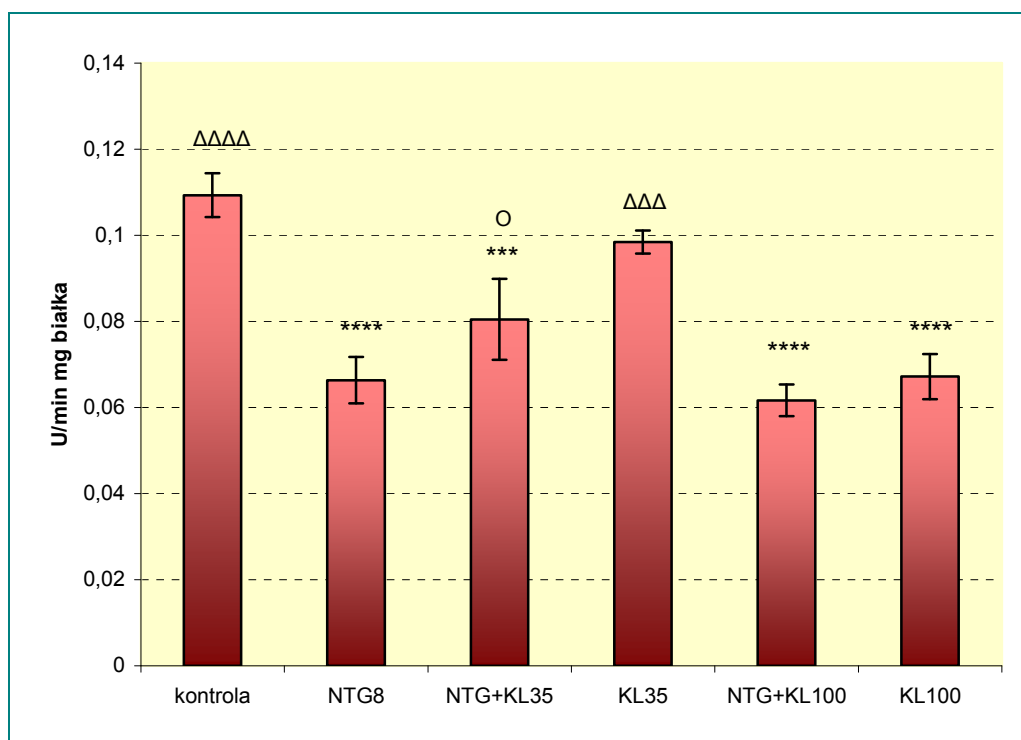
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu szczurów w grupie kontrolnej oznaczono na poziomie 0,109 U/min/mg białka, (Wykres 17). W grupie NTG8, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę, aktywność tego enzymu w osoczu była istotnie statystycznie obniżona w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej (ok. 60% aktywności kontrolnej). W grupie NTG+KL35, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, aktywność tego enzymu w osoczu także była znamienne statystycznie obniżona w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej (ok. 74% aktywności kontrolnej). W grupie KL35, której podawano tylko kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, aktywność peroksydazy glutationowej nie różniła się istotnie statystycznie w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej, ale była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do aktywności w grupie NTG8 oraz w grupie NTG+KL35. W obu grupach, które otrzymywały kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni (NTG+LA100 i LA100), aktywność peroksydazy glutationowej była istotnie statystycznie obniżona w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej. Aktywności w tych grupach oznaczono na poziomach 0,062 i 0,067 U/min/mg białka, odpowiednio w grupie NTG+LA100 i LA100, co stanowiło 56,4 i 62,5% poziomu aktywności kontrolnej.

Aktywności katalazy w osoczu szczurów w grupach: kontrolnej, z tolerancją na nitroglicerynę oraz otrzymującej nitroglicerynę i kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, nie różniły się istotnie statystycznie, (Wykres 18). W grupach, którym podawano tylko kwas α -liponowy oraz w grupie NTG+KL100, otrzymującej równolegle z nitrogliceryną kwasem α -liponowym w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień, aktywność tego enzymu w osoczu była wyższa w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej. W grupie 8, aktywność była istotnie statystycznie podwyższona i wynosiła 234,4% poziomu aktywności w grupie kontrolnej.

Wykres 17. Aktywność peroksydazy glutationowej w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

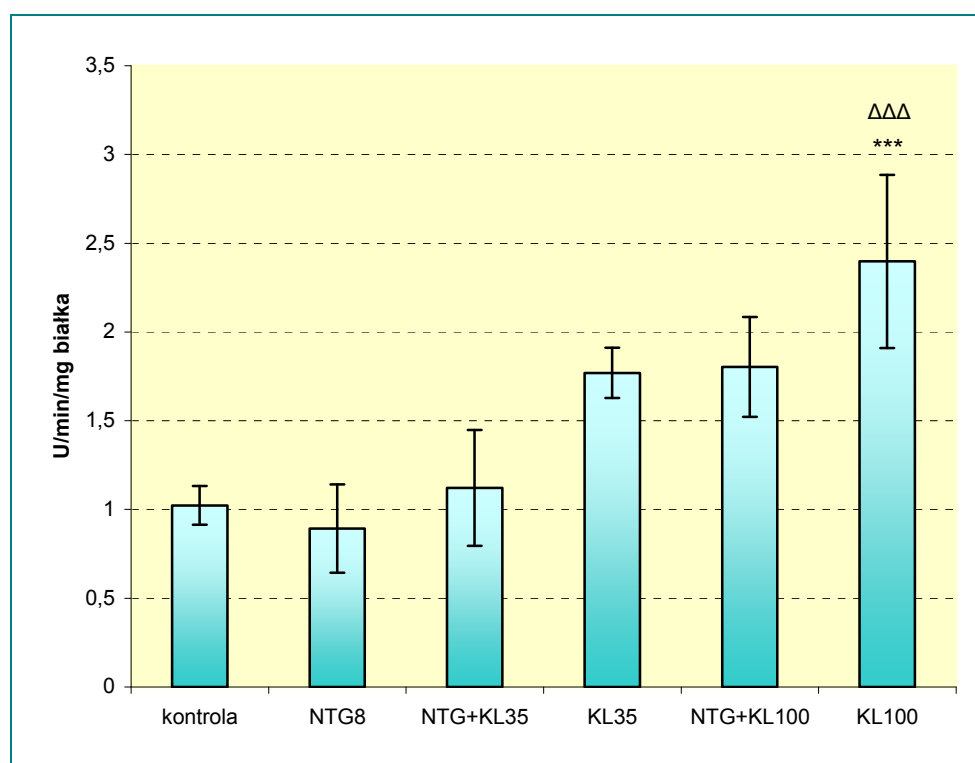
NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Wykres 18. Aktywność katalazy w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; *** p <0.01;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

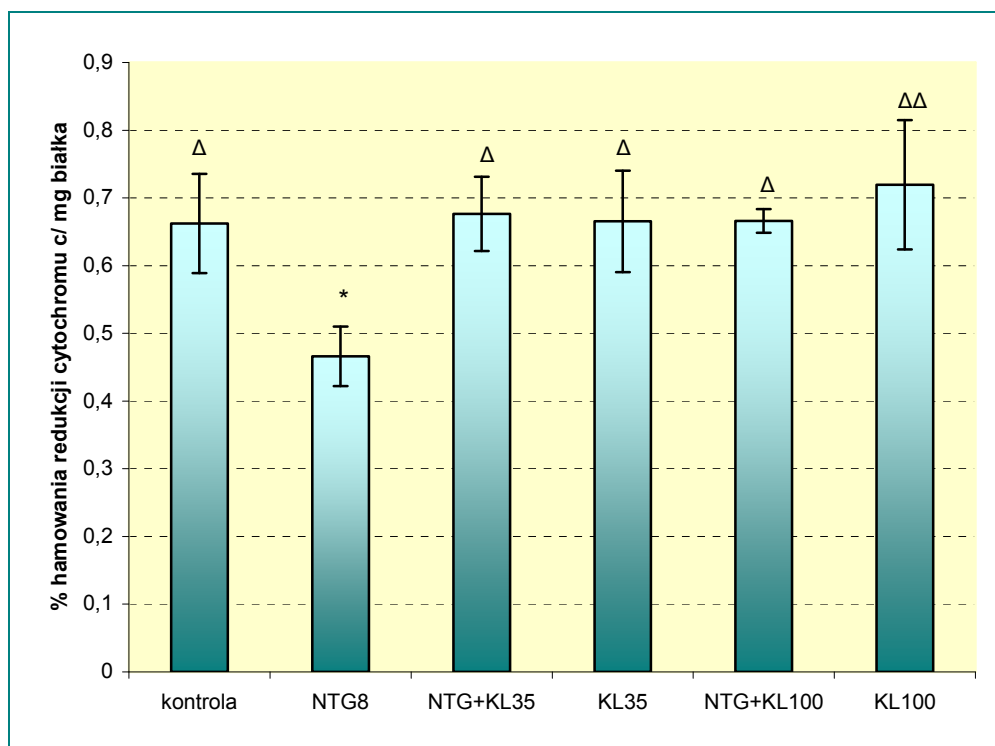
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Procent hamowania redukcji cytochromu c, a więc i aktywność dysmutazy nadrodnikowej w osoczu szczurów istotnie statystycznie obniżył się w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę, w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej, (Wykres 19). W pozostałych grupach nie było różnic w porównaniu do kontroli. W grupach, którym podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy aktywność SOD była istotnie statystycznie podniesiona w porównaniu do grupy NTG8 i nie różniła się znamienne statystycznie w porównaniu do kontroli.

Wykres 19. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

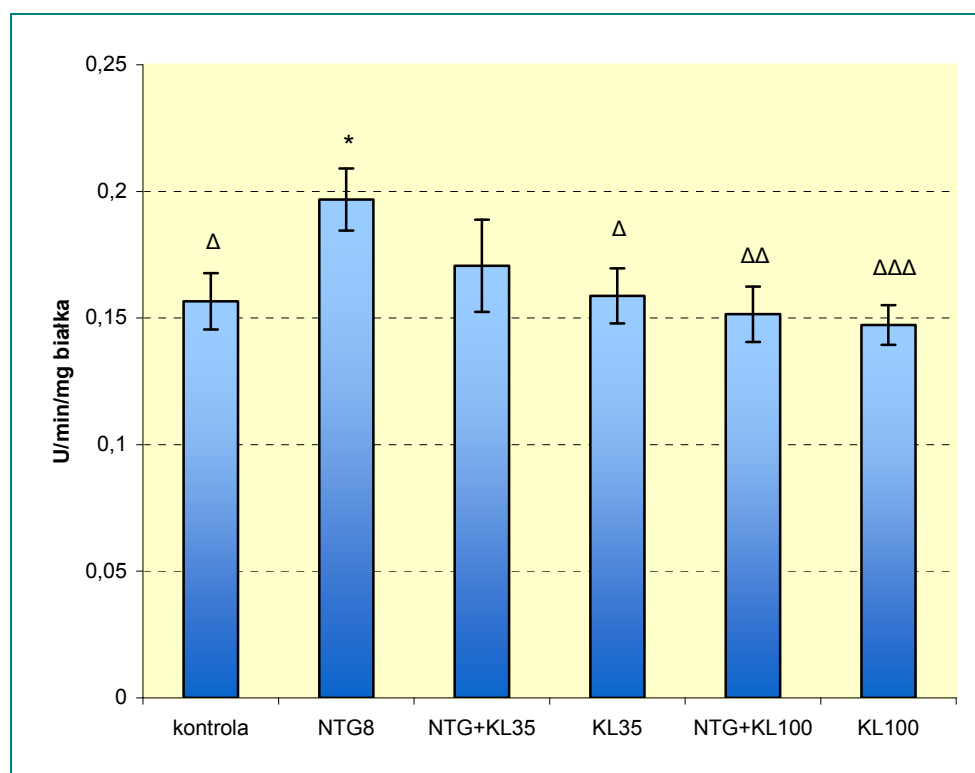
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność peroksydazy glutationowej w sercach szczurów w grupie kontrolnej oznaczono na poziomie 0,1566 U/min/mg białka, (Wykres 20). W grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę aktywność tego enzymu w sercach szczurów wzrosła o ok. 26% w porównaniu do poziomu kontrolnego. Takiego istotnego statystycznie wzrostu nie obserwowano w grupie NTG+KL35, której równolegle z nitrogliceryną podawano kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień. Poziom aktywności peroksydazy glutationowej w tej grupie wynosił ok. 109% poziomu aktywności oznaczonego w grupie kontrolnej. Różnica aktywności tego enzymu w sercach pomiędzy grupami NTG+KL35 oraz NTG8 (tolerancja) nie była znamienne statystycznie. W pozostałych grupach aktywność peroksydazy glutationowej w sercach szczurów nie różniła się znamienne statystycznie w porównaniu z

aktywnością w grupie kontrolnej i stanowiła odpowiednio 101, 97 i 94% poziomu oznaczonego w kontroli, odpowiednio w grupie KL35, NTG+KL100 i KL100.

Wykres 20. Aktywności peroksydazy glutationowej w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

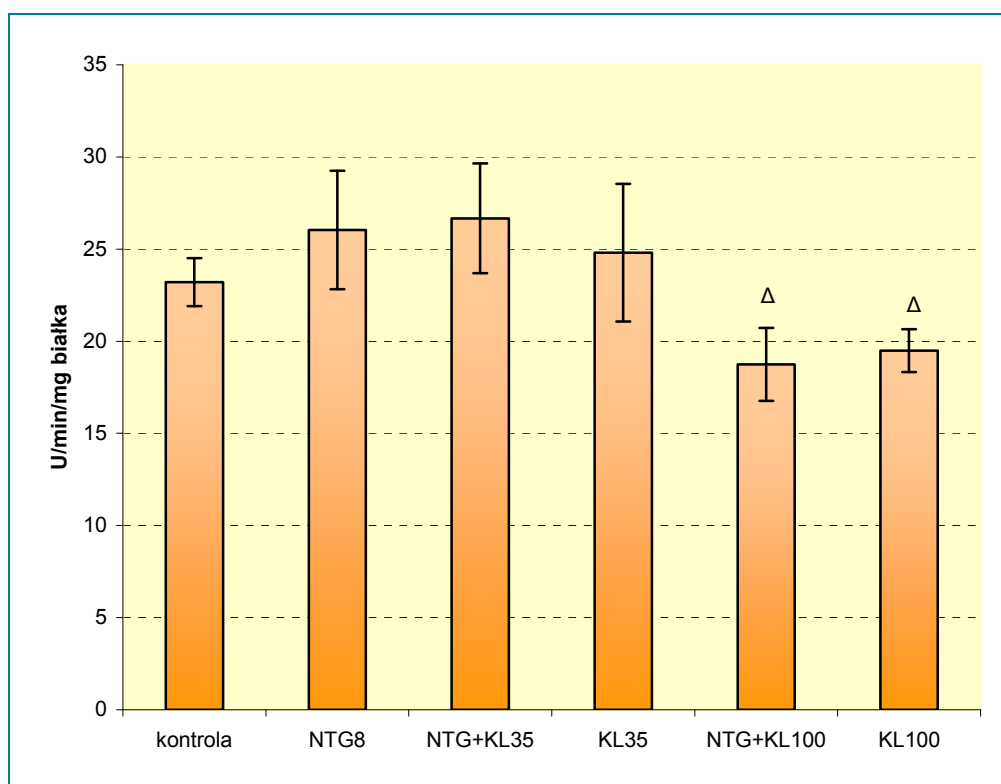
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność katalazy w sercach szczurów nieznacznie wzrosła w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę, w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej. Wzrost ten nie był jednak znamieny statystycznie, (Wykres 21). Aktywność katalazy istotnie statystycznie spadła u szczurów otrzymujących przez 8 dni kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień (grupy: NTG+KL100 i KL100), w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę.

Wykres 21. Aktywność katalazy w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * $p < 0.05$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

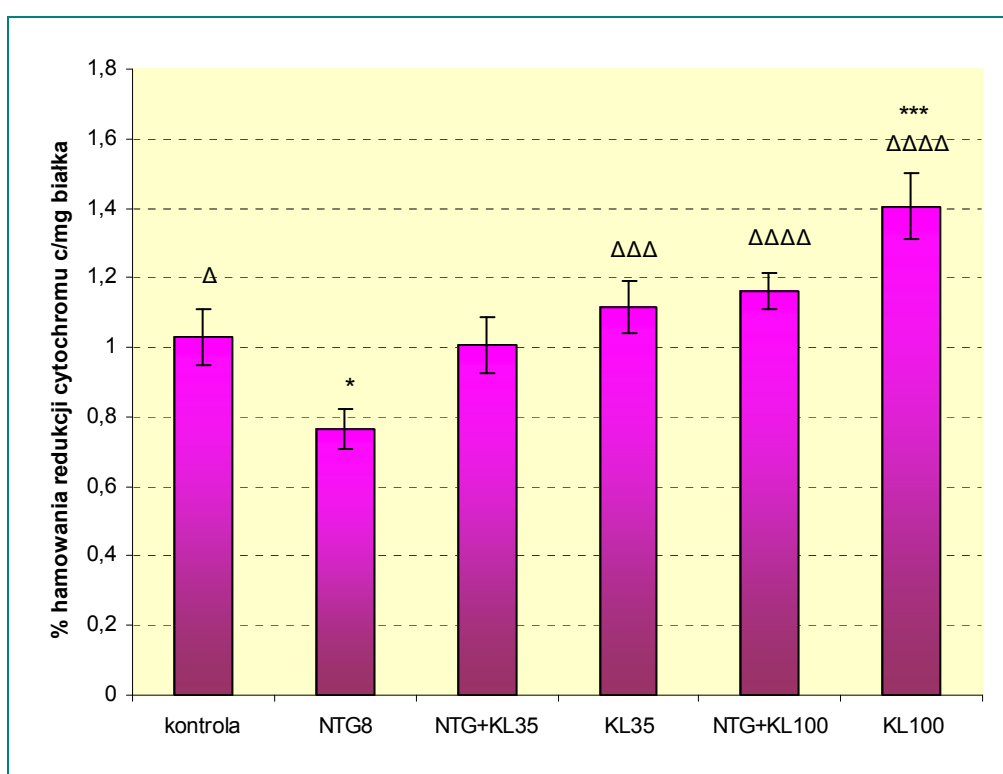
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W sercach szczurów, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej istotnie statystycznie spadła w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę w porównaniu do kontroli, (Wykres 22). Procenty hamowania redukcji cytochromu c w grupie KL35, leczonej samym kwasem α -liponowym w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, w grupie NTG+KL100 – otrzymującej równoległe z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 2x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni i w grupie KL100 – której podawano tylko kwas α -liponowy w tej samej dawce istotnie statystycznie wzrosły w porównaniu do grupy NTG8.

Wykres 22. Aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

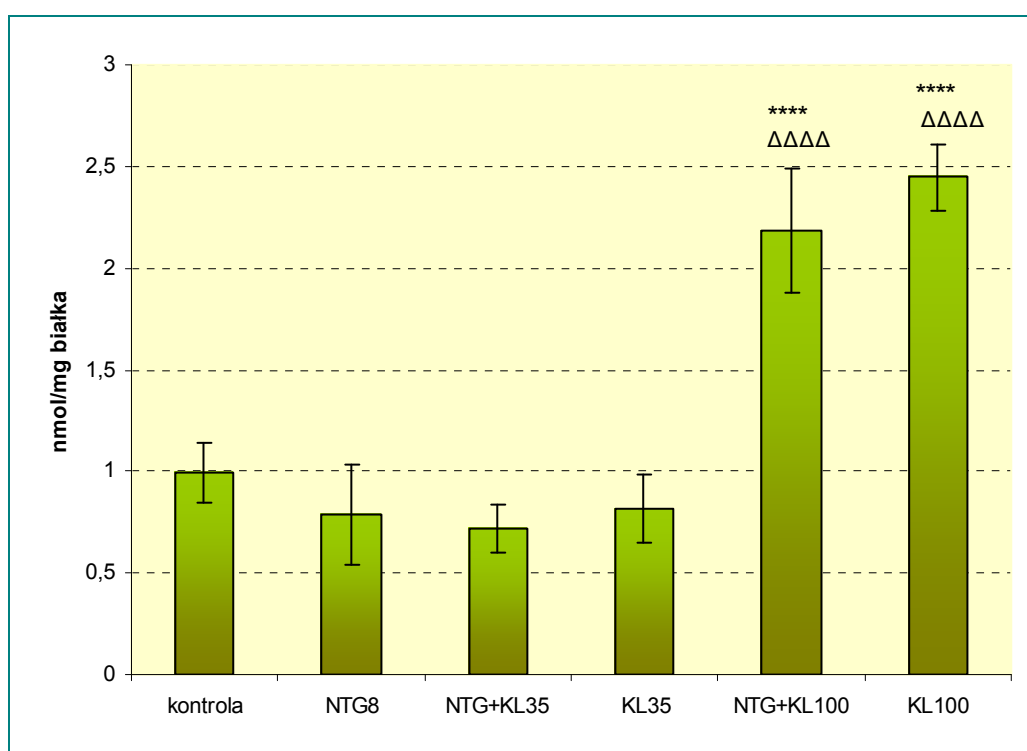
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

8. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny oraz kwasu α -liponowego na poziom tioli niebiałkowych, aktywność S-transferazy glutationowej oraz aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w osoczu oraz sercach szczurów

Stężenia tioli niebiałkowych w osoczu szczurów w grupach: kontrolnej, z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę oraz otrzymujących kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, nie różniły się istotnie statystycznie od siebie, (Wykres 23). W grupach, którym podawano kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień, stężenia tioli niebiałkowych istotnie statystycznie wzrosły w porównaniu do grupy kontrolnej i wynosiły odpowiednio 220,5 i 247,2% stężenia kontrolnego.

Wykres 23. Poziomy stężenie tioli niebiałkowych w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; ****P<0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

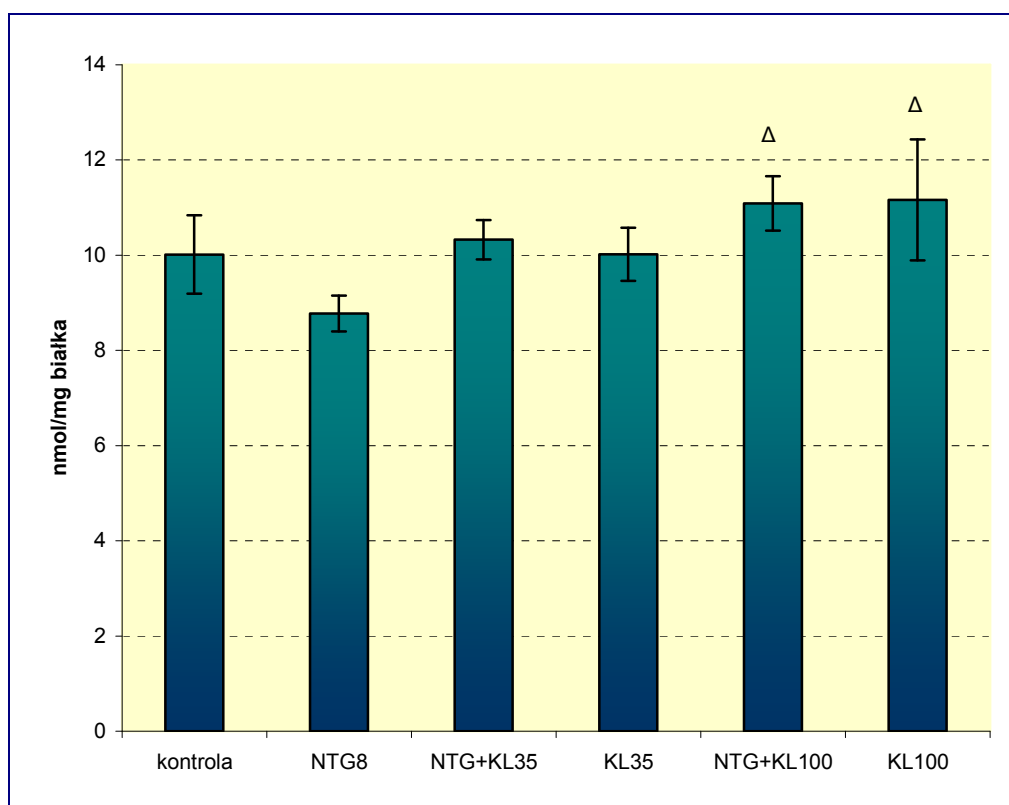
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W sercach, poziom stężenia tioli niebiałkowych w grupie NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę – spadł w stosunku do stężenia w grupie kontrolnej, spadek ten był jednak nie znamieny statystycznie, (Wykres 24). W grupach otrzymujących kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg/dzień przez 8 dni, poziom stężenia tioli niebiałkowych wzrósł istotnie statystycznie w stosunku do grupy z tolerancją.

Wykres 24. Poziomy stężenie tioli niebiałkowych w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * $p < 0.05$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

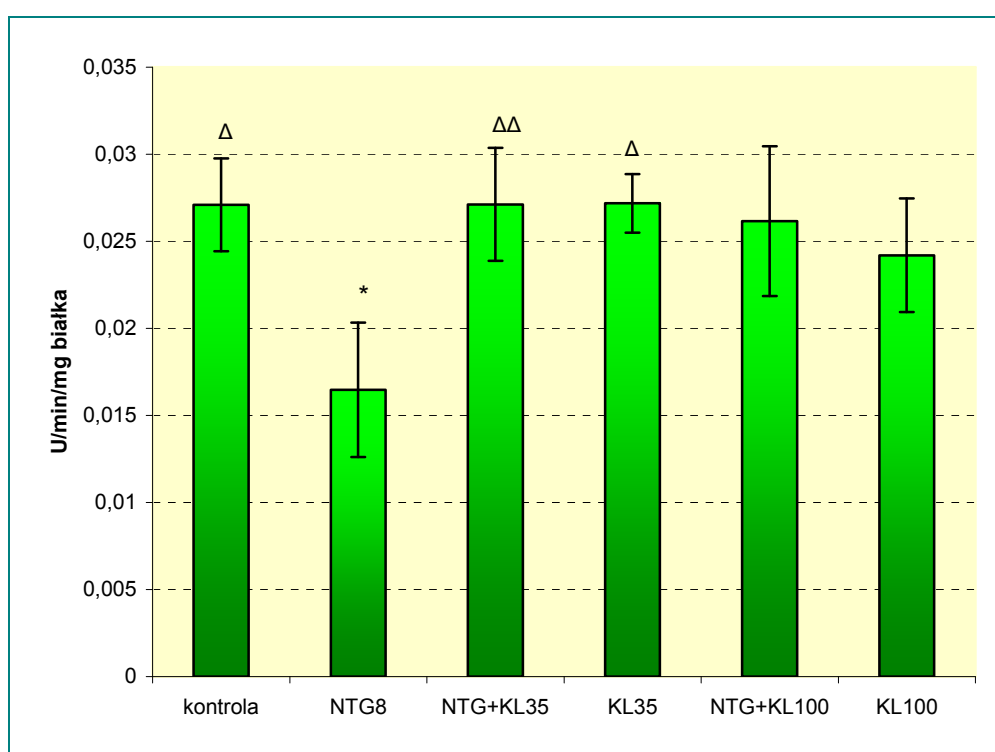
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność S-transferazy glutationowej w osoczu szczurów z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej (o 39,2%), (Wykres 25). W pozostałych grupach poziom aktywności tego enzymu w sercach nie różnił się istotnie statystycznie od aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej.

Wykres 25. Poziomy aktywności S-transferazy glutationowej w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

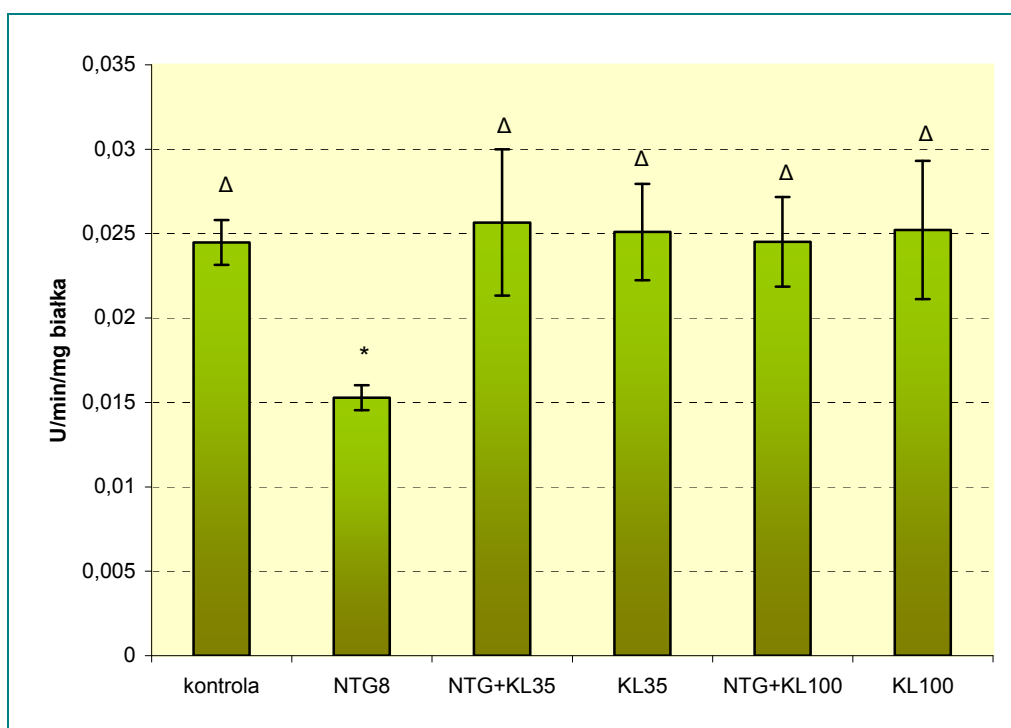
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność S-transferazy glutationowej w sercach szczurów z rozwiniętą tolerancją była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej (o 37,5%), (Wykres 26). W pozostałych grupach poziom aktywności tego enzymu w sercach nie różnił się istotnie statystycznie od aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej.

Wykres 26. Poziomy aktywności S-transferazy glutationowej w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

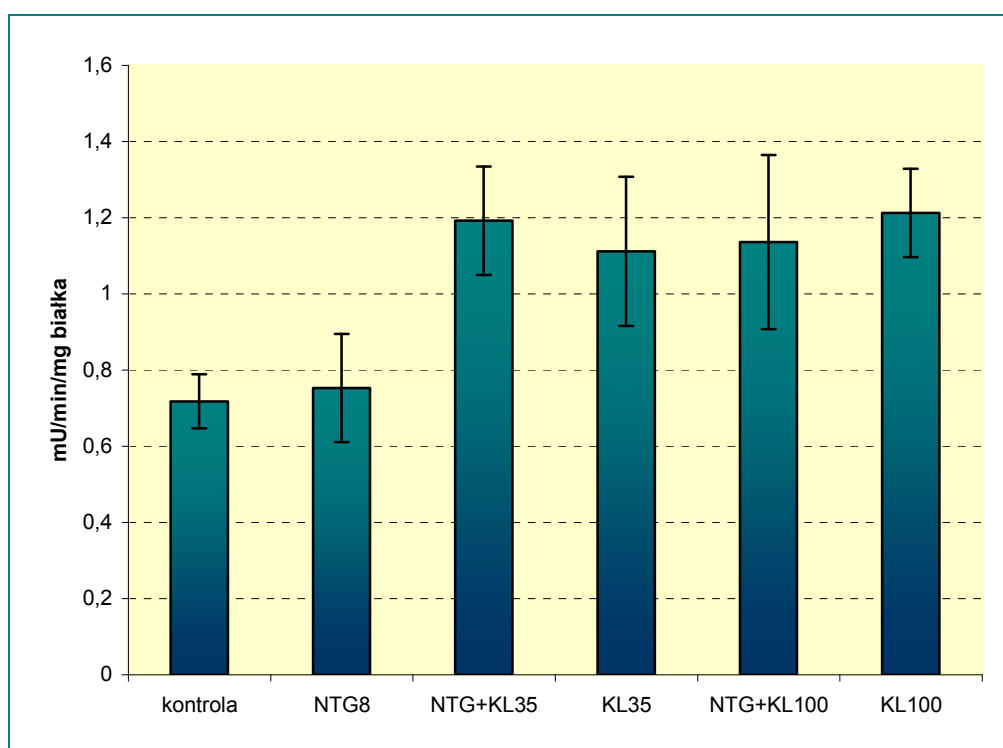
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w osoczu szczurów nie różniła się istotnie statystycznie w poszczególnych grupach, (Wykres 27). Jednak aktywność tego enzymu w osoczu szczurów, które otrzymywały kwas α -liponowy była wyższa w porównaniu do grup, gdzie kwas ten nie był podawany. Aktywność w tych grupach była wyższa w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej o 66,1; 54,9; 58,2 i 68,9%, odpowiednio w grupie NTG+KL35, KL35, NTG+KL100 i KL100.

Wykres 27. Poziomy aktywności γ -glutamylotranspeptydazy w osoczu w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

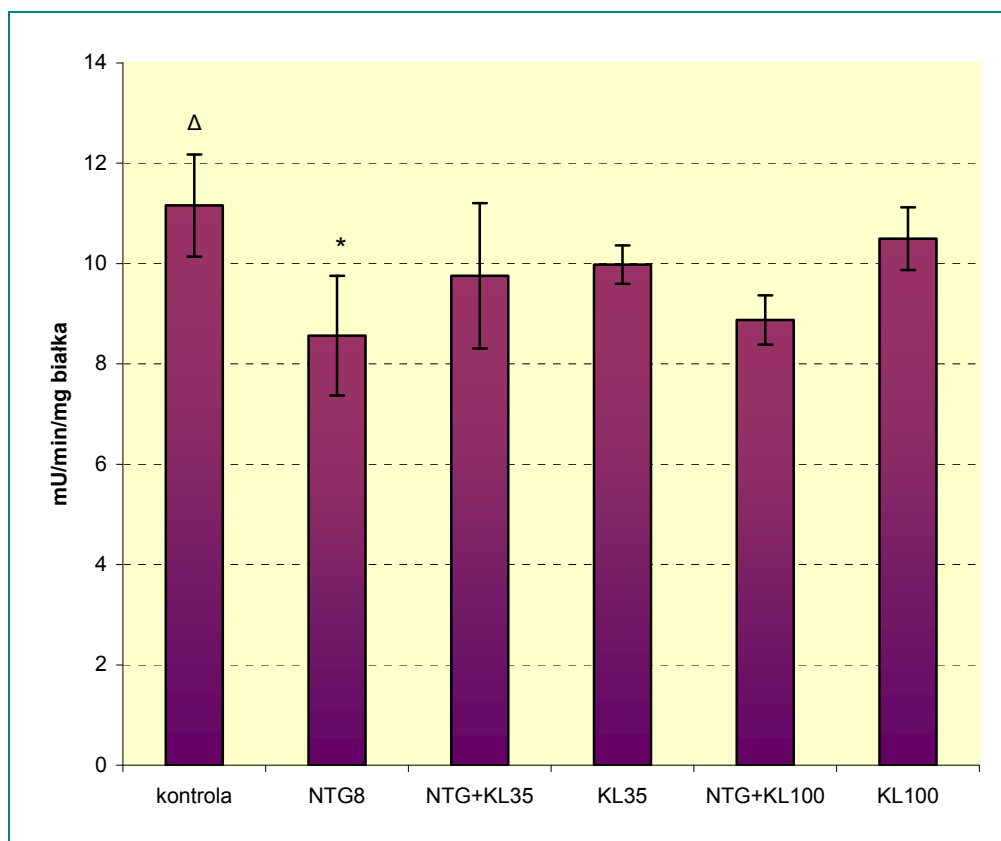
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w sercach szczurów z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do aktywności oznaczonej w grupie kontrolnej, (Wykres 28). W pozostałych grupach aktywność nie różniła się statystycznie w porównaniu do aktywności kontrolnej.

Wykres 28. Poziomy aktywności γ -glutamylotranspeptydazy w sercach w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * $p < 0.05$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

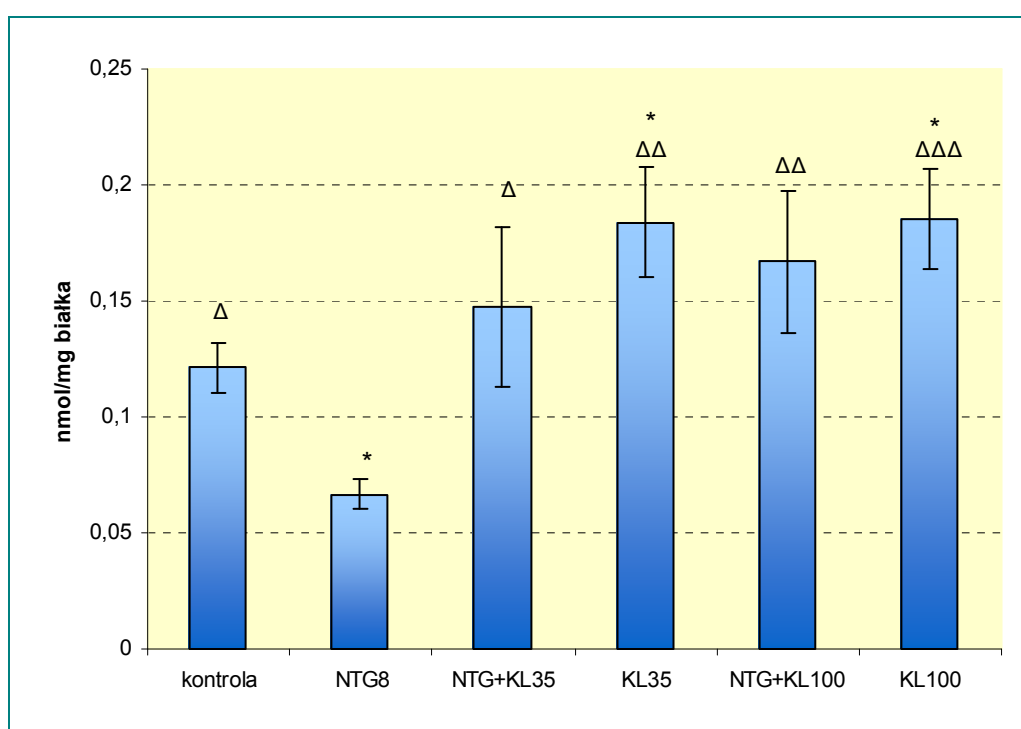
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

9. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom tlenku azotu (NO) w aortach, osoczu i sercach oraz S-nitrozotioili w osoczu i sercach szczurów

Stężenie azotanów III i V w grupie kontrolnej w aortach szczurzych oznaczono na poziomie 0,12125 nmola/mg białka, (Wykres 29). W grupie, w której doszło do rozwoju tolerancji na nitroglicerynę stężenie było znamienne statystycznie niższe. W grupach otrzymujących kwas α -liponowy, zarówno sam, jak i równoległe z nitrogliceryną stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu azotanów III i V w aortach, w porównaniu do grupy NTG8. A w grupach, którym podawano tylko kwas α -liponowy także do grupy kontrolnej.

Wykres 29. Stężenia tlenku azotu (azotany III i V) w aortach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

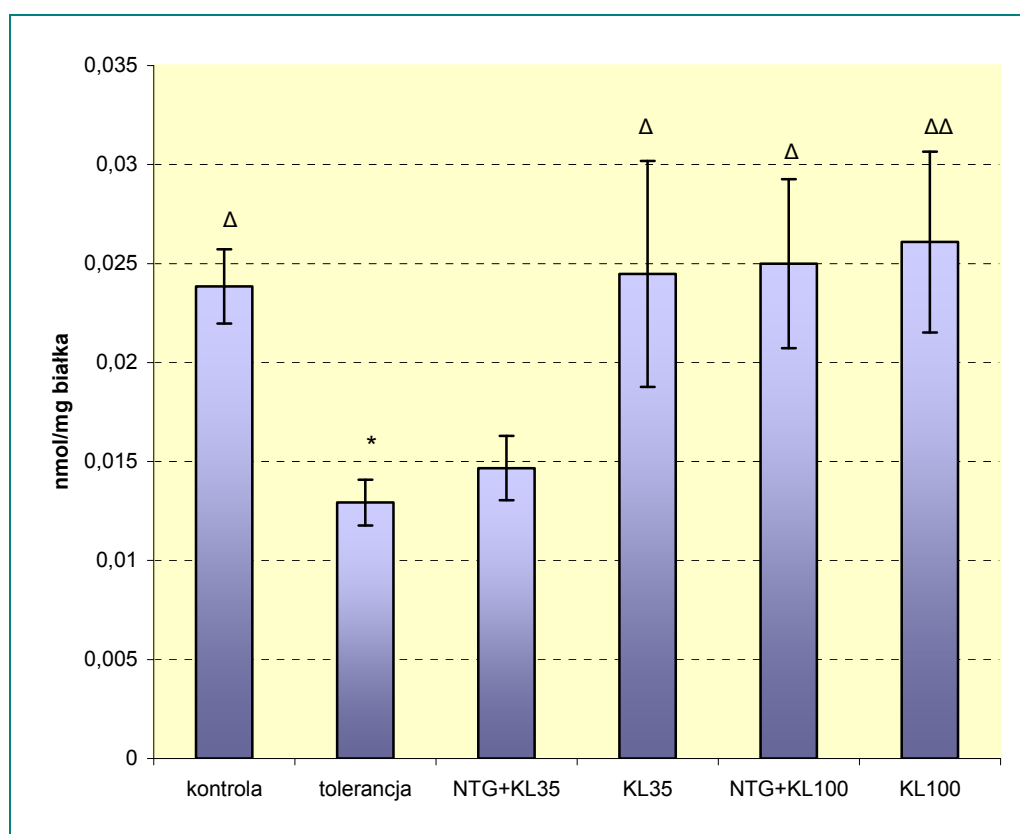
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie azotanów III i V w osoczu szczurów z grupy kontrolnej oznaczono na poziomie 0,02385 nmola/mg białka, (Wykres 30). W grupie NTG8 (tolerancja na nitroglicerynę) oraz NTG+KL35 stężenia były niższe, i wynosiły odpowiednio 0,01293 i 0,01467 nmola/mg białka, co stanowiło znamiennej statystycznie spadek w porównaniu do stężenia kontrolnego o 45,8% w grupie NTG8 i nieznamienny spadek w grupie NTG+KL35. W pozostałych trzech grupach (KL35, NTG+KL100 i KL100) stężenia azotanów w aortach były zbliżone do stężenia w grupie kontrolnej i wynosiły odpowiednio 102,6%, 104,8% oraz 109,4%.

Wykres 30. Stężenia tlenku azotu (azotany III i V) w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

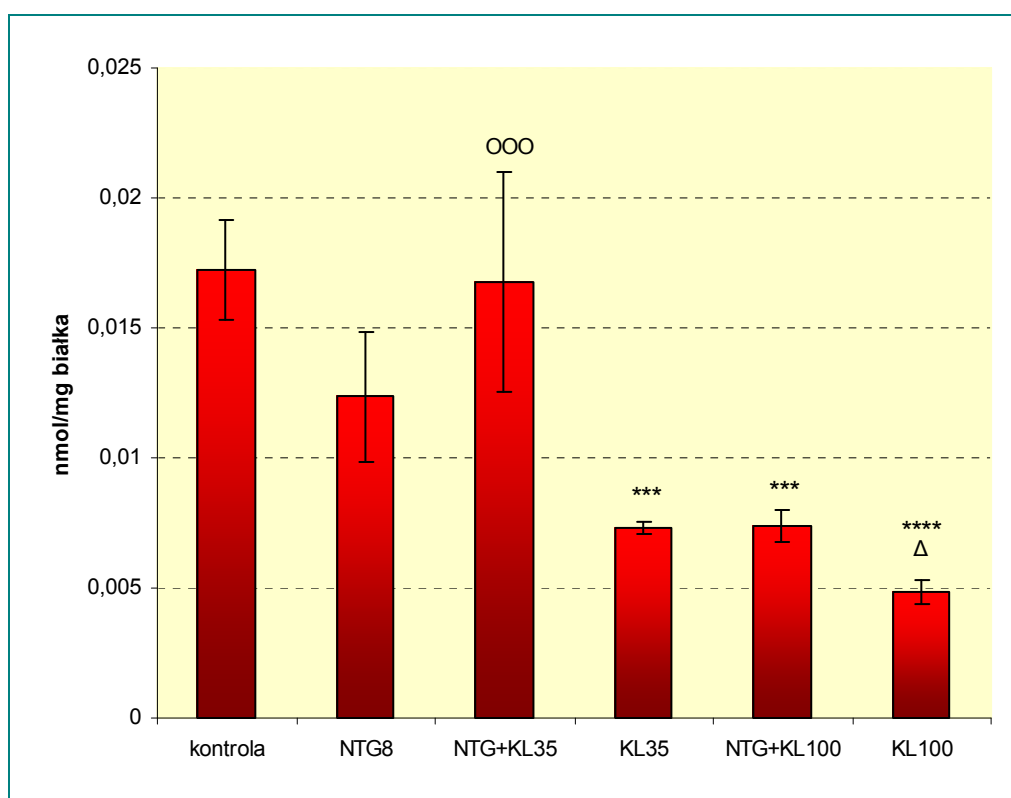
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W sercach szczurów kontrolnych, stężenie azotanów III i V oznaczono na poziomie 0,01725 nmola/mg białka, (Wykres 31). W grupie, w której doszło do rozwoju tolerancji na nitroglicerynę stężenie spadło do poziomu 0,01245 nmola/mg białka (72,2% kontroli), jednak ta zmiana nie była znamienne statystycznie. W grupie NTG+KL35, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień, stężenie azotanów III i V w sercach nie różniło się istotnie od stężenia w grupie kontrolnej (97,3%). Natomiast w pozostałych grupach oznaczono znamienno statystycznie spadek stężeń azotanów III i V w sercach w porównaniu do grupy kontrolnej, odpowiednio o 57,6%, 57,2% i 72,1%, dla grupy KL35, NTG+KL100 i KL100.

Wykres 31. Stężenia tlenku azotu (azotany III i V) w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

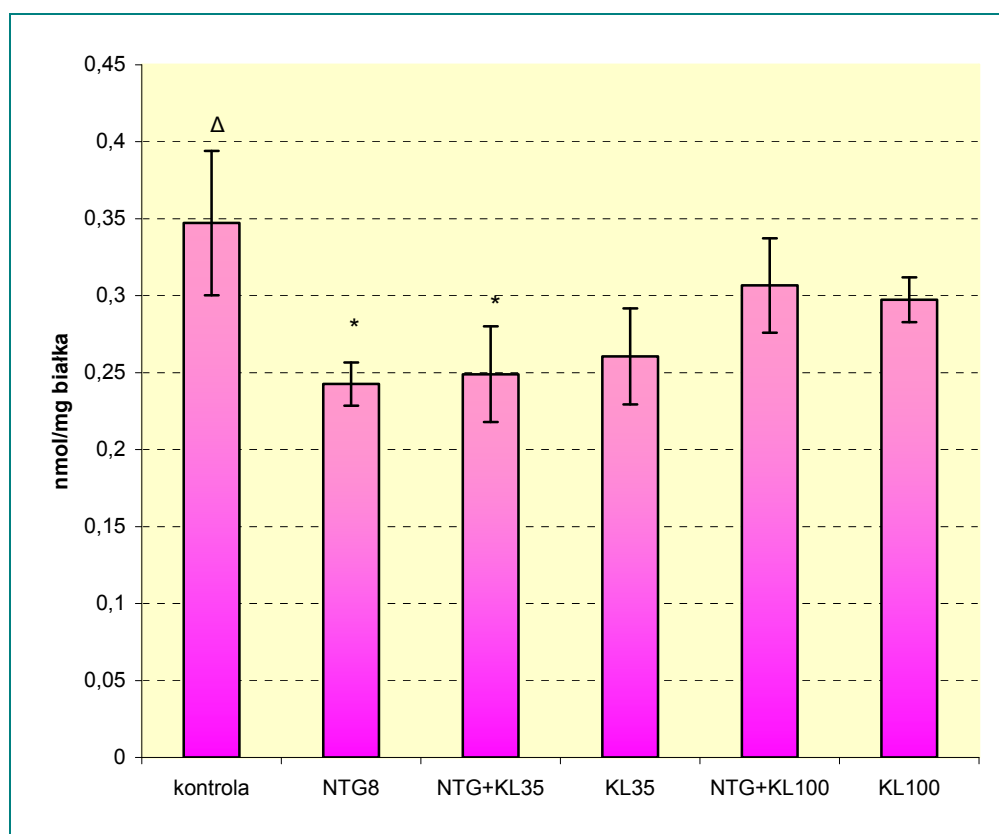
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie S-nitrozotoli w osoczu było najwyższe w grupie kontrolnej, (Wykres 32). Istotny statystycznie spadek stężenia zanotowano w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę (o 29%) w porównaniu do kontroli oraz w grupie otrzymującej równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień (o 28,3%). W pozostałych grupach stężenia S-nitrozotoli nie różniło się istotnie od stężenia w grupie kontrolnej.

Wykres 32. Stężenia S-nitrozotoli w osoczu szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

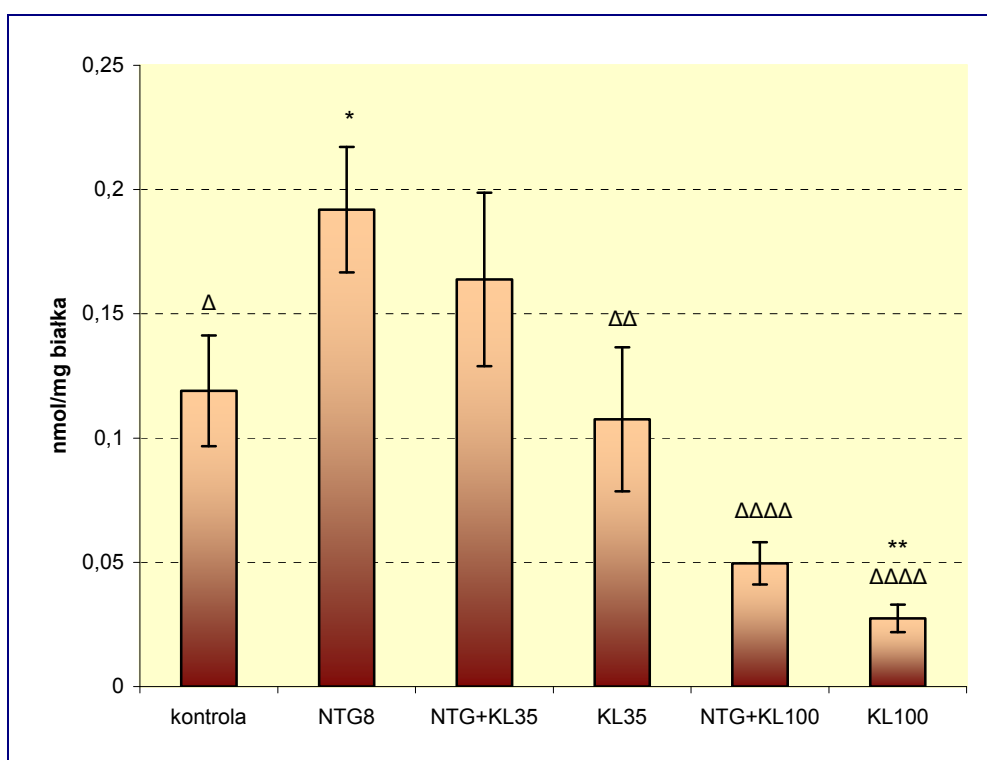
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W sercach, oznaczono istotnie statystycznie wyższe stężenie S-nitrozotoli w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę w porównaniu do stężenia w kontroli (wzrost o 61%), (Wykres 33). W grupie otrzymującej równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni stężenie S-nitrozotoli spadło w porównaniu z grupą z tolerancją, jednak spadek ten był nieznamienny statystycznie. Stężenie w tej grupie nie było także istotnie statystycznie różne w porównaniu ze stężeniem kontrolnym. W grupie NTG+KL100, której podawano równolegle z nitrogliceryną większe dawki kwasu α -liponowego przez 8 dni, spadek stężenia S-nitrozotoli w porównaniu z grupą NTG8 był istotny statystycznie. Niewielkie stężenie S-nitrozotoli odnotowano w grupie, która otrzymywała tylko kwas α -liponowy w większej dawce (KL100). Poziom stężenia w tej grupie był z namiennie niższy w porównaniu z grupą kontrolną oraz z grupą NTG8.

Wykres 33. Stężenia S-nitrozotoli w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

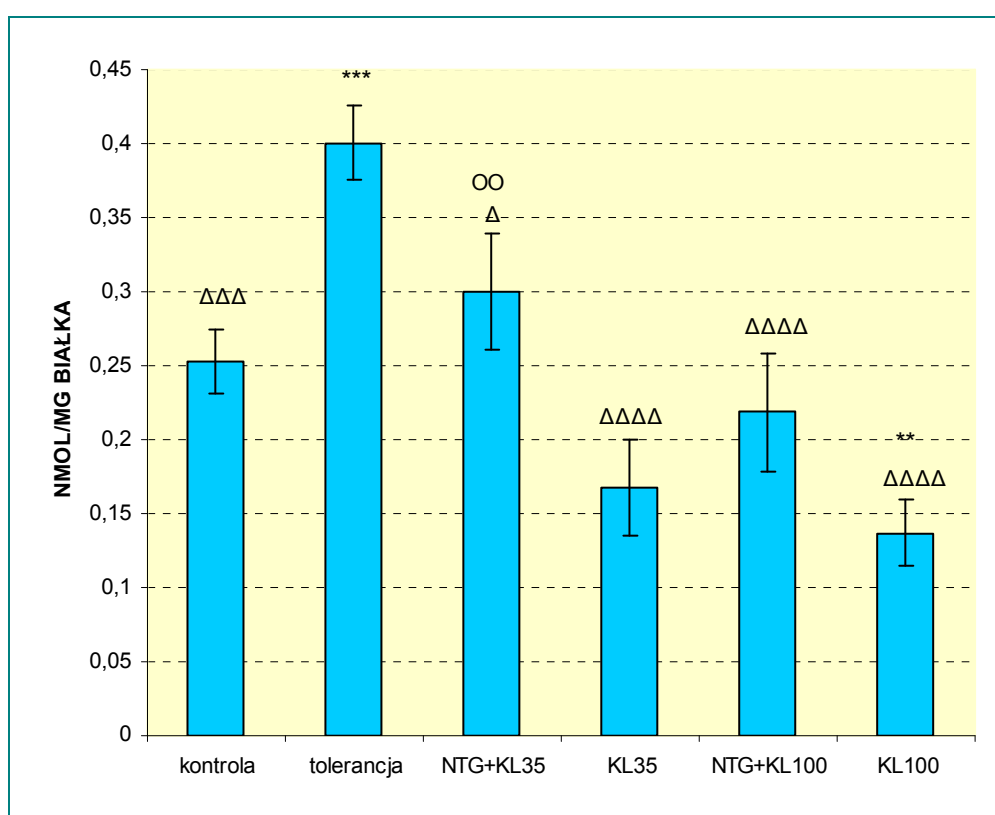
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

10. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na procesy peroksydacyjne oraz enzymy antyoksydacyjne w wątrobach, nerkach i mózgach szczurów

W wątrobach poziomy stężen zarówno MDA, jak i RTF istotnie statystycznie wzrosły w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę (NTG8) w stosunku do poziomów w grupie kontrolnej, (Wykresy 34 i 35).

Wykres 34. Stężenia MDA w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

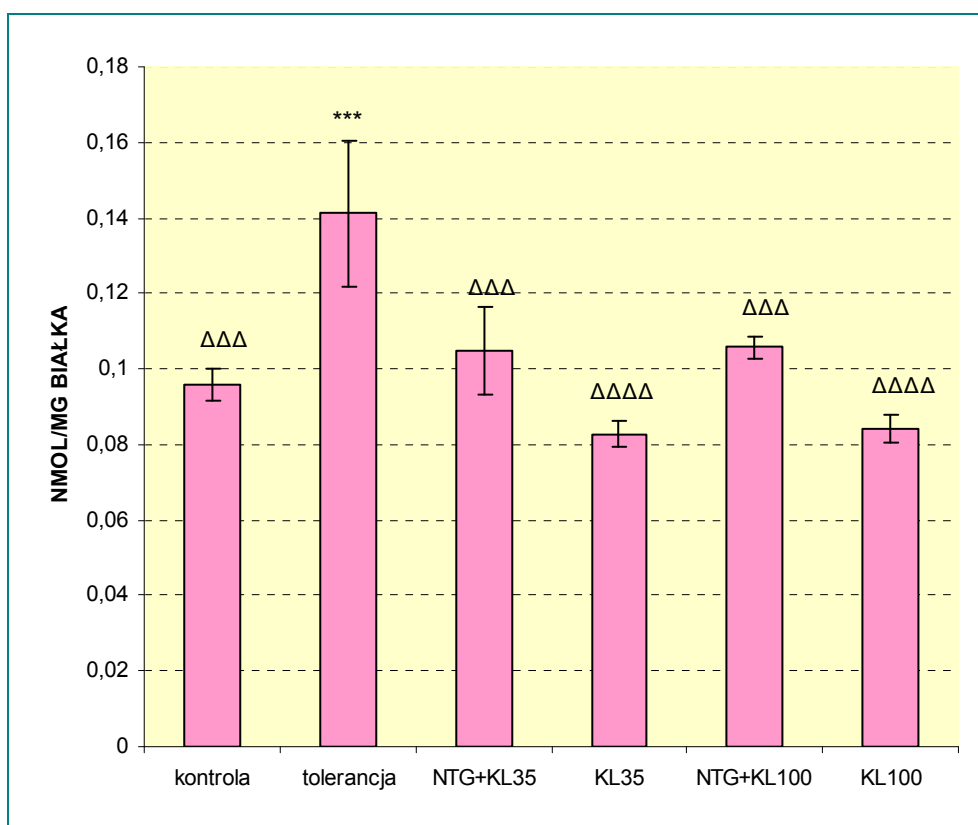
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie MDA w grupie kontrolnej wynosiło średnio 0,2532 nmol/mg białka. U szczurów z tolerancją stężenie MDA istotnie statystycznie wzrosło do poziomu 158% stężenia kontrolnego. Zmianę tę korygował kwas α -liponowy. W grupie NTG+KL35, której podawano nitroglicerynę i kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, stężenie MDA osiągnęło 119% poziomu kontrolnego (spadek o 75% w porównaniu do szczurów z tolerancją na nitroglicerynę). Większa dawka kwasu α -liponowego (2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni) zmniejszyła stężenie MDA do poziomu kontrolnego. Istotne statystycznie obniżenie poziomu MDA obserwowano także w grupach, którym podawano kwas α -liponowy bez nitrogliceryny.

Wykres 35. Stężenia RFT w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; *** p <0.01; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

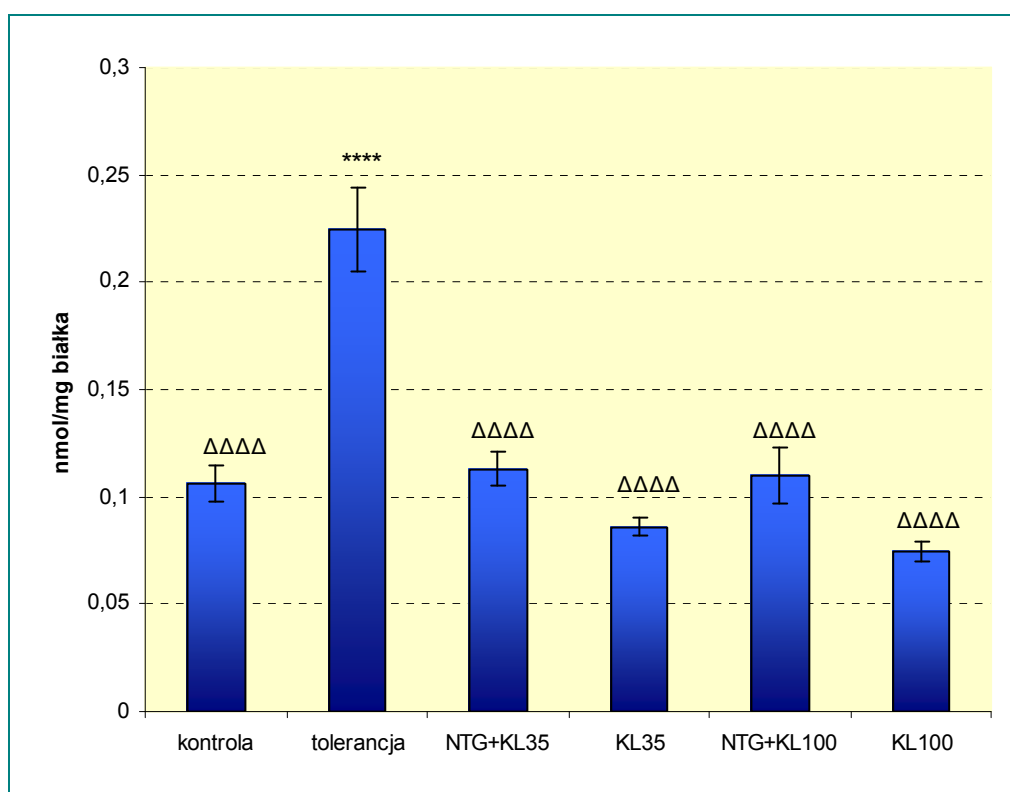
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie RFT w wątrobach zwierząt kontrolnych średnio osiągnęło poziom 0,09575 nmol/mg białka. W grupie NTG8 stężenie RFT wzrosło do 147% stężenia kontrolnego. Zmiana ta była korygowana przez kwas α -liponowy. We wszystkich grupach, którym podawano kwas α -liponowy, stężenia RFT były porównywalne ze stężeniem kontrolnym. Stężenia RFT, w grupach NTG+KL35 i NTG+KL100 spadły odpowiednio o 74% i 75%, w porównaniu z grupą kontrolną.

Stężenie MDA w nerkach, w grupie kontrolnej wynosiło średnio 0,1062 nmol/mg białka, (Wykres 36). U zwierząt z tolerancją na nitroglicerynę wzrosło o 111 % (wyniosło 211% poziomu stężenia kontrolnego). Podawanie kwasu α -liponowego korygowało ten wzrost i we wszystkich grupach otrzymujących przez 8 dni kwas α -liponowy poziomy stężeń nie różniły się istotnie statystycznie w stosunku do stężenia kontrolnego.

Wykres 36. Stężenia MDA w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamionna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

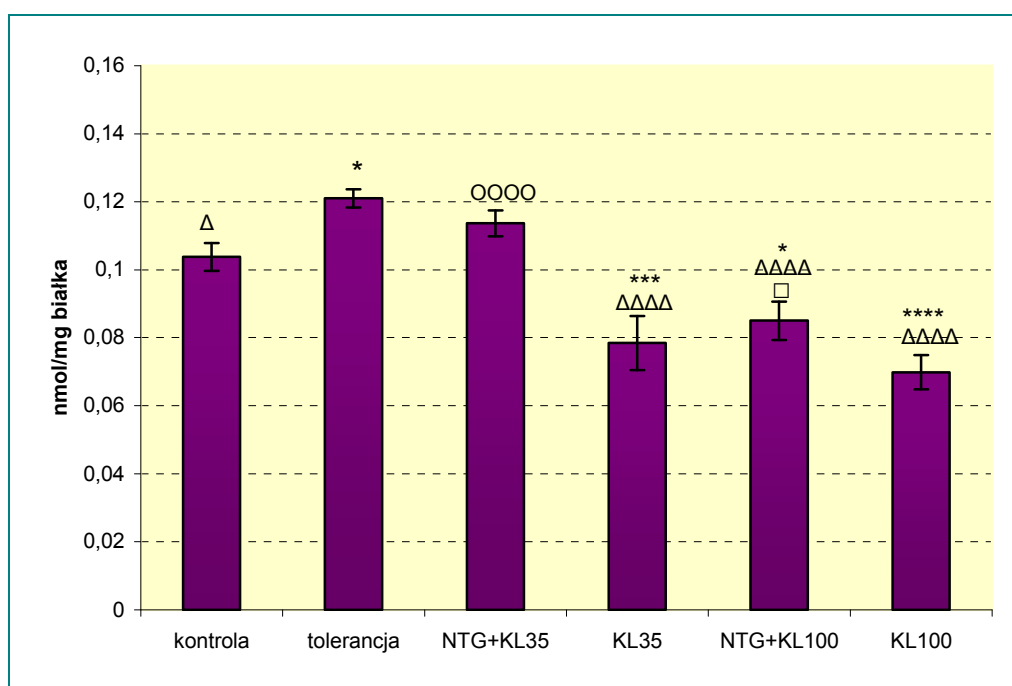
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziom stężenie RFT w nerkach, w grupie NTG8 wzrósł statystycznie znamienne w porównaniu z poziomem kontrolnym, o 17%, (Wykres 37). W grupie NTG+KL35, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień nie było istotnej statystycznie różnicy w porównaniu do stężenia w tolerancji. Obserwowano natomiast znamienność statystyczną pomiędzy stężeniem w tej grupie, a w grupie, której podawano sam kwas α -liponowy w tej samej dawce (grupa KL35). Jednak w grupie NTG+KL100, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień poziom stężenia RFT znamienne statystycznie spadł w stosunku do grupy z tolerancją o 30% i wynosił 82% poziomu kontrolnego. Stężenie RFT w tej grupie było jednak istotnie statystycznie wyższe od grupy otrzymującej sam kwas α -liponowy w tej samej dawce (grupa KL100). W grupach, które otrzymywały sam kwas α -liponowy przez 8 dni poziomy stężenie RFT były istotnie statystycznie niższe w stosunku do stężenia kontrolnego i stężenia w grupie NTG8.

Wykres 37. Stężenia RFT w nerkach szczurów w badanych grupach

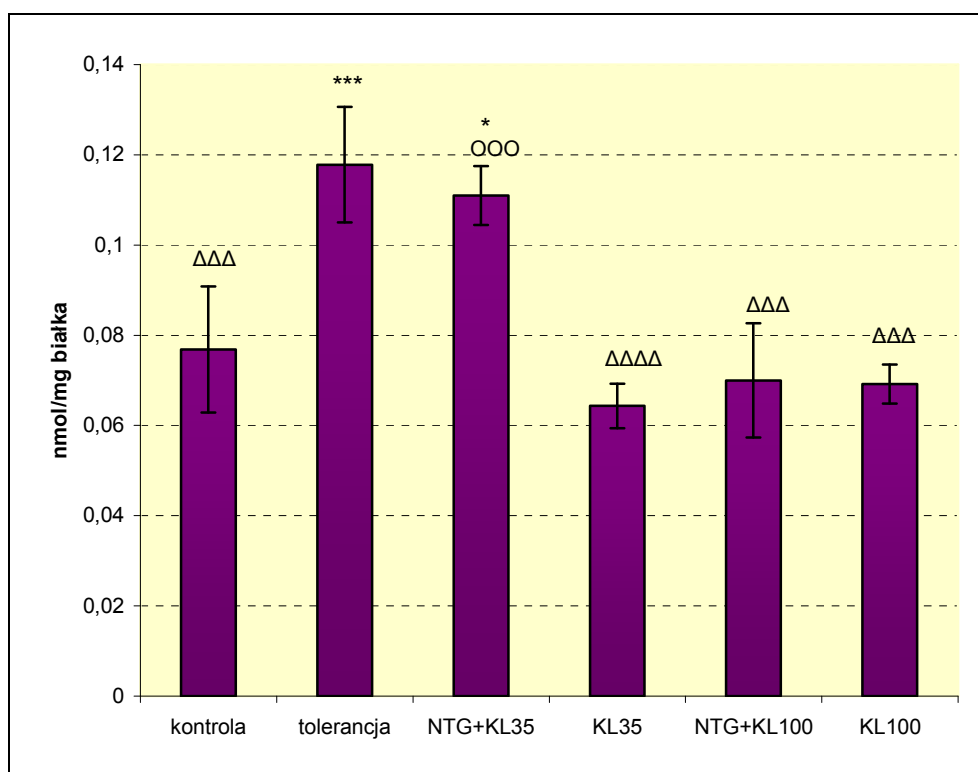


Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ, do grupy KL35 – o lub do grupy KL100 - □; * p <0.05; ** p <0.02; *** p <0.01; **** p <0.001; NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;
 NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;
 KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;
 NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;
 KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziomy stężenie MDA oraz RFT istotnie statystycznie wzrosły w mózgach, w grupie NTG8, w stosunku do stężenia w grupie kontrolnej, (Wykresy 38 i 39).

Stężenie MDA w grupie kontrolnej zostało oznaczone na poziomie 0,07683 nmola/mg białka. W grupie z tolerancją na nitroglicerynę obserwowano istotny statystycznie wzrost do 153% poziomu kontrolnego. Kwas α -liponowy obniżał stężenia MDA. Znamienne statystycznie spadek, w porównaniu do grupy NTG8, obserwowano w grupie NTG+KL100, której równolegle z nitrogliceryną podawano kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni oraz w grupach KL35 i KL100, które otrzymywały tylko kwas α -liponowy przez 8 dni.

Wykres 38. Stężenia MDA w mózgach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; ***p<0.01; ****p<0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

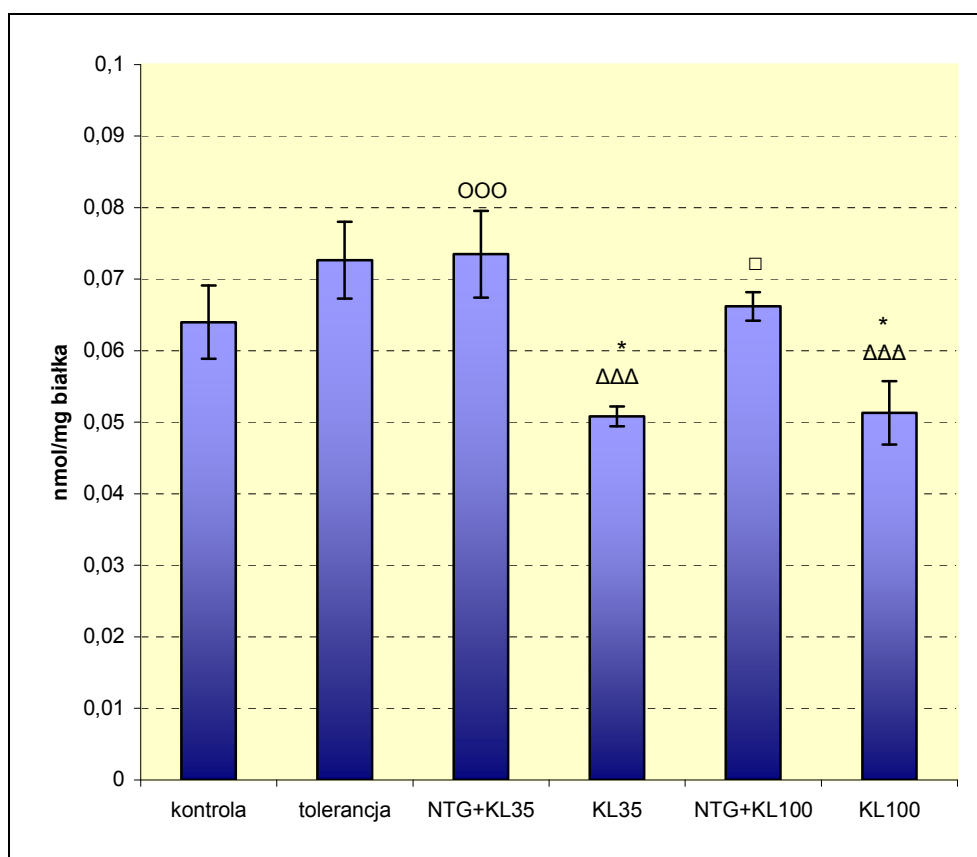
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenia RFT w mózgach szczurów wzrosły nieznacznie w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę oraz w grupie, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, w porównaniu do grupy kontrolnej. Średnie stężenia w tych grupach oznaczono na poziomie 114 i 115% poziomu kontrolnego. W grupie NTG+KL100, która otrzymywała równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w większej dawce: 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, stężenie RFT nie różniło się istotnie statystycznie od stężenia kontrolnego (104%). Natomiast w grupach KL35 i KL100, które przyjmowały tylko kwas α -liponowy przez 8 dni, stężenia RFT spadły istotnie statystycznie w porównaniu do poziomu kontrolnego.

Wykres 39. Stężenia RFT w mózgach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ , do grupy KL35 – o lub do grupy KL100 - □; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

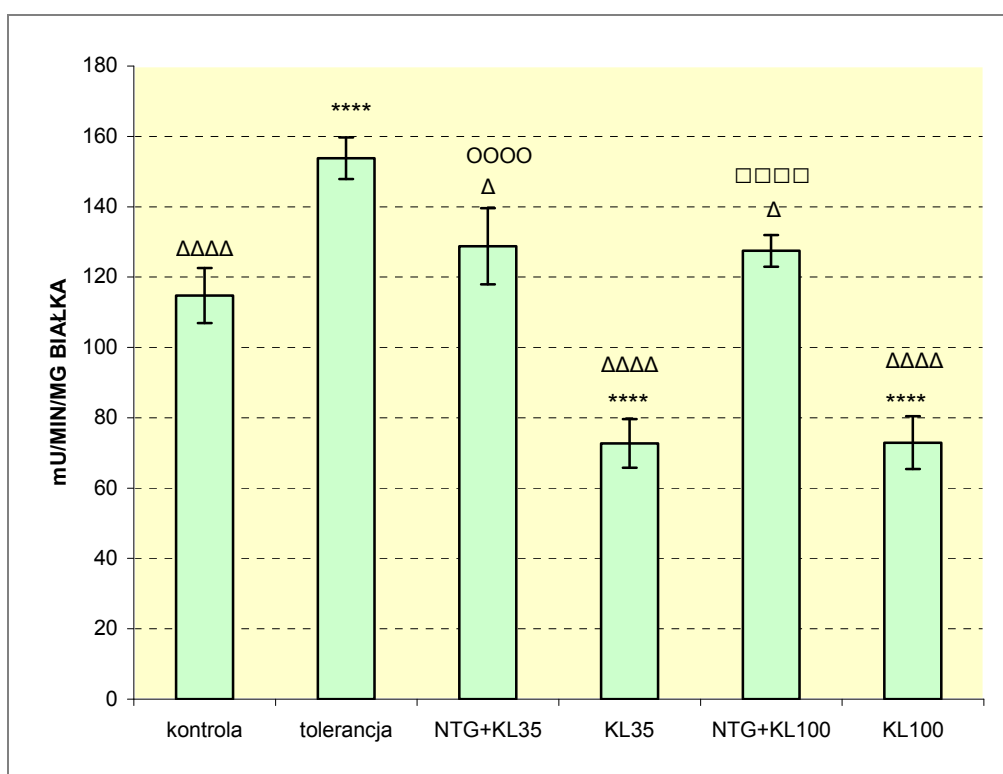
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Wątrobowa aktywność peroksydazy glutationowej istotnie statystycznie wzrosła u szczurów z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę, (Wykres 40). Procent wzrostu w tej grupie wyniósł 134% poziomu kontrolnego. Kwas α -liponowy podawany w obu dawkach istotnie wyrównywał ten wzrost i w grupach otrzymujących oprócz nitrogliceryny kwas α -liponowy przez 8 dni poziomy aktywności peroksydazy glutationowej w wątrobie były porównywalne do poziomu w grupie kontrolnej. W grupach, które były leczone tylko kwasem α -liponowym aktywność wątrobowa peroksydazy glutationowej była istotnie obniżona względem pozostałych grup.

Wykres 40. Aktywności peroksydazy glutationowej w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ , do grupy KL35 – o lub do grupy KL100 - $\square$; * $p < 0.05$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

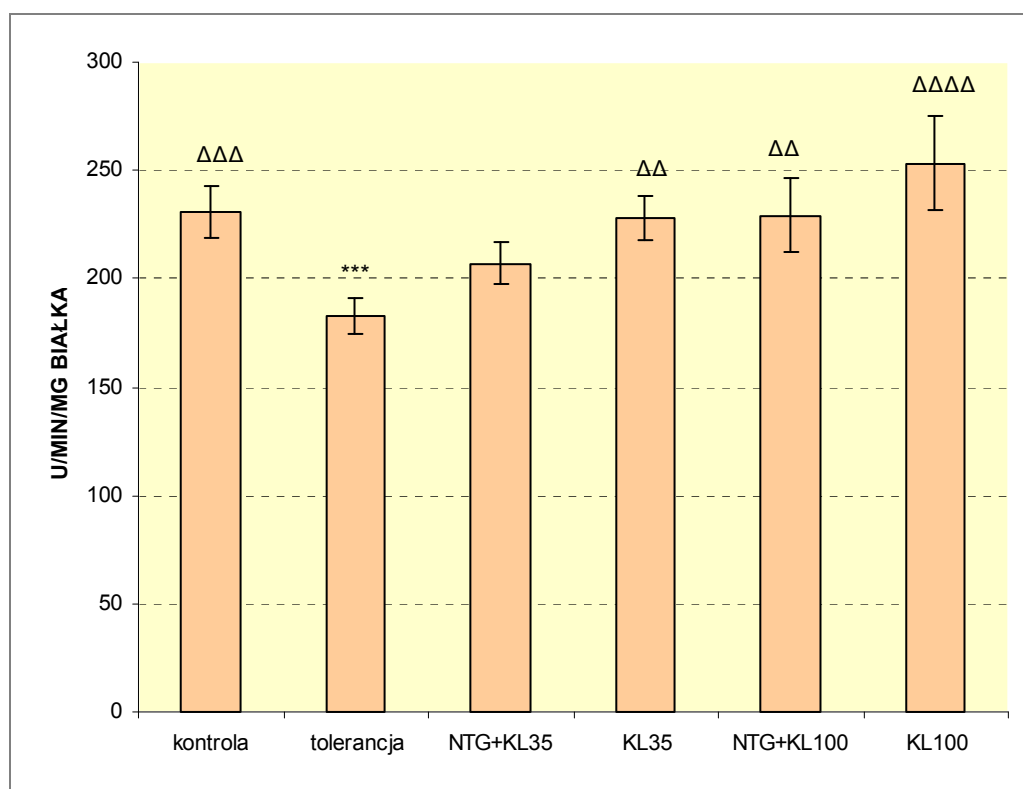
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Wątrobowy poziom aktywności katalazy w grupie kontrolnej oznaczono na poziomie $230,58 \pm 12,01$ U/min/mg białka. Aktywność katalazy w wątrobach szczurów, u których wywołano tolerancję na nitroglicerynę istotnie statystycznie spadła w porównaniu z aktywnością w grupie kontrolnej, (Wykres 41). W grupie NTG+KL35, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, aktywność katalazy wzrosła w porównaniu do grupy NTG8 (wynosiła 113% poziomu grupy NTG8), jednak wzrost ten nie był znamieny statystycznie. W grupie NTG+KL100, która otrzymywała równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, aktywność katalazy w wątrobie podniosła się do poziomu 125,5% grupy NTG8. Natomiast w grupach, które były leczone samym kwasem α -liponowym aktywność katalazy w wątrobie była na podobnym poziomie jak w grupie kontrolnej.

Wykres 41. Aktywności katalazy w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

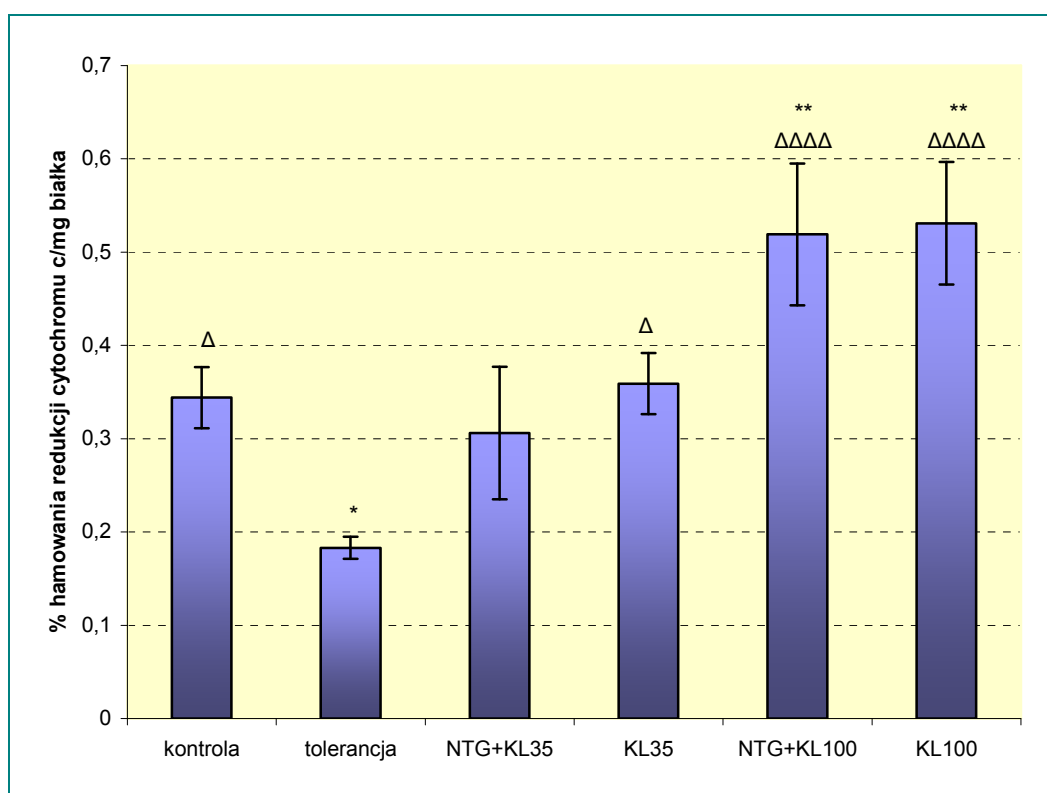
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej istotnie statystycznie spadała w wątrobach zwierząt, którym podawano nitroglicerynę przez 8 dni (grupa NTG), (Wykres 42). W tej grupie, procent hamowania redukcji cytochromu c spadł o około 47% w porównaniu z grupą kontrolną. Podawanie kwasu α -liponowego równolegle z nitrogliceryną przywracało aktywność wątrobową tego enzymu. Procent hamowania redukcji cytochromu c określono na poziomie około 89% i 151% poziomu kontrolnego, odpowiednio w grupie NTG+KL35 i NTG+KL100. Kwas α -liponowy podawany w dawce 100 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni indukował aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w wątrobie. Procent hamowania redukcji cytochromu c w grupach leczonych samym kwasem α -liponowym oznaczono na poziomie: 104% i 154% poziomu kontrolnego, odpowiednio w grupie KL35 i KL100.

Wykres 42. Aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * p <0.05; ** p <0.02; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

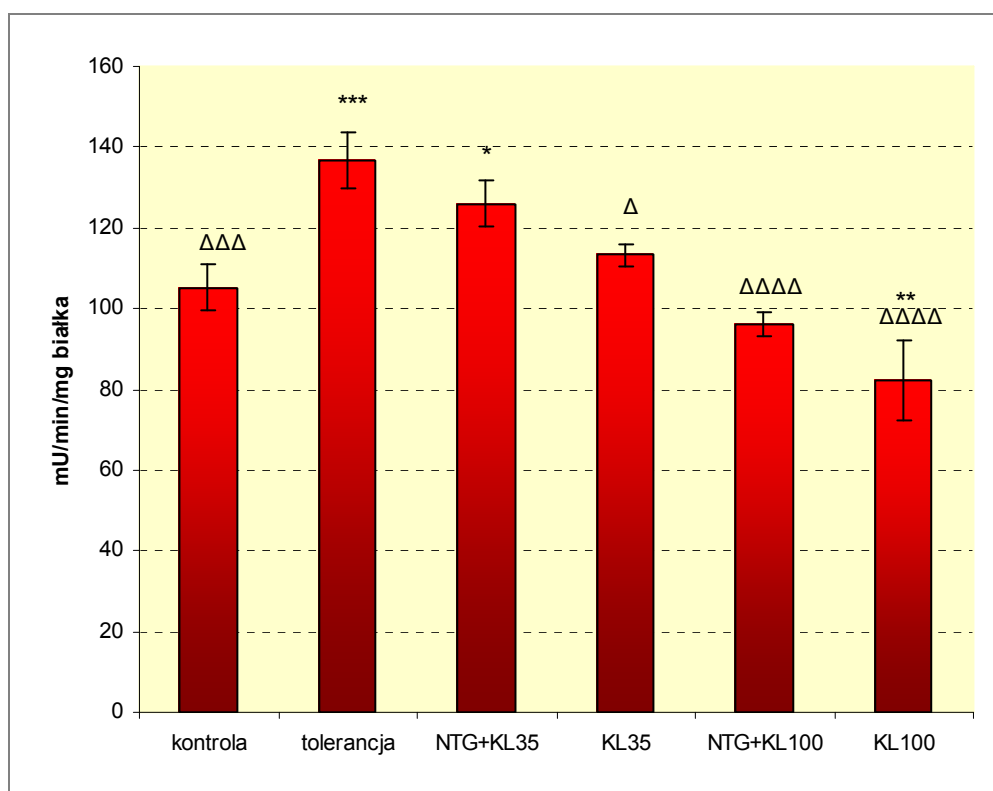
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność peroksydazy glutationowej w nerkach istotnie statystycznie wzrosła w grupie NTG8 w porównaniu z aktywnością kontrolną, (Wykres 43). Kwas α -liponowy podawany równolegle z nitrogliceryną przez 8 dni w dawce 35 mg/kg m.c./dzień zmniejszył ten wzrost, jednak także w tej grupie poziom aktywności tego enzymu w nerkach był istotnie statystycznie wyższy niż w grupie kontrolnej. Poziom aktywności peroksydazy glutationowej w grupie NTG+KL100, której przez 8 dni równolegle z nitrogliceryną podawano kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień nie różnił się istotnie statystycznie od poziomu kontrolnego. Znamienne statystycznie spadek aktywności peroksydazy glutationowej w nerkach w stosunku do aktywności w grupie kontrolnej zanotowano w grupie KL100, która otrzymywała przez 8 dni tylko kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień.

Wykres 43. Aktywności peroksydazy glutationowej w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

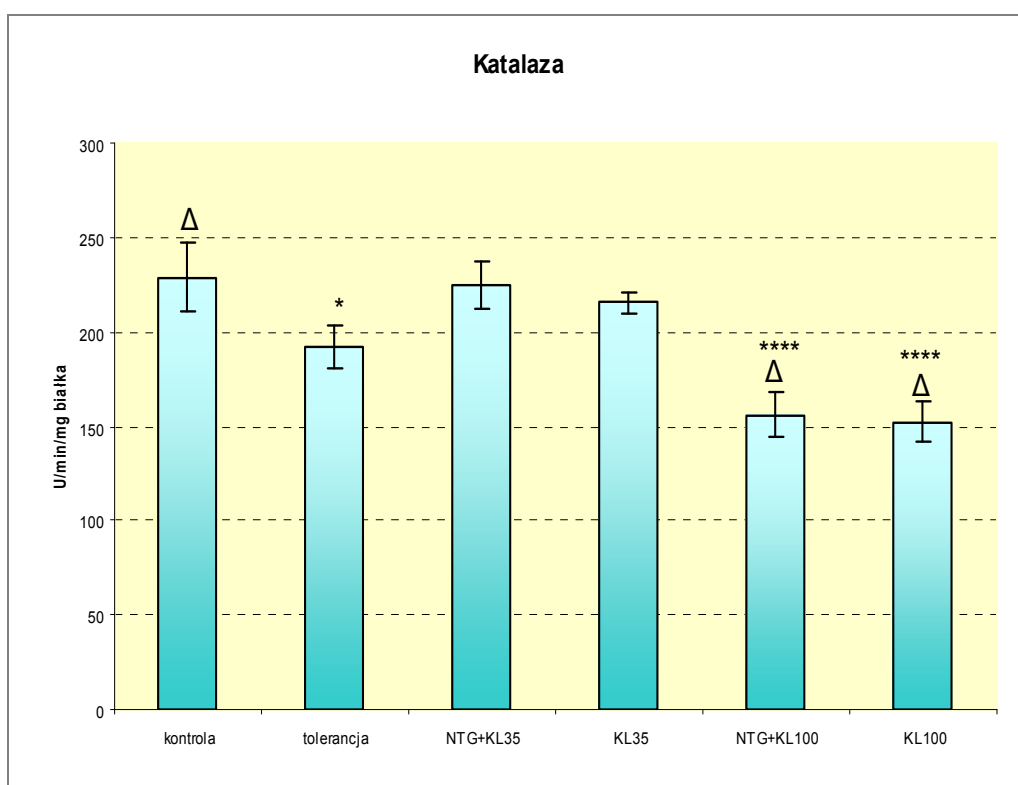
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność katalazy w nerkach uległa statystycznie znaczącemu zmniejszeniu u zwierząt, u których wywołano tolerancję na nitroglicerynę, (Wykres 44). W grupie NTG+KL35 poziom aktywności tego enzymu w nerkach był porównywalny z poziomem kontrolnym. W grupach, w których podawano kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień aktywność tego enzymu także była istotnie statystycznie obniżona w stosunku do aktywności w kontroli, a także w stosunku do aktywności w grupie z tolerancją na nitroglicerynę.

Wykres 44. Aktywności katalazy w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znaczna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * $p < 0.05$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

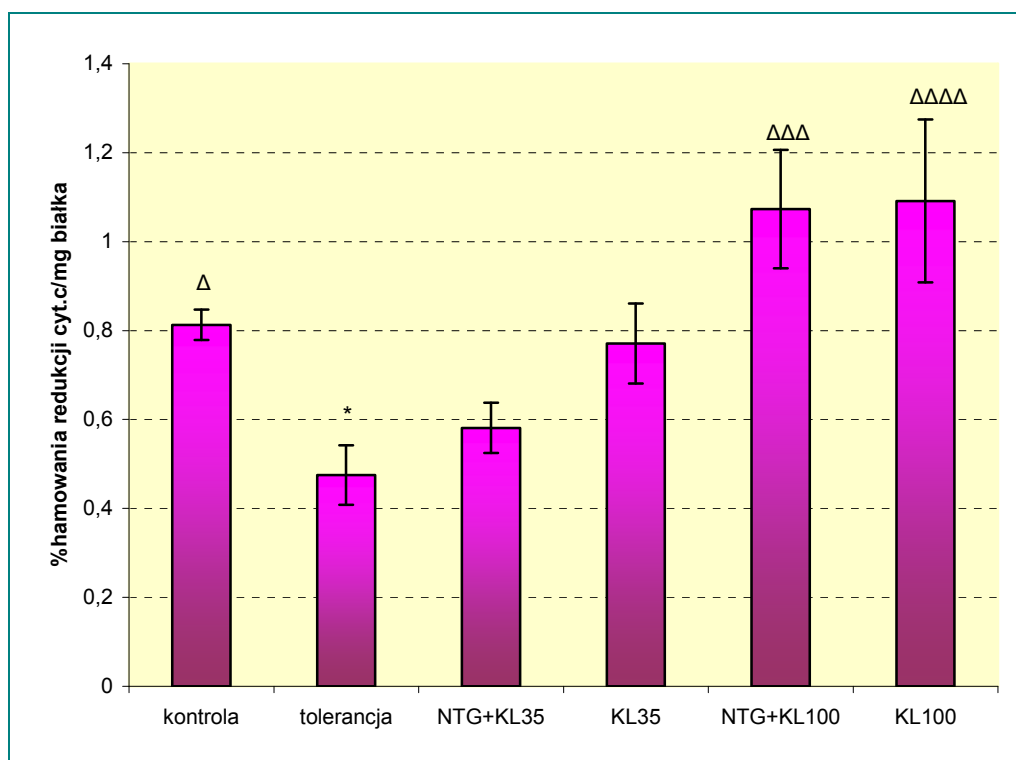
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W nerkach aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była niższa w grupie, u której wywołano tolerancję na nitroglicerynę w stosunku do aktywności w grupie kontrolnej, (Wykres 45). Procent hamowania redukcji cytochromu c przy udziale dysmutazy ponadtlenkowej w nerkach był istotnie statystycznie wyższy w grupie leczonej α -kwasem liponowym w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień, w porównaniu do grupy z tolerancją.

Wykres 45. Aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

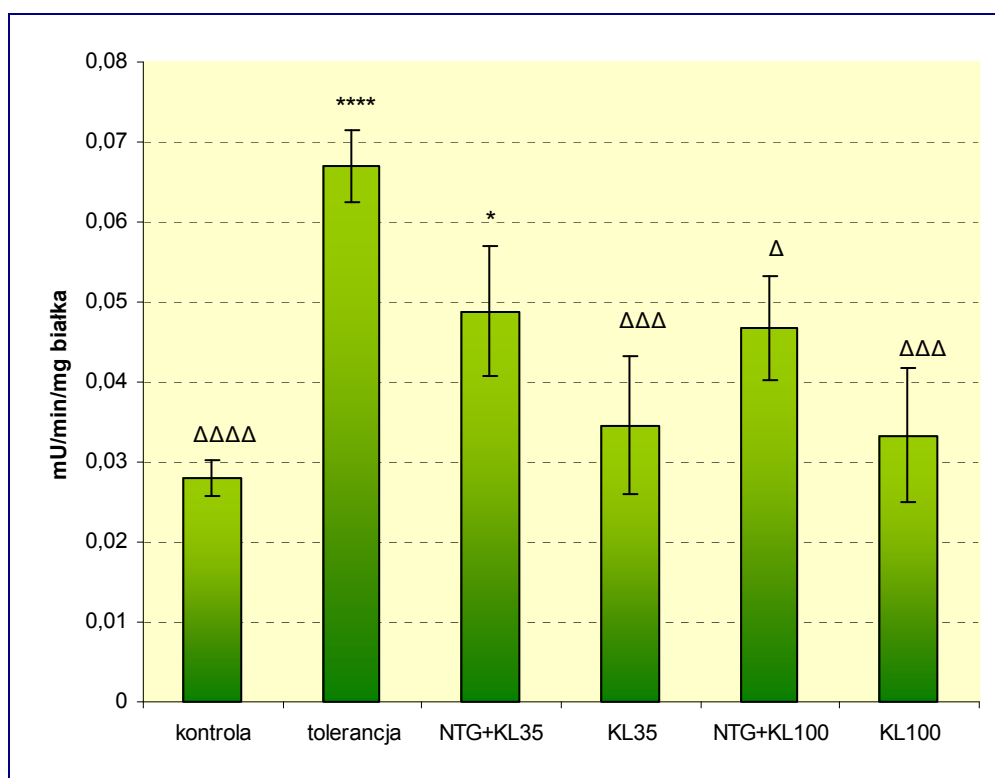
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność peroksydazy glutationowej w mózgach szczurów istotnie statystycznie wzrosła w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę, w porównaniu z grupą kontrolną, do poziomu 240% poziomu kontrolnego, (Wykres 46). W grupie NTG+KL35, której oprócz nitrogliceryny podawano kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni,

aktywność tego enzymu w mózgach także była istotnie statystycznie podwyższona w stosunku do aktywności u zwierząt kontrolnych. Wzrost ten jednak był mniejszy (175% aktywności kontrolnej). Znamienny spadek aktywności peroksydazy glutationowej w mózgach w porównaniu do grupy z rozwiniętą tolerancją oznaczono w grupach KL35, NTG+KL100 i KL100. W grupie NTG+KL100, w której zwierzęta otrzymywały kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień równoległe z nitrogliceryną przez 8 dni spadek ten był mniejszy niż w grupach leczonych samym kwasem α -liponowym. W tych trzech grupach aktywność peroksydazy glutationowej nie była istotnie statystycznie różna w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej.

Wykres 46. Aktywność peroksydazy glutationowej w mózgach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

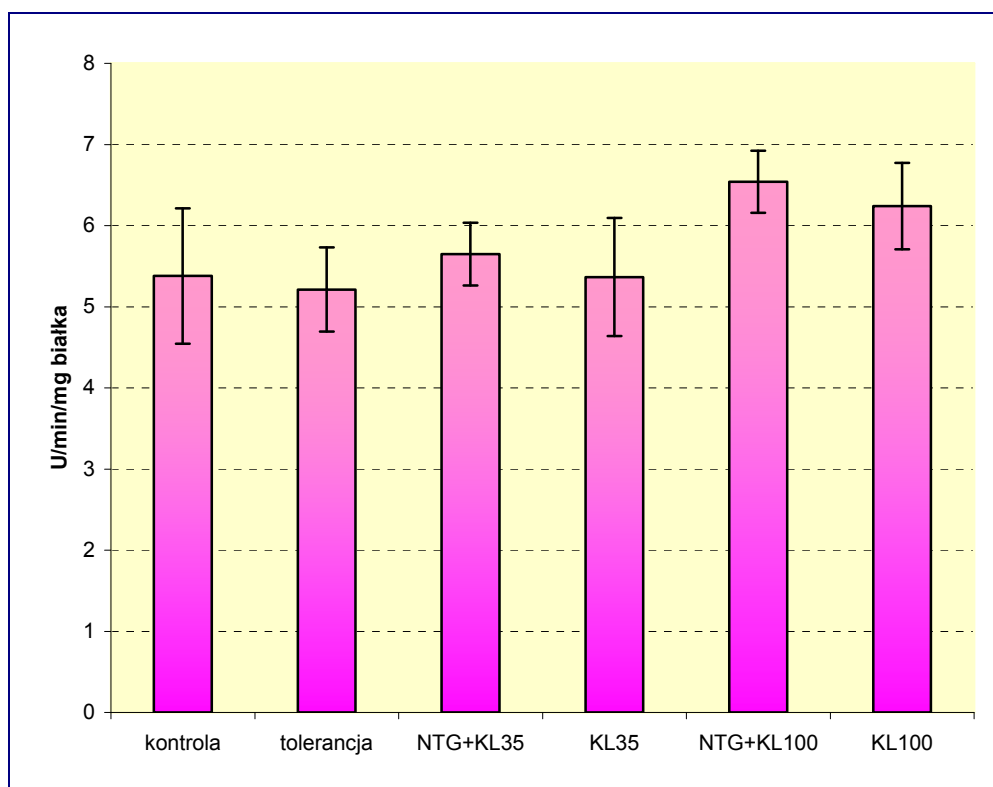
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W poszczególnych badanych grupach nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w aktywności katalazy w mózgach szczurów, (Wykres 47).

Wykres 47. Aktywność katalazy w mózgach szczurów w badanych grupach.



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

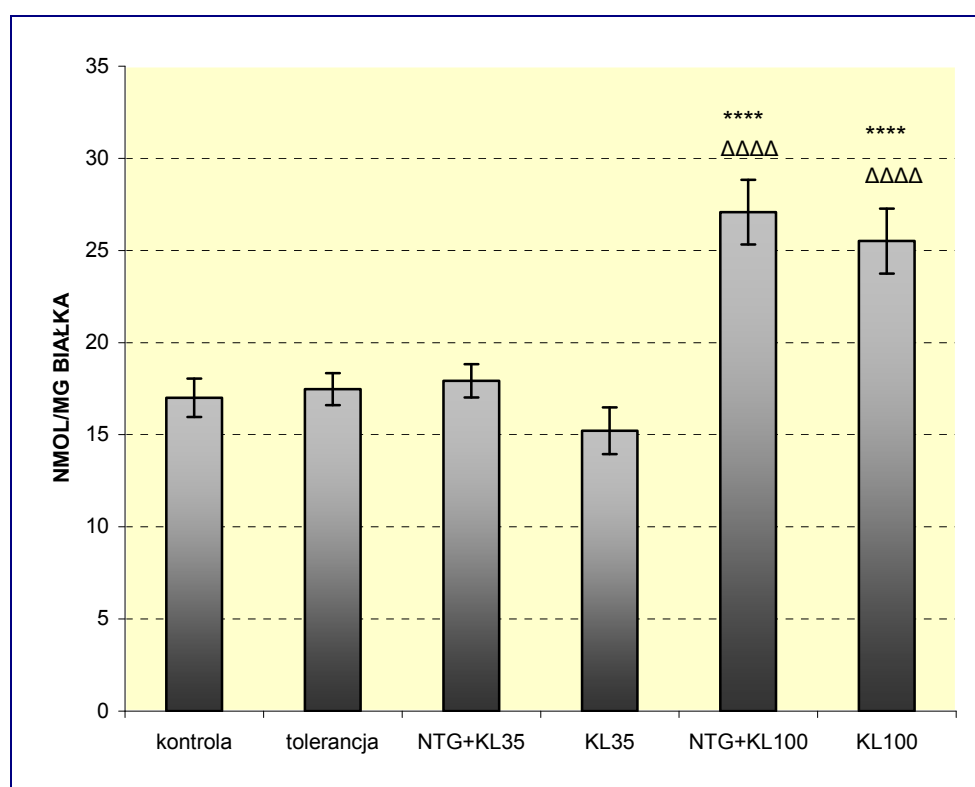
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

11. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom tioli niebiałkowych, aktywność S-transferazy glutationowej oraz aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w wątrobach i nerkach szczurów

W wątrobach szczurów poziom tioli niebiałkowych nie zmieniał się istotnie statystycznie, w porównaniu do poziomu kontrolnego, po podawaniu nitrogliceryny przez 8 dni (tolerancja na nitroglicerynę), a także w grupach otrzymujących kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg/dzień przez 8 dni, (Wykres 48). Jednak w grupach, którym podawano większe dawki kwasu α -liponowego (2 x 50 mg/kg/dzień) wykazano istotny statystycznie wzrost tioli niebiałkowych, w stosunku do grupy kontrolnej.

Wykres 48. Poziomy stężenie tioli niebiałkowych w wątrobach w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

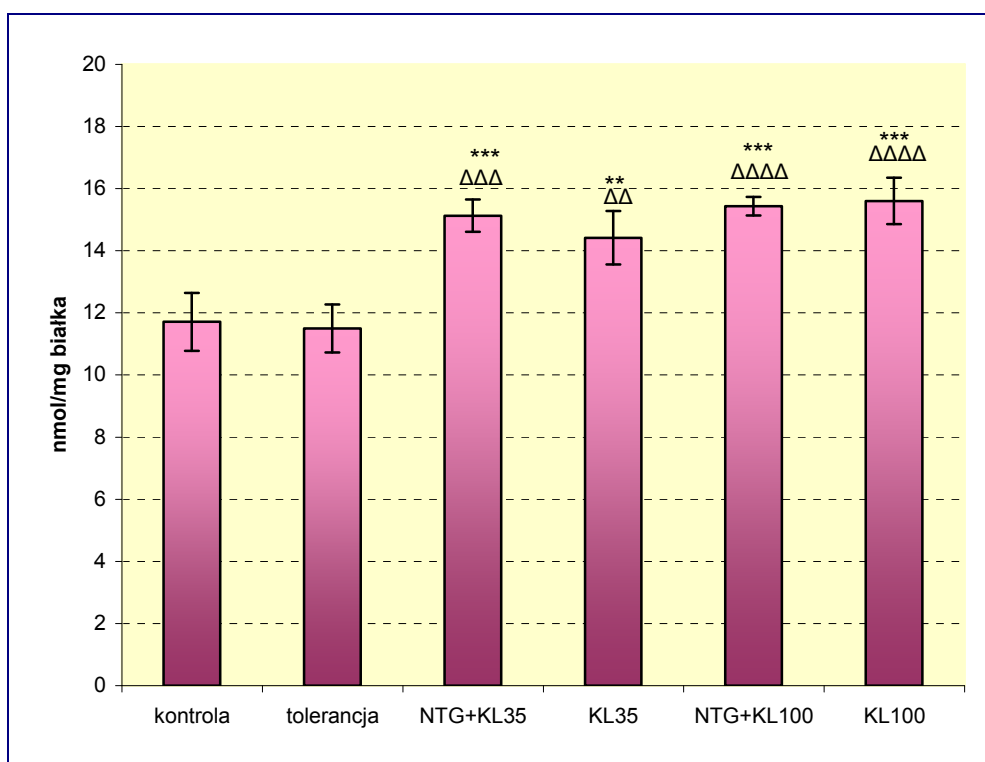
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziomy stężenie tioli niebiałkowych w nerkach w grupie kontrolnej oraz z wywołaną tolerancją na nitroglicerynę nie różniły się statystycznie, (Wykres 49). Natomiast we wszystkich grupach, którym podawano kwas α -liponowy, poziomy stężenie tych związków istotnie statystycznie wzrosły w porównaniu do kontroli.

Wykres 49. Poziomy stężenie tioli niebiałkowych w nerkach w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; **p<0.02; ***p<0.01; ****p<0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

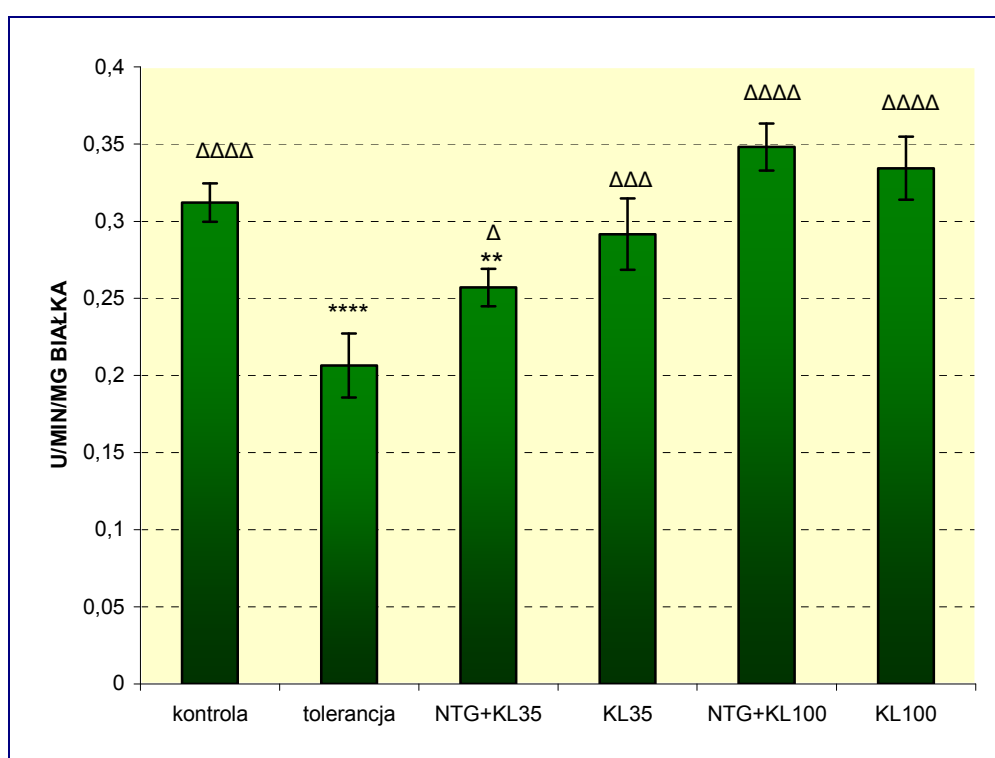
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziom aktywności S-transferazy glutationowej w wątrobach był istotnie statystycznie obniżony w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę w stosunku do grupy kontrolnej (66% poziomu kontrolnego), (Wykres 50). W grupach, którym podawano kwas α -liponowy aktywność tego enzymu w wątrobach była odzyskiwana. W grupie NTG+KL35, która otrzymywała równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce

35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, aktywność S-transferazy glutationowej była jednak nadal istotnie statystycznie niższa w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej. Większe dawki kwasu α -liponowego (grupa NTG+KL100) wyrównywały poziom aktywności tego enzymu w wątrobie do poziomu kontrolnego. W grupach, które otrzymywały tylko α -kwas liponowy poziomy aktywności S-transferazy glutationowej w wątrobie nie różniły się znacząco w stosunku do kontroli.

Wykres 50. Poziomy aktywności S-transferazy glutationowej w wątrobach w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znacząca w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

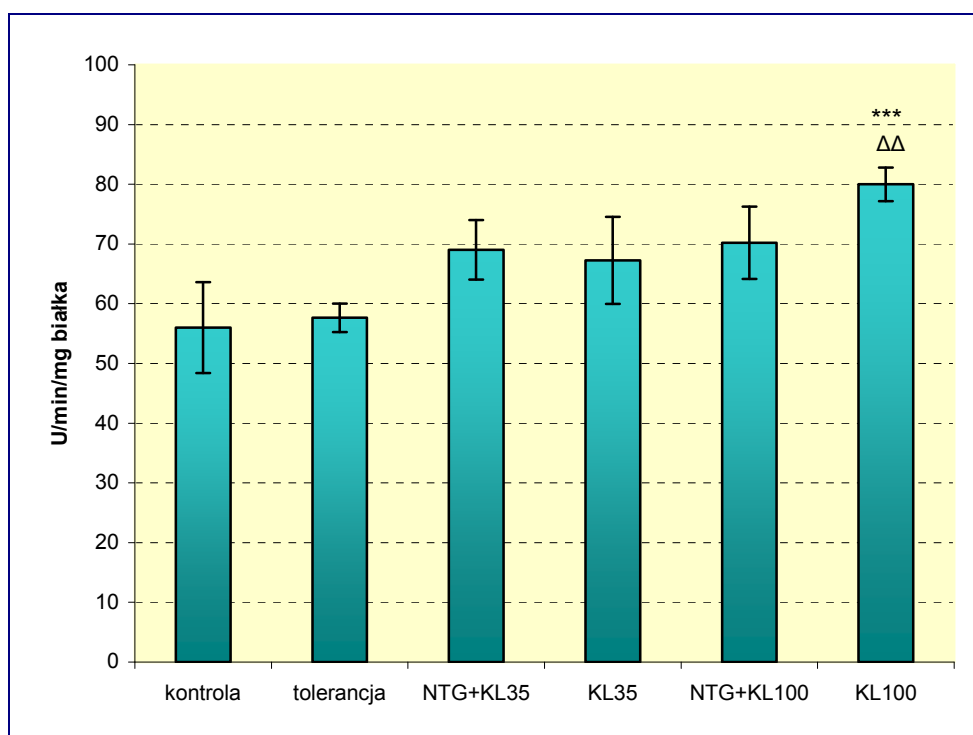
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W nerkach istotną statystycznie zmianę aktywności S-transferazy glutationowej w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej zanotowano w grupie KL100, w której zwierzęta otrzymywały sam kwas α -liponowy przez 8 dni w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień. (Wykres 51). W pozostałych grupach poziomy aktywności tego enzymu w nerkach nie różniły się znamienne statystycznie w porównaniu do kontroli.

Wykres 51. Poziomy aktywności S-transferazy glutationowej w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

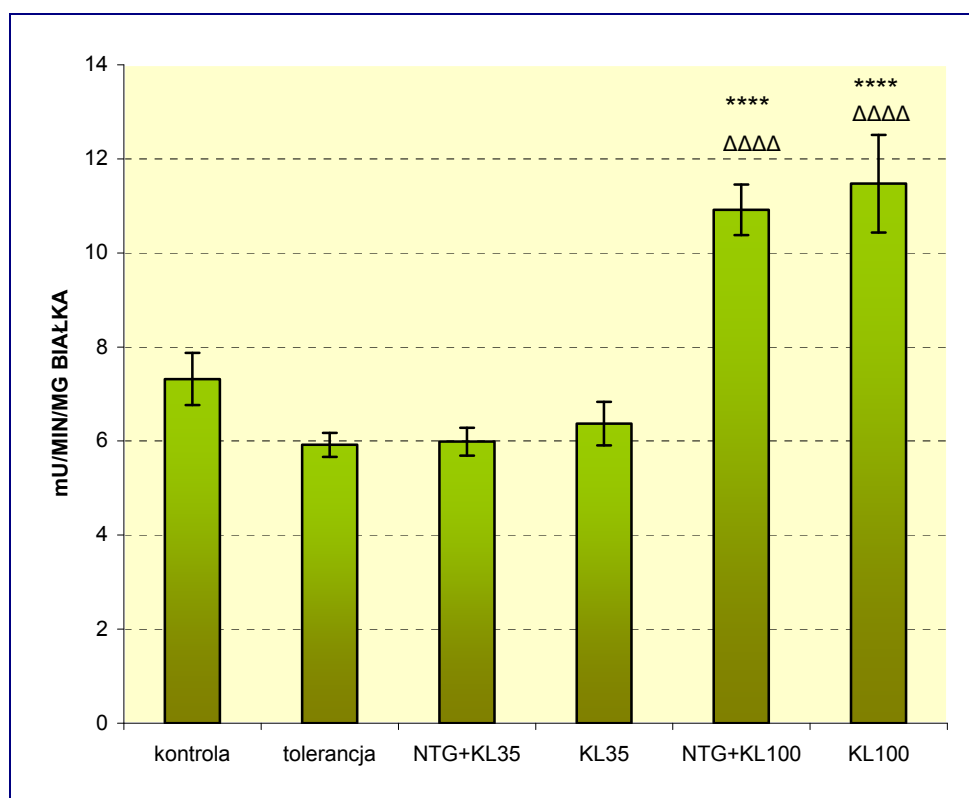
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność γ -glutamylotranspeptydazy nie zmieniała się istotnie statystycznie w wątrobach zwierząt z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej, (Wykres 52). Kwas α -liponowy znacząco statystycznie podwyższał aktywność tego enzymu w wątrobie w grupach, którym podawano go w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni.

Wykres 52. Poziomy aktywności γ -glutamylotranspeptydazy w wątrobach w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

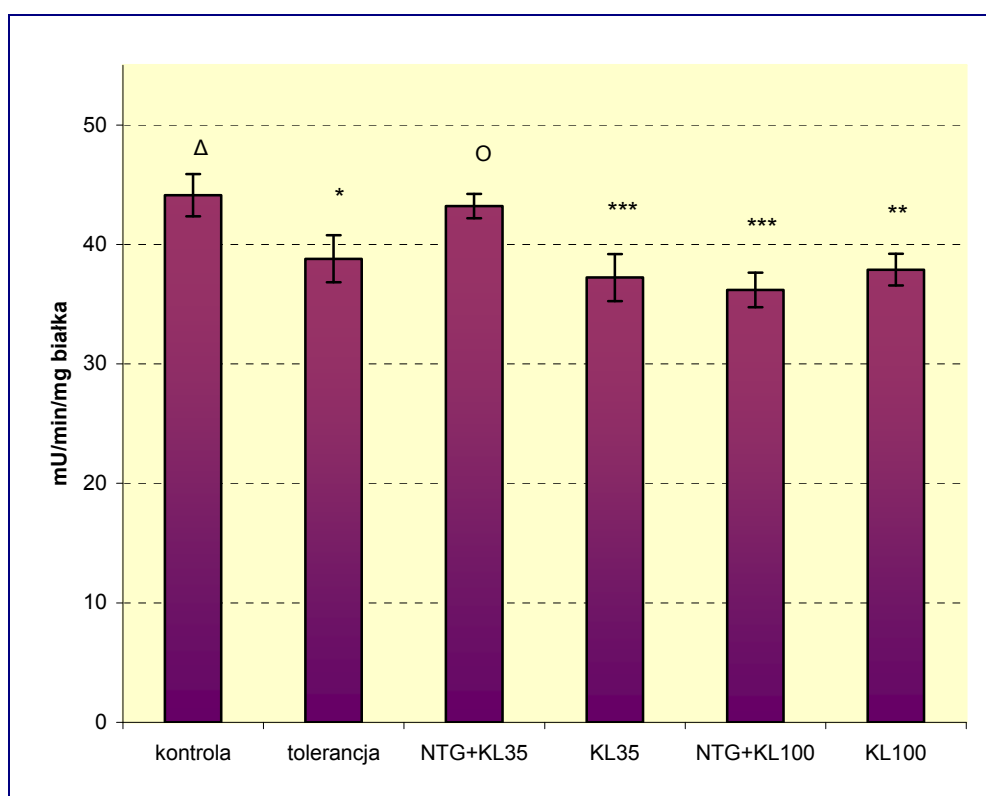
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W nerkach, aktywność γ -glutamylotranspeptydazy istotnie statystycznie spadła w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę w porównaniu do aktywności kontrolnej (spadek o 22%), (Wykres 53). Aktywność w grupie otrzymującej równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, była porównywalna do poziomu kontrolnego. U zwierząt z grupy NTG+KL100, którym podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni oraz w grupach leczonych tylko kwasem α -liponowym, aktywność γ -glutamylotranspeptydazy w nerkach istotnie statystycznie spadła w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej.

Wykres 53. Poziomy aktywności γ -glutamylotranspeptydazy w nerkach w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamionna w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; * p <0.05; ** p <0.02; *** p <0.01; NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

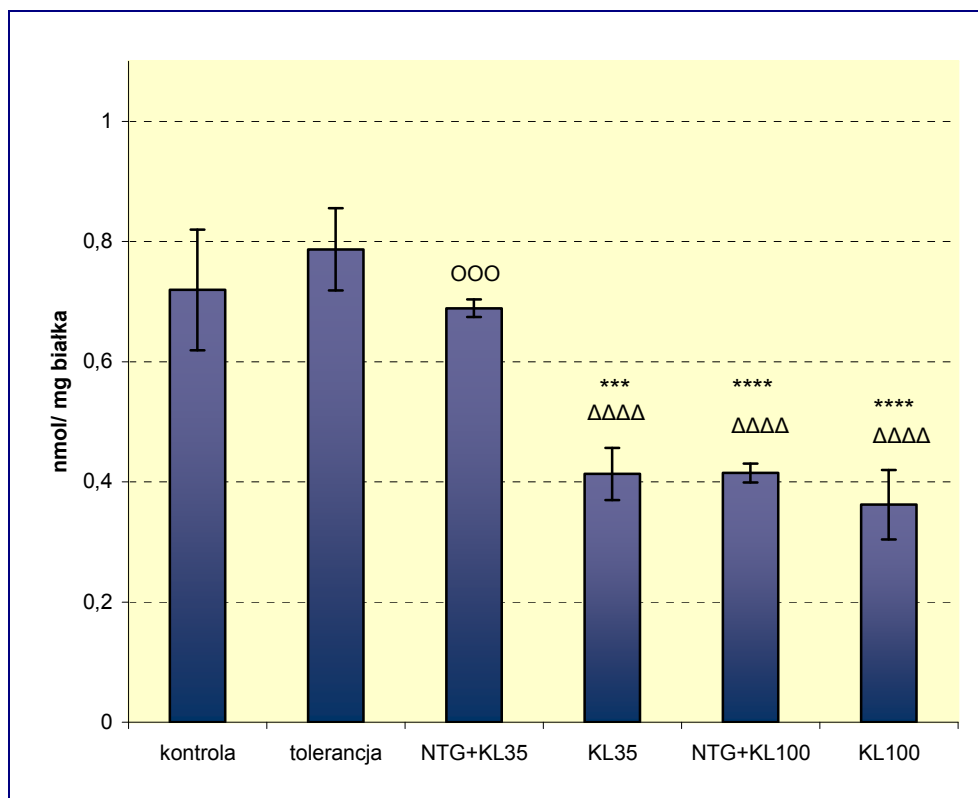
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

12. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom tlenku azotu (NO) oraz S-nitrozotiosi w wątrobach i nerkach szczurów

Wykres 54. Stężenia tlenku azotu (azotany III i V) w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienna w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; *** p <0.01; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

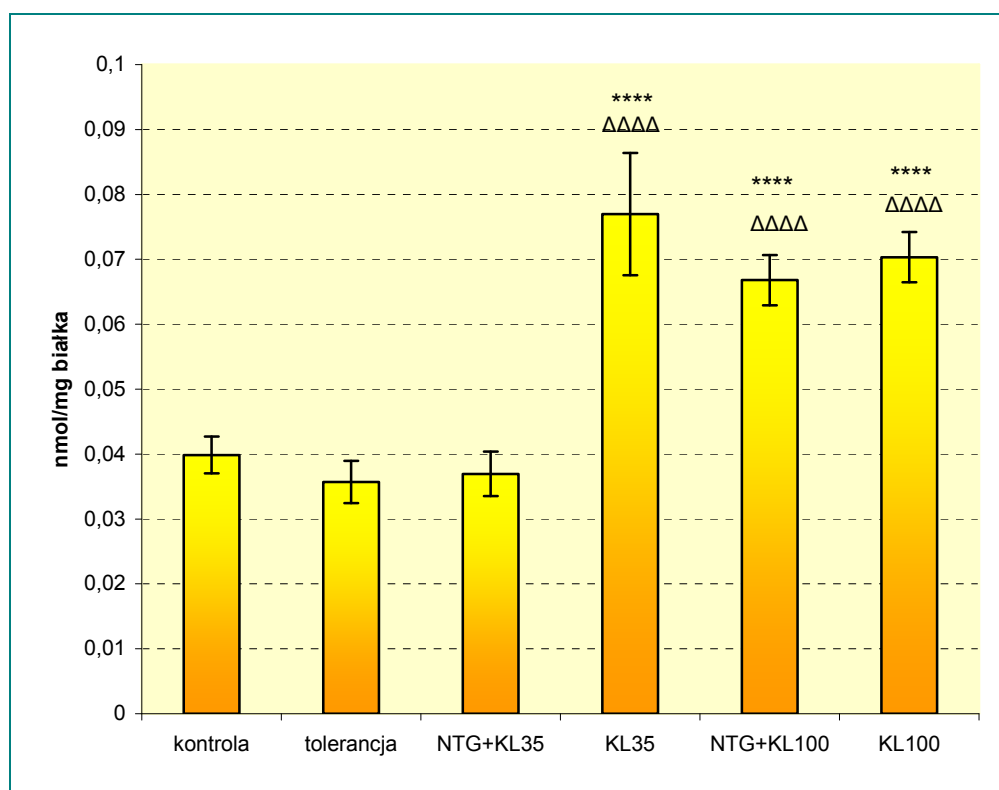
KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W wątrobach szczurów, którym podawano przez 8 dni nitroglicerynę i u których rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę nie było istotnej statystycznie zmiany poziomu stężenia azotanów w porównaniu do grupy kontrolnej, (Wykres 54). Także w grupie NTG+KL35, której podawano równolegle nitroglicerynę z kwasem α -liponowym w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, nie zanotowano zmiany. Jednak w grupach otrzymujących tylko kwas α -liponowy oraz w grupie, która otrzymywała równolegle z nitrogliceryną kwas

α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni, poziomy stężenie azotanów III i V były statystycznie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Procent spadku stężeń w tych grupach w porównaniu do grupy kontrolnej wynosił odpowiednio: 42%, 50% i 43%.

Stężenie azotanów III i V w nerkach szczurów po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny nie zmieniło się istotnie statystycznie w porównaniu do stężenia kontrolnego, (Wykres 55). W grupach, które otrzymywały tylko kwas α -liponowy oraz w grupie, której równolegle z nitrogliceryną podawano kwas α -liponowy w większej dawce stężenie azotanów III i V istotnie statystycznie wzrosło w porównaniu do poziomu kontrolnego.

Wykres 55. Stężenia tlenku azotu (azotany III i V) w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamiona w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; ****p<0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

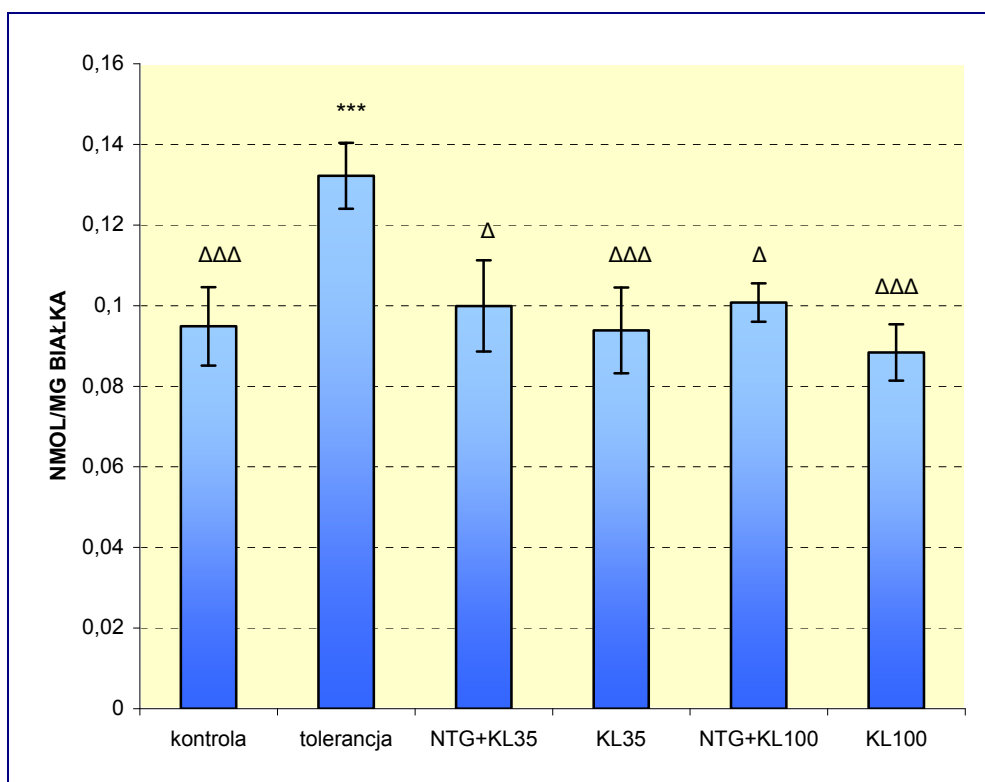
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie S-nitrozotoli w wątrobach szczurów statystycznie znacznie wzrosło w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę, w porównaniu do grupy kontrolnej. W pozostałych grupach stężenia S-nitrozotoli były porównywalne ze stężeniem w grupie kontrolnej, (Wykres 56).

Wykres 56. Stężenia S-nitrozotoli w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

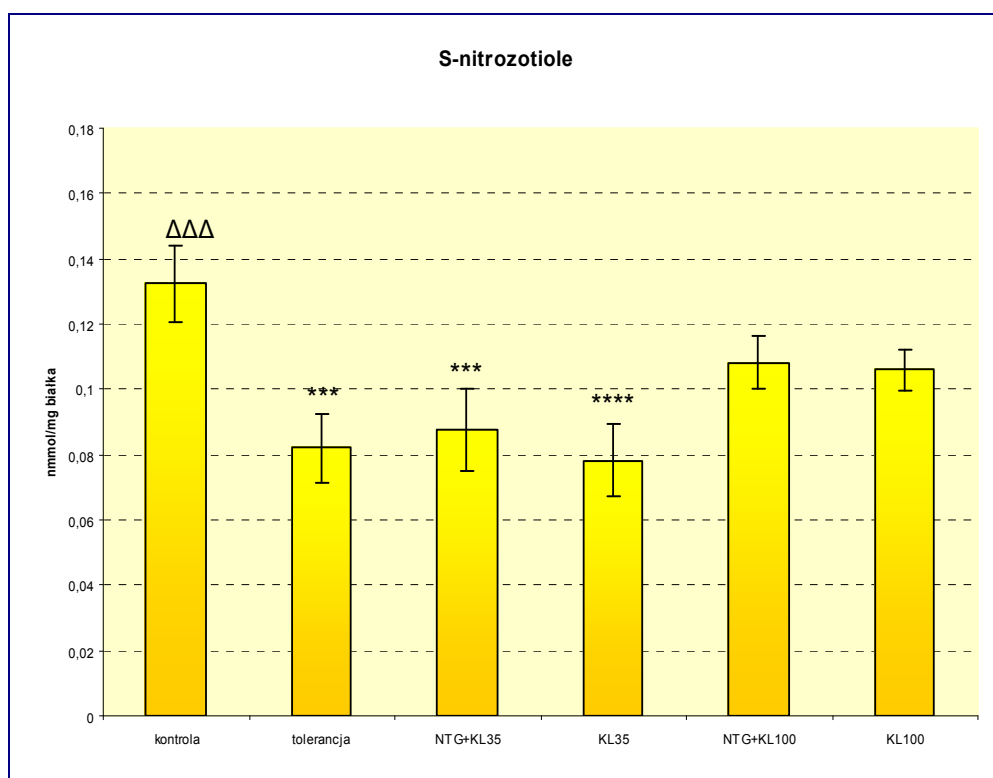
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W nerkach szczurów kontrolnych stężenie S-nitrozotiole było istotnie statystycznie większe w porównaniu z grupami: NTG8 (tolerancja na nitroglicerynę) oraz NTG+KL35 i KL35, (Wykres 57). W grupie NTG+KL100, której podawano równolegle z nitrogliceryną kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni oraz w grupie KL100, otrzymującej tylko kwas α -liponowy w tej samej dawce, stężenia S-nitrozotiole nie różniły się istotnie statystycznie od stężenia kontrolnego.

Wykres 57. Stężenia S-nitrozotiole w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; *** p <0.01; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

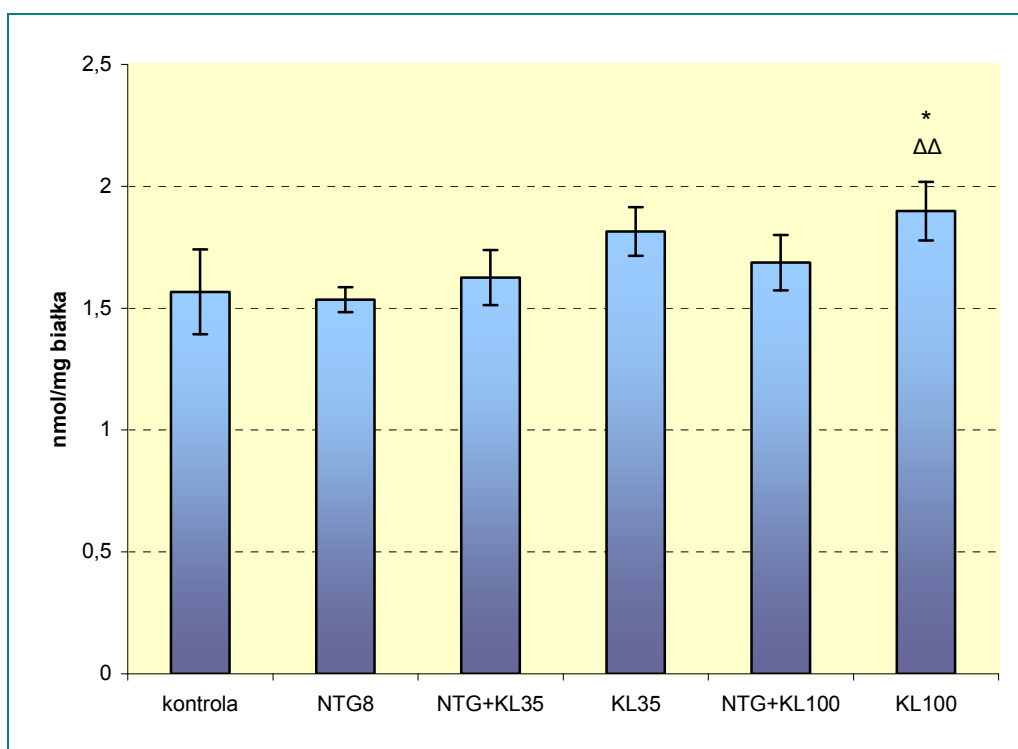
NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

13. Wpływ wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na poziom siarki sulfanowej oraz aktywność rodanazy w sercach, wątrobach, nerkach i mózgach szczurów

Stężenie siarki sulfanowej w sercach szczurów w grupie kontrolnej oznaczono na poziomie 1,57 nmola/mg białka, (Wykres 58). W grupach otrzymujących nitroglicerynę stężenia były podobne. W grupie KL35, której podawano tylko kwas α -liponowy w mniejszej dawce, stężenie siarki sulfanowej w sercach było nieznacznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (wzrost o 15,8%). Natomiast w grupie KL100, która otrzymywała również tylko kwas α -liponowy, ale w większej dawce, stężenie siarki sulfanowej w sercach było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną (wzrost o 21,2%).

Wykres 58. Stężenia siarki sulfanowej w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

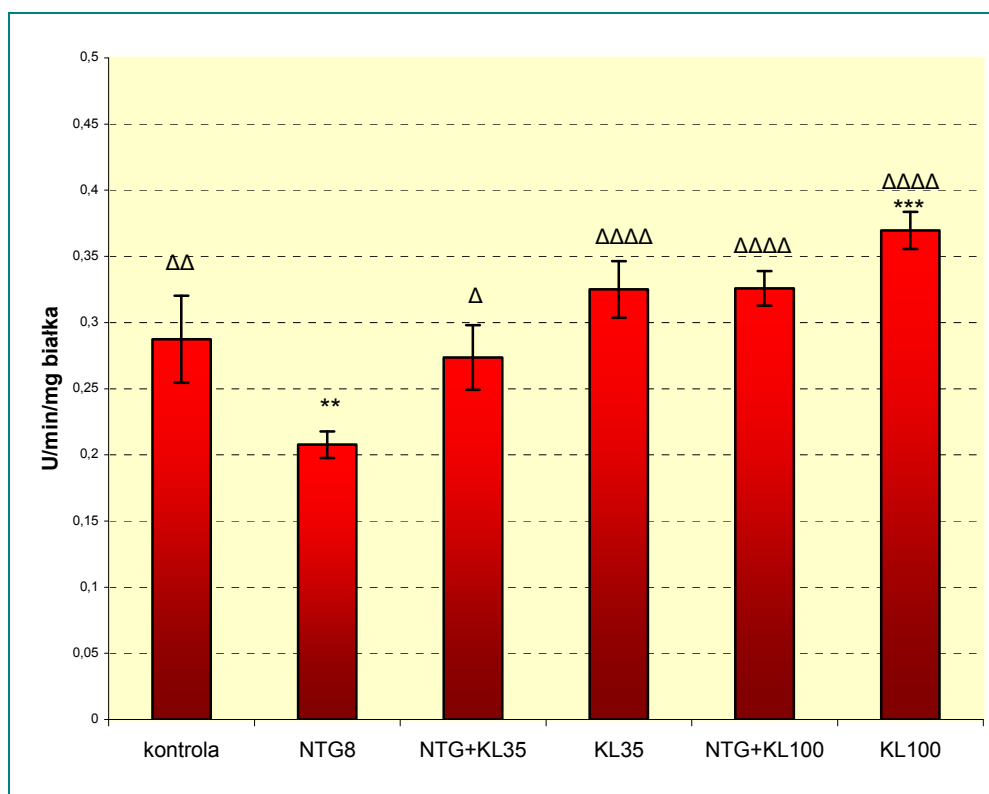
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Poziom aktywności rodanazy w sercach szczurów był istotnie statystycznie niższy w grupie, w której rozwinęła się tolerancja na nitroglicerynę w porównaniu z pozostałymi grupami, (Wykres 59). Aktywność tego enzymu w tej grupie spadła o 27,7%, w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej. W grupach NTG+KL35 i NTG+KL100, którym równolegle z nitrogliceryną podawano kwas α -liponowy, aktywność rodanazy była istotnie statystycznie wyższa odpowiednio o 31,7% oraz 56,9%, w porównaniu do grupy NTG8 (tolerancja na nitroglicerynę). W grupie KL100, otrzymującej tylko kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień, poziom aktywności rodanazy w sercach był znamienne statystycznie wyższy w porównaniu do aktywności kontrolnej i wynosił 128,6% poziomu kontrolnego.

Wykres 59. Poziomy aktywności rodanazy w sercach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ ; * p <0.05; ** p <0.02; **** p <0.001;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

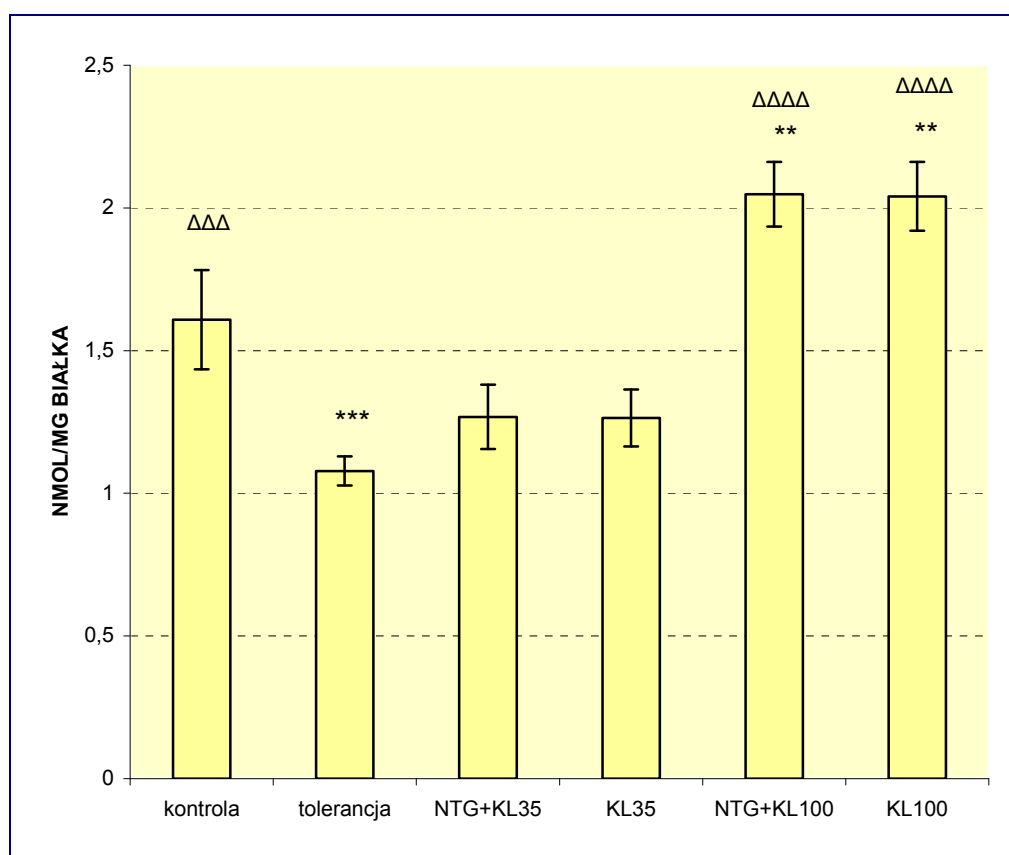
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Stężenie siarki sulfanowej w wątrobach w grupie NTG8 było istotnie statystycznie niższe w porównaniu do stężenia kontrolnego, (Wykres 60). W grupach, którym podawano kwas α -liponowy w dawce 35 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni nie obserwowano istotnych statystycznych różnic w stężeniach siarki sulfanowej w porównaniu do stężenia w grupie kontrolnej oraz w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę. Natomiast w grupach otrzymujących kwas α -liponowy w większej dawce, stężenia siarki sulfanowej istotnie statystycznie wzrosły w porównaniu ze stężeniami w grupie kontrolnej oraz w grupie z tolerancją na nitroglicerynę.

Wykres 60. Stężenia siarki sulfanowej w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

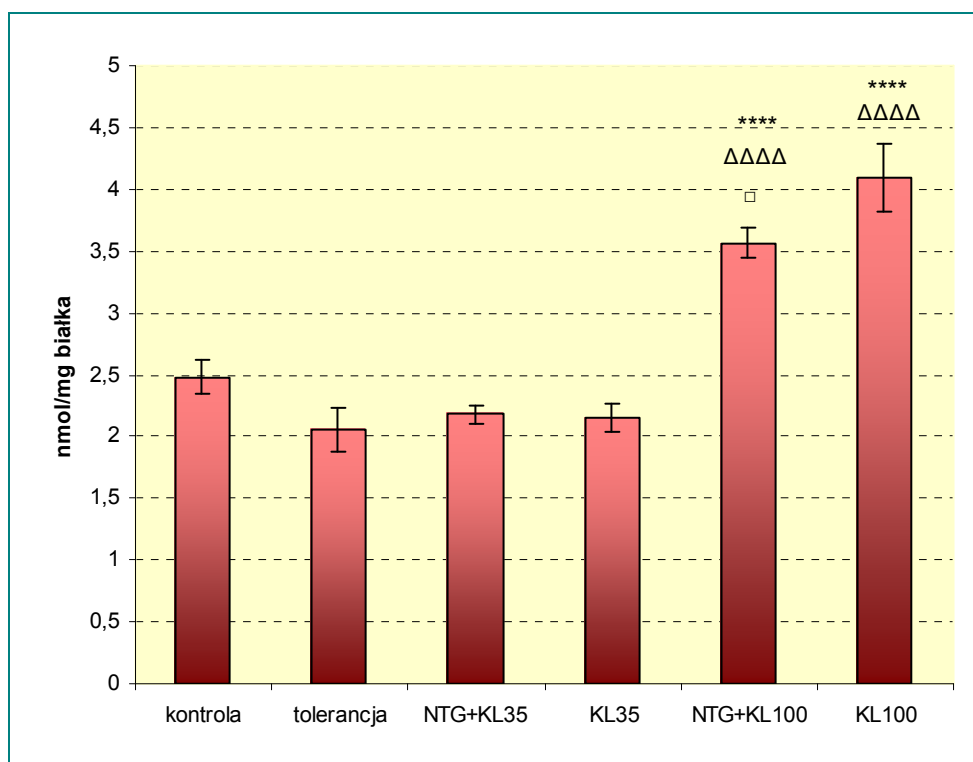
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W nerkach stężenie siarki sulfanowej wzrosło istotnie statystycznie w porównaniu do stężenia kontrolnego w grupach otrzymujących kwas α -liponowy w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni (grupy: NTG+KL100 i KL100), (Wykres 61). Nie było istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupą z tolerancją na nitroglicerynę.

Wykres 61. Stężenia siarki sulfanowej w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL100 – □; * $p < 0.05$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

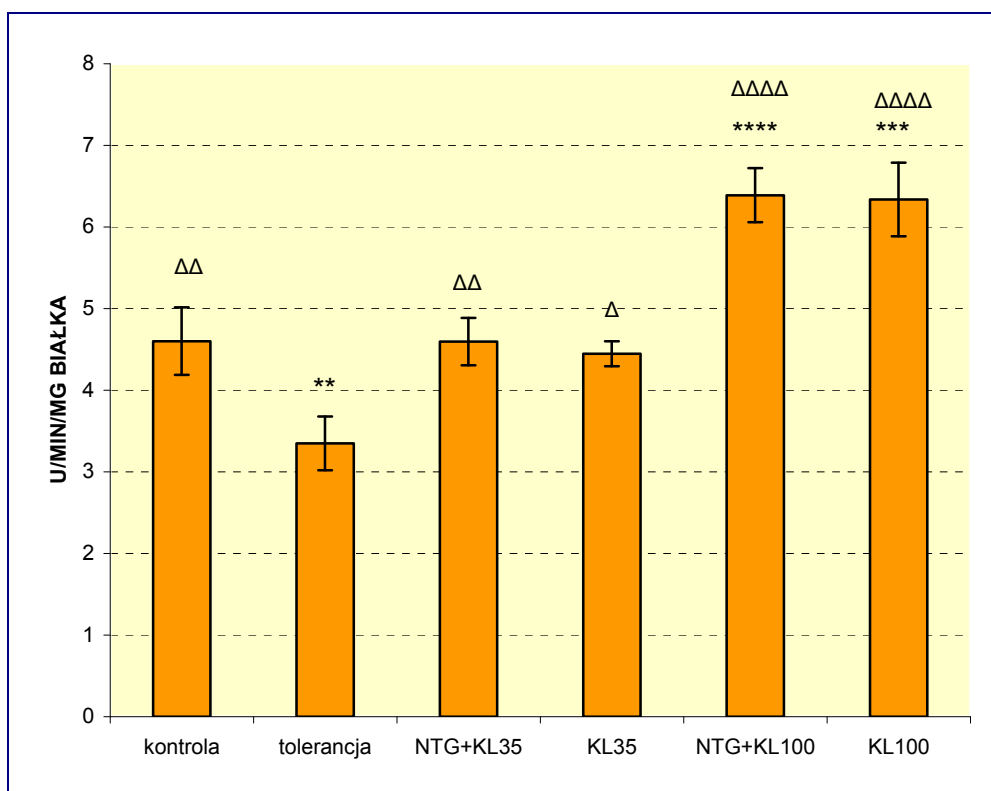
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Aktywność rodanazy w wątrobach w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej, (Wykres 62). W grupach NTG+KL35 i KL35 aktywność tego enzymu w wątrobach była na poziomie kontrolnym, a w grupach NTG+KL100 i KL100 była istotnie statystycznie podwyższona w porównaniu do aktywności kontrolnej.

Wykres 62. Poziomy aktywności rodanazy w wątrobach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - * lub do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

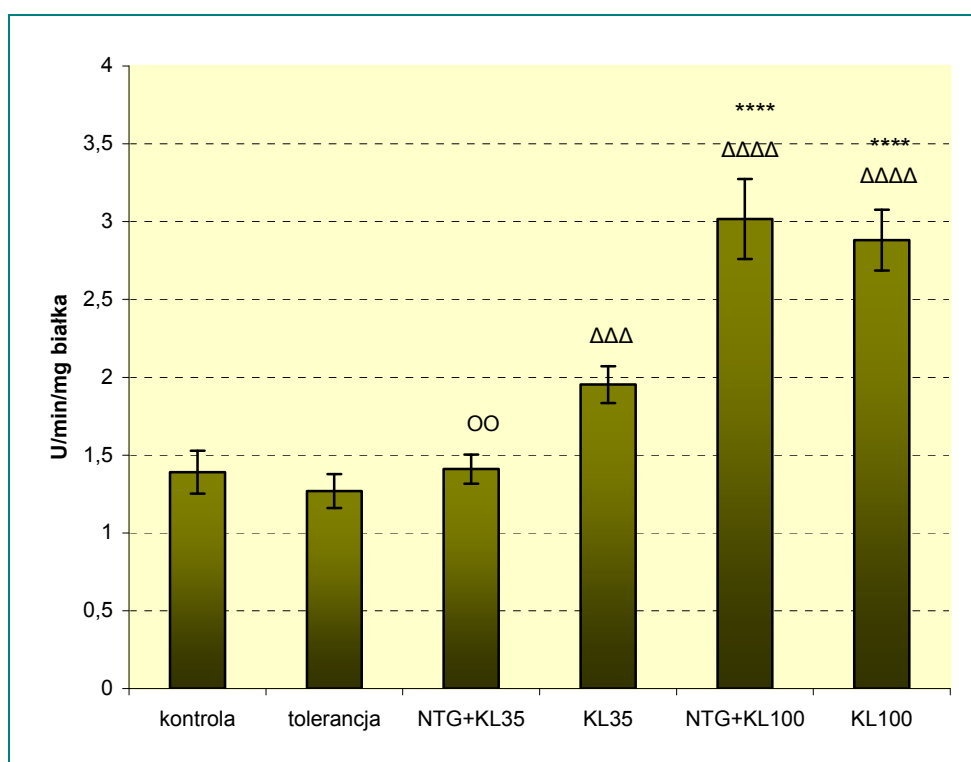
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

W nerkach nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w aktywności rodanazy pomiędzy grupami: kontrolną i NTG8. Aktywność rodanazy była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do aktywności w grupie kontrolnej w grupach, którym podawano tylko kwas α -liponowy oraz w grupie NTG+KL100. Znotowano także istotną statystycznie różnicę pomiędzy aktywnością rodanazy w grupach: NTG+KL35 i KL35, (Wykres 63).

Wykres 63. Poziomy aktywności rodanazy w nerkach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL35 – o; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

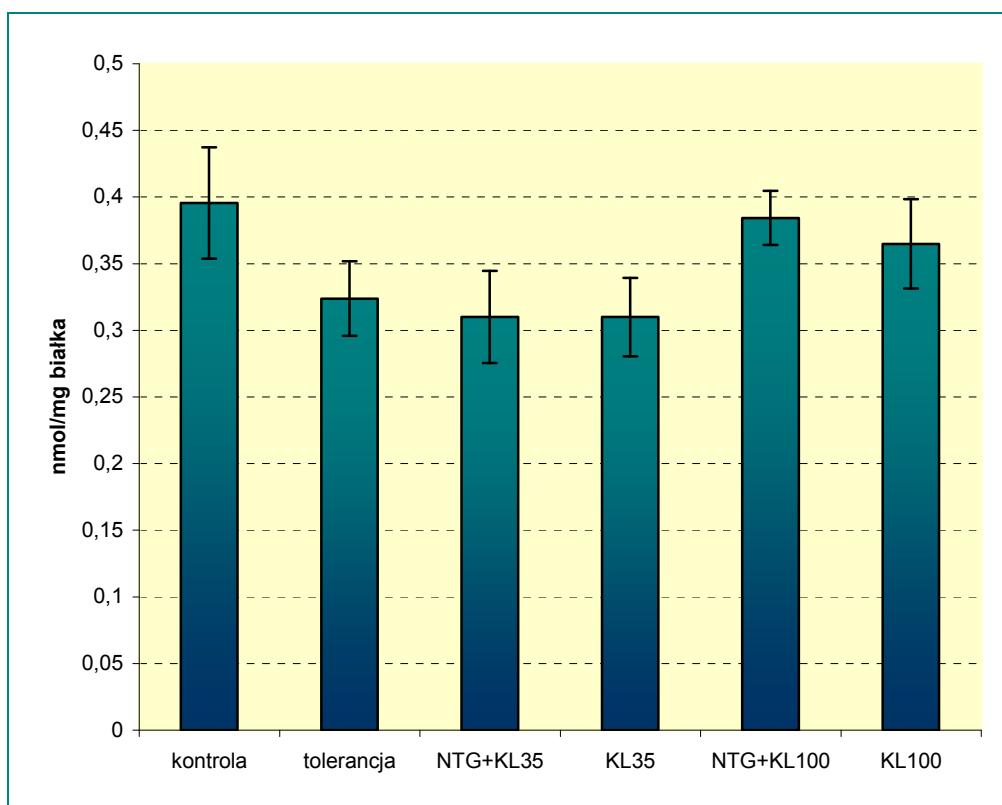
KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Tolerancja na nitroglicerynę nie miała istotnego wpływu na poziom siarki sulfanowej oraz aktywność rodanazy w mózgach badanych szczurów. Stężenia siarki sulfanowej w mózgach nie zmieniały się istotnie statystycznie w poszczególnych grupach, (Wykres 64). Aktywność rodanazy w mózgach zwierząt, którym podawano kwas α -liponowy była nieznacznie niższa od aktywności w grupie kontrolnej, (Wykres 65).

Wykres 64. Stężenia siarki sulfanowej w mózgach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

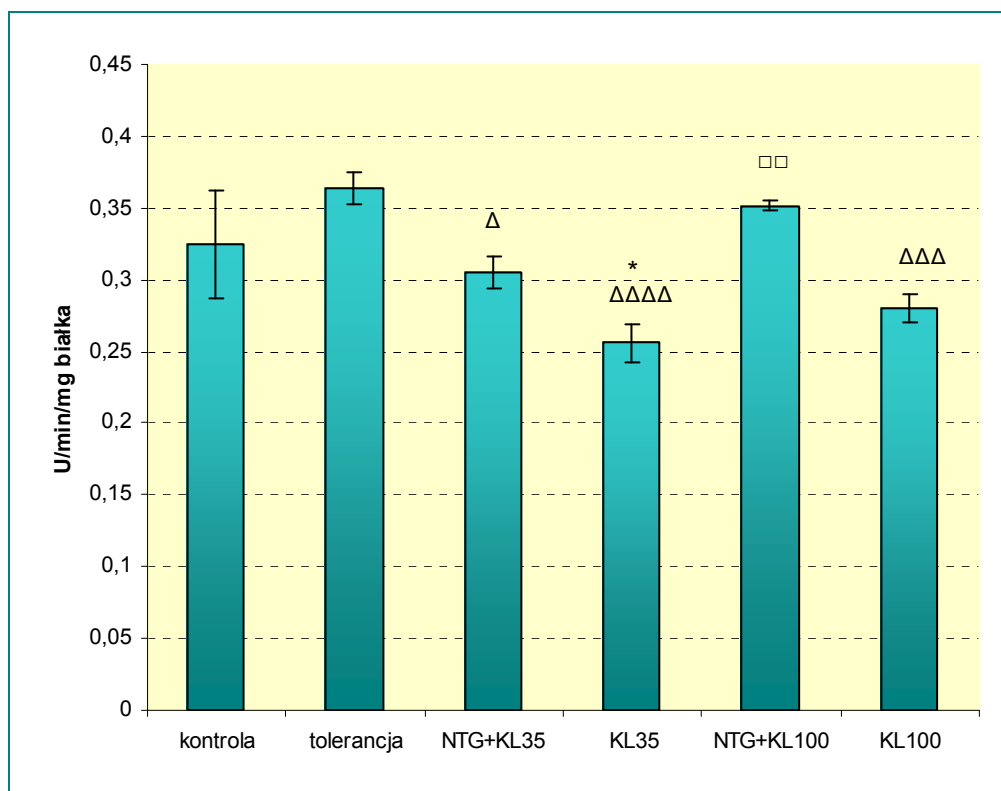
NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

Wykres 65. Poziomy aktywności rodanazy w mózgach szczurów w badanych grupach



Wyniki przedstawiają średnie $\pm$ SEM z 8 zwierząt w grupie; Różnica statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej - *, do grupy NTG8 (tolerancja) – Δ lub do grupy KL100 – $\square$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$;

NTG8 – tolerancja na nitroglicerynę;

NTG+KL35 – 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

KL35 – 8 dni kwas liponowy 35 mg/kg m.c./dzień;

NTG+KL100 - 8 dni nitrogliceryna 3 x 10 mg/kg m.c./dzień + 8 dni kwas liponowy 100 mg/kg m.c./dzień;

KL100 – 8 dni kwas liponowy 2 x 50 mg/kg m.c./dzień;

VII. Dyskusja

Przeprowadzone badania farmakologiczne miały na celu zbadanie wpływu kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji na nitroglicerynę. Przypuszczano bowiem zgodnie z najnowszymi teoriami, że ten związek tiolowy, jako bardzo silny antyoksydant może zapobiegać rozwojowi tolerancji po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny. Przeprowadzone badania biochemiczne wykonano w celu zbadania mechanizmu działania kwasu α -liponowego w powyżej przedstawionym aspekcie oraz próby wyjaśnienia przyczyny tolerancji na nitroglicerynę.

Mimo, że nitrogliceryna jest stosowana od ponad 100 lat, a zjawisko tolerancji opisano niedługo potem [2], to do tej pory nie wyjaśniono przyczyny jej powstawania, a jest to poważny problem kliniczny ze względu na jej powszechne stosowanie. Zjawisko tolerancji na nitroglicerynę objawia się spadkiem siły działania klinicznego i hemodynamicznego leku [25, 47]. Wiąże się to z ograniczeniem stosowania całej grupy leków – nitratów [61]. Poszukuje się zatem skutecznych i bezpiecznych związków mogących zapobiec temu zjawisku. Do tej pory przebadano wiele związków w różnych modelach doświadczalnych tolerancji na nitroglicerynę, włączając inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, blokery receptorów AT_1 , statyny, L-argininę, BH_4 , ebselen, kwas moczowy, kwas askorbowy, które dzięki swoim właściwościom w różnym stopniu zapobiegają powstawaniu tolerancji na nitroglicerynę. Jednak nadal stawia się pytanie: jaki jest mechanizm powstawania tolerancji na nitroglicerynę i czy można zapobiegać jej rozwojowi poprzez podawanie innego leku/związku?

W badaniach stosuje się różne modele wywoływania tolerancji na nitroglicerynę, np.: podanie podskórnie szczurom: dużej dawki – 100 mg/kg m.c., przez 3 dni [135], dawki 15 mg/kg m.c./dzień przez 8 tygodni [55, 56], myszom dawki 20 mg/kg m.c. trzy razy dziennie przez trzy dni [124], podanie w postaci plastrów na skórnych szczurom dawki 15 mg/24 h przez dwie doby [65] dawki 0,4 mg/h przez 48 godzin [28] lub dawki 62 mg/kg/dzień przez 48 godzin [66], infuzja dożylna szczurom dawki: 0,2 mg/godzinę przez 3 dni [44], 0,5 mg/godzinę przez 3 dni [86], 0,48 μ mol/godzinę przez 3 dni [115], myszom dawki: 25 μ g/godzinę przez 4 dni [88]. W niniejszych badaniach tolerancję na nitroglicerynę uzyskano u szczurów po 8 dniach podawaniu nitrogliceryny 3 razy dziennie w dawce 10 mg/kg m.c./dzień. Objawiała się ona brakiem spadku ciśnienia tętniczego krwi w dziewiątym dniu po dożylnym podaniu 150 μ g/kg m.c. nitrogliceryny. Krótsze podawanie

podskórną nitroglicerynę przez 4 dni w analogicznej dawce nie prowadziło do rozwoju tolerancji. W piątym dniu po podaniu nitrogliceryny dożylnie, w pierwszych minutach obserwowano wyraźny, znamieny statystycznie spadek ciśnienia tętniczego. Potwierdza to, że zjawisko tolerancji na nitroglicerynę występuje dopiero po odpowiednio długim czasie jej stosowania, zależnym od dawki. Taki schemat rozwoju tolerancji na nitroglicerynę stosowali wcześniej również Zhou i współpracownicy [135, 136]. Model wywołania tolerancji przez podawanie nitrogliceryny podskórną, jest najbardziej zbliżony do stosowania podjęzykowego nitrogliceryny przez pacjentów.

W grupach, którym podawano jedynie nitroglicerynę, zarówno przez 4 dni, jak i przez 8 dni zaobserwowano istotny statystycznie ($P < 0,001$) spadek ciśnienia tętniczego krwi, zmierzonego przed podaniem dożylną nitrogliceryny, w porównaniu do wyjściowego ciśnienia w grupie kontrolnej. Mogłoby to świadczyć, że nitrogliceryna przewlekłe stosowana obniża ciśnienie tętnicze krwi. Jednak w pracach znalezionych w literaturze nie obserwowano spadku ciśnienia tętniczego po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny podskórną [20, 135, 136].

Kwas α -liponowy podawany w dawce 100 mg/kg m.c./dzień przez 8 dni nie wpływał na ciśnienie tętnicze krwi. Wcześniejsze badania także wskazują, iż kwas α -liponowy nie obniża ciśnienia tętniczego krwi po przewlekłym podawaniu u szczurów normotensyjnych [84, 117, 119], ale wykazuje takie działanie u szczurów z nadciśnieniem [84, 117, 123]. W niniejszych badaniach podawanie dootrzewnowo kwasu α -liponowego w dawce 35 mg/ mg m.c., przez 8 dni prowadziło do istotnego statystycznie spadku wyjściowego ciśnienia tętniczego krwi.

Kwas α -liponowy nie powodował nasilenia efektu hipotensyjnego nitrogliceryny podanej dożylną w dawce 150 μ g/kg m.c.. Jest to bardzo istotne, ponieważ wskazuje, że spadek ciśnienia tętniczego krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w dawce 150 μ g/kg m.c. u szczurów z grupy, która otrzymywała przez 8 dni równolegle kwas α -liponowy i nitroglicerynę, wynika tylko z działania nitrogliceryny. Kwas α -liponowy przeciwdziałał tu jedynie rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę, nie wpływał natomiast na efekt hipotensyjny leku.

Kwas α -liponowy podany w dawce 35 mg/kg m.c. w 8 dniu rozwoju tolerancji na nitroglicerynę nie wykazał oczekiwanego efektu. W grupie, w której był podawany przez 8 dni w dawce 35 mg/kg m.c. równolegle z nitrogliceryną, po dodaniu dożylną nitrogliceryny w 9 dniu obserwowano efekt hipotensyjny, jednak nie był on tak wyraźny jak w grupie kontrolnej. Natomiast podawanie kwasu α -liponowego w dawce 50 mg/kg m.c.

2 razy dziennie przez 8 dni równoległe z nitrogliceryną zapobiegło rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę, (Wykres 3). W grupie tej doszło do spadku ciśnienia tętniczego krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny w 9 dniu. Mechanizm tego działania wiąże się na pewno z właściwościami antyoksydacyjnymi kwasu α -liponowego. Dowodzą tego przeprowadzone badania, które wykazały wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) i malonylodialdehydów (MDA) oraz zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POX) w tkankach oraz osoczu zwierząt z tolerancją na nitroglicerynę. Nie obserwowano tego u zwierząt którym równocześnie podawano kwas α -liponowy. Wzrost poziomów RFT i MDA dowodzi, iż tolerancji na nitroglicerynę towarzyszy rozwój stresu oksydacyjnego, co potwierdzają także inne badania [46, 48, 115, 116].

W badaniach *in vitro* dowiedziono, że ditirole takie jak ditiotreitol i kwas α -liponowy powodują odzyskiwanie aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH-2) [27, 48, 127]. Ponieważ ALDH-2 pośrednio wykazuje aktywność antyoksydacyjną przez zapobieganie akumulacji toksycznych aldehydów [128], działanie kwasu α -liponowego w zapobieganiu rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę prawdopodobnie może także polegać na podtrzymywaniu aktywności antyoksydacyjnej pośrednio, przez odzyskiwanie aktywności tego enzymu. Obecnie uważa się, że ALDH-2 jest enzymem uczestniczącym w biotransformacji nitrogliceryny [6, 18, 91, 127], więc odzyskiwanie aktywności tego enzymu przez kwas α -liponowy wiąże się też z niedopuszczeniem do blokowania przemian nitrogliceryny, co może także być mechanizmem zapobiegania rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę.

Wzrost produkcji RFT obserwowany jest w wielu chorobach związanych z układem naczyniowo-sercowym, takich jak miażdżca i nadciśnienie [16, 58, 67, 68, 110, 121, 126] i jest on związany ze zmniejszeniem odpowiedzi śródbłónka na NO [67]. RFT obniżają poziom cykazy guanylanowej i zaburzają rozszerzanie naczyń na drodze NO/cGMP [37]. Zmniejszenie powstawania reaktywnych form tlenu zapobiega dysfunkcji śródbłónka i umożliwia rozszerzanie naczyń na drodze NO/cGMP. Kwas α -liponowy dzięki działaniu antyoksydacyjnemu poprawia funkcję śródbłónka w różnych stanach chorobowych [69, 106, 113]. Kwas α -liponowy zmniejsza stres oksydacyjny występujący w stanie tolerancji na nitroglicerynę, przywraca działanie hipotensyjne nitrogliceryny, co może być związane z poprawą funkcji śródbłónka zaburzonych w tolerancji na nitroglicerynę.

W stresie oksydacyjnym poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych, powiązanych w detoksykację reaktywnych form tlenu, takich jak dysmutaza nadadtlenkowa (SOD) i katalaza obniża się [71, 107, 120]. U szczurów z wywołaną podaniem

streptozotocyny cukrzycą następuje także spadek poziomu tych enzymów i ich mRNA. Kwas α -liponowy podnosi aktywność i poziom obydwu enzymów, nie wpływając jednak na mRNA. Działa więc na poziomie translacji [107]. Obniżony poziom SOD obserwuje się także u chorych na miażdżycę naczyń [67], czy na nadciśnienie [121]. Wykazano, że wzrost powstawania anionorodnika nadtlenowego i spadek aktywności SOD towarzyszy również tolerancji na nitroglicerynę [29, 92]. W przedstawionych badaniach także poziom aktywności SOD w tolerancji zostaje obniżony, a kwas α -liponowy przywraca aktywność enzymu. Dalsze badania dotyczące poziomu białka enzymu i jego mRNA pozwoliłyby określić, na jakim etapie kwas α -liponowy działa w tym przypadku. Wiadomo, że aktywność SOD jest kluczowa dla dostępności NO w śródbłonku, a spadek jej aktywności prowadzi do zaburzeń rozszerzania naczyń zależnego od NO [67]. Podawanie antyoksydantów lub SOD przywraca działanie NO w naczyniach, zaburzone w stanie stresu oksydacyjnego, w takich chorobach jak cukrzyca, czy nadciśnienie [67, 68, 109]. Dlatego kwas α -liponowy podnosząc aktywność SOD w aortach w czasie przewlekłego stosowania nitrogliceryny może korygować działanie NO na naczynia.

Niniejsze badania wykazały, iż w stanie tolerancji na nitroglicerynę dochodzi do wzrostu aktywności peroksydazy glutationowej (POX) w aortach, sercach, wątrobie, nerkach oraz mózgach, choć teoretycznie można byłoby się spodziewać spadku aktywności tego enzymu w związku ze stresem oksydacyjnym. W obecności kwasu α -liponowego nie dochodzi do tego wzrostu. Inaczej jednak jest w osoczu, gdzie w tolerancji na nitroglicerynę obserwujemy spadek aktywności POX. Wzrost aktywności peroksydazy glutationowej w tkankach oznacza, iż nitrogliceryna wzmacnia tę część obrony antyoksydacyjnej oraz że jest to enzym adaptacyjny w przebiegu tolerancji na nitroglicerynę, co sugeruje powiązanie tego enzymu w jej patomechanizm. Jednak pomimo wzrostu aktywności tego enzymu w tkankach, procesy peroksydacyjne są wciąż nasilone, a aktywność innego enzymu antyoksydacyjnego SOD jest obniżona, co świadczy o roli SOD w tolerancji. Podobny wzrost aktywności POX i spadek aktywności SOD obserwowano u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym [105], gdzie również rola stresu oksydacyjnego jest niezaprzeczalna.

W niniejszych badaniach nie wykazano istotnych różnic w aktywności katalazy (CAT) w osoczu, sercach oraz mózgach szczurów z tolerancją na nitroglicerynę. Podobnie wzrost aktywności POX i brak zmian aktywności katalazy stwierdzono w sercach u szczurów z nadciśnieniem [108]. Również w wątrobie i nerkach dochodzi do spadku aktywności CAT w stanie tolerancji na nitroglicerynę, co oznacza wzrost stresu oksydacyjnego także w tych narządach i zmniejszenie się związanej z tym obrony antyoksydacyjnej. Spadek

aktywności CAT w wątrobie i nerkach szczurów obserwowano również w cukrzycy wywołanej podawaniem fruktozy, czemu także towarzyszy wzrost stresu oksydacyjnego [120]. W obu przypadkach tj.: tolerancji (Wykres 42 i 45), jak i hiperinsulinemii kwas α -liponowy wyrównywał poziom aktywności katalazy do poziomu kontrolnego.

W literaturze brak jest uniwersalnego schematu wyjaśniającego wpływ stresu oksydacyjnego na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Spadkowi aktywności enzymów przypisuje się ich inaktywację przez reaktywne formy tlenu, podczas gdy wzrost wskazuje na mechanizmy adaptacyjne w warunkach stresu oksydacyjnego [104].

Poziom tioli niebiałkowych nieznacznie spada w sercach zwierząt z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę (Wykres 25), czemu towarzyszy istotny statystycznie spadek aktywności γ -glutamylotranspeptydazy (Wykres 29). Spadek aktywności tego enzymu zaobserwowano także w nerkach w stanie tolerancji na nitroglicerynę, co może powodować spadek poziomu zredukowanego glutationu i cysteiny w pozostałych tkankach. Zważywszy na fakt, iż zredukowany glutation stanowi prawie całą pulę komórkowych tioli niebiałkowych (ok. 95%), dziwnym jest, że w niniejszych badaniach poziom tioli niebiałkowych nie ulega istotnemu spadkowi w tkankach i osoczu, w stanie tolerancji, w czasie nasilonego stresu oksydacyjnego. Oznaczenia jednak nie przeprowadzono w aortach, gdzie spadek mógłby wystąpić, ponieważ badania innych autorów wskazują na istotny spadek poziomu zredukowanego glutationu w śródbłonku naczyń w tolerancji na nitroglicerynę [12, 63, 95].

Spadek poziomu tioli niebiałkowych może wiązać się z nasileniem biodegradacji nitrogliceryny przy udziale S-transferazy glutationowej, enzymu wymagającego zredukowanego glutationu jako kofaktora [95]. W niniejszych badaniach aktywność S-transferazy glutationowej spada w osoczu i sercach w stanie tolerancji na nitroglicerynę. Podobny efekt występuje w wątrobie. Istnieją badania wykazujące, że nitrogliceryna częściowo inaktywuje S-transferazę glutationową w wątrobie, co jest związane z utlenieniem grupy $-SH$ tego enzymu [70]. Obserwacja ta potwierdza udział tego enzymu w biodegradacji nitrogliceryny, a także jej ewentualny wpływ na tolerancję na ten lek. Kwas α -liponowy przywraca aktywność tego enzymu w osoczu, sercach i wątrobie, co może być również związane z przeciwdziałaniem tego ditiołu rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę.

Korzystny wpływ kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji na nitroglicerynę jest niewątpliwie związany z jego działaniem antyoksydacyjnym. Nie należy zapominać, iż związek ten posiada grupy tiolowe, a w tolerancji na nitroglicerynę dochodzi do spadku poziomu zredukowanych tioli [12, 22]. Tiole są niezbędne do redukcyjnej biodegradacji nitrogliceryny do tlenku azotu, a także do biologicznego działania tlenku azotu [36, 57]. NO

ma krótki biologiczny okres półtrwania (ok. 3 s), a w obecności tioli ulega przemianie w procesie S-nitrozylacji do znacznie stabilniejszych S-nitrozotoli (SNT). Połączenia te są uważane za formy magazynowe i transportowe tlenu azotu w organizmie [50]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że poziom NO w aortach i osoczu oraz poziom S-nitrozotoli w osoczu istotnie statystycznie obniża się w stanie tolerancji na nitroglicerynę, a w grupie leczonej równolegle nitrogliceryną i kwasem α -liponowym w większej dawce nie dochodzi do tego spadku. Oznacza to, że efektem jego działania jest utrzymanie wysokiego poziomu NO, co wiąże się z niedopuszczeniem do rozwoju tolerancji na nitroglicerynę. W sercach wyniki są odwrotne: w stanie tolerancji obserwowano wzrost poziomu NO i S-nitrozotoli, a kwas α -liponowy istotnie statystycznie zmniejsza ich poziom. Przypuszczalnie może to być efektem wiązania przez kwas α -liponowy NO do SNT [129] lub z faktem, iż nadtlenoazotyny, których poziom istotnie wzrasta w stanie tolerancji na nitroglicerynę [101], szybko rozpadają się do azotanów III i V (czas półtrwania <1 s w pH fizjologicznym) [47], co może zaburzać wynik oznaczenia NO. Poziom S-nitrozotoli w stanie tolerancji jest podwyższony w wątrobach, a obniżony w nerkach, a nie ma wtedy zmian w poziomach NO w obu tkankach. Wyniki te sugerują, iż wątroba w stanie tolerancji na nitroglicerynę wykazuje tendencję do magazynowania NO w formie S-nitrozotoli.

Poza tlenkiem azotu i tlenkiem węgla, siarkowodór jest trzecim ważnym nieorganicznym gazowym mediatorem spełniającym funkcję regulatorową w układzie naczyniowo-sercowym [75]. H_2S jest uwalniany między innymi ze związków zawierających siarkę sulfanową (S^*), która jest modulatorem aktywności biologicznej tioli (przez wytwarzanie H_2S , którego jest prekursorem) i wykazuje właściwości antyoksydacyjne. Kwas α -liponowy współdziała z rodanazą w przemianach siarki sulfanowej [10, 24]. Aktywność rodanazy, związana z transferem siarki sulfanowej na różne akceptory, jak CN^- , SO_3^{2-} , może być hamowana przez S-nitrozylację grupy tiolowej zlokalizowanej w centrum aktywnym enzymu [64]. Może to wpływać na spadek powstawania H_2S w reakcji katalizowanej przez rodanazę z kwasem dihydroliponowym jako akceptorem S^* . Wykazano, że kwas α -liponowy podnosi poziom siarki sulfanowej i zwiększa aktywność rodanazy w sercu, wątrobie i nerkach szczurów [10]. Dlatego ciekawym było zbadanie: 1) czy tolerancja na nitroglicerynę będzie wpływać na powstawanie siarki sulfanowej i aktywność rodanazy oraz 2) czy działanie kwasu α -liponowego w zapobieganiu tolerancji na nitroglicerynę może być także powiązane z tą drogą jego działania. Zatem wykonano dodatkowe oznaczenia w sercach, mózgach, a także w tkankach biorących udział w metabolizmie siarki (wątroba, nerki). Pomimo tego, że największe stężenie siarki sulfanowej występuje w nerkach, w niniejszych badaniach w stanie

tolerancji na nitroglicerynę obserwowano tylko niewielki, nie istotny statystycznie spadek jej poziomu w tych narządach. W sercach także nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomach siarki sulfanowej pod wpływem przewlekłego podawania nitrogliceryny, ale aktywność rodanazy w stanie tolerancji na nitroglicerynę istotnie statystycznie spadła. W mózgach też nie wykazano zmian. Natomiast w wątrobie zarówno poziom siarki sulfanowej, jak i aktywność rodanazy w stanie tolerancji na nitroglicerynę istotnie statystycznie się obniżyły, co sugeruje udział w reakcjach antyoksydacyjnych, jak i zahamowanie transportu siarki sulfanowej na różne akceptory. Ponieważ H_2S pozostaje w równowadze z siarką sulfanową, może to zaburzać jego poziom i właściwości naczyniorozszerzające. Wynika z tego, że tolerancja na nitroglicerynę również może wpływać na powstawanie i transport siarki sulfanowej w poszczególnych narządach. Wydaje się jednak, że zmiany poziomu siarki sulfanowej są w tym przypadku konsekwencją stresu oksydacyjnego towarzyszącego tolerancji na nitroglicerynę. Niniejsze badania także wskazują, iż kwas α -liponowy podnosi aktywność rodanazy i poziom siarki sulfanowej w sercach, nerkach i wątrobach szczurów, co jak się wydaje może być związane ze zmniejszeniem stresu oksydacyjnego w wyniku jego podawania.

Uważa się, że azotany organiczne są bezpiecznymi lekami, pozbawionymi potencjalnych działań toksycznych przy przewlekłym stosowaniu [81]. Niektórzy autorzy sugerują dodatkowo, iż ich stosowanie jest korzystne w przewlekłej miażdżycy, z powodu kompensacji spadku dostępności NO, co charakteryzuje ten stan chorobowy [101]. Leczenie nitrataми prowadzi do rozszerzenia mięśni gładkich w naczyniach, układzie oddechowym, pokarmowym, moczowym, rozrodczym. Egzogenny NO może także wpływać na fizjologiczne funkcje płytek, układu immunologicznego i nerwowego. Dlatego nitraty są stosowane nie tylko w chorobach związanych z układem naczyniowo-sercowym, ale także np.: do rozszerzania szyjki macicy, w terapii jaskry, impotencji, skurczach zwieraczy, osteoporozie [25].

Jednak liczne badania wskazują, iż to przekonanie o bezpieczeństwie stosowania nitratów jest nie do końca właściwe. Do głównych działań niepożądanych w wyniku stosowania nitrogliceryny należą: niedociśnienie, ból głowy i tolerancja [51]. Badania u ludzi leczonych nitrogliceryną wskazują na poważne zaburzenia w funkcji śródbłonna: zmiany w odpowiedzi na środki rozszerzające naczynia zależne od śródbłonna, zarówno w tętnicach wieńcowych, jak i obwodowych [125]. Udowodniono, że terapia nitrogliceryną powoduje wzrost produkcji wolnych rodników w mitochondriach w sercu oraz zaburzenia aktywności

ALDH-2 w aortalnej, co świadczy o poważnych zaburzeniach w oddychaniu mitochondrialnym i zużywaniu tlenu [101]. Dodatkowo zaburzenie aktywności ALDH-2 prowadzi do akumulacji reaktywnych, toksycznych aldehydów, a w konsekwencji do zniszczeń w organizmie, co wykazano w wątrobie [71], mózgu, erytrocytach, kardiomiocytach [51].

Przeprowadzone badania pokazują, iż w tolerancji na nitroglicerynę występują zaburzenia związane ze stresem oksydacyjnym: wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych, spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD), wywołane wielokrotnym podaniem nitrogliceryny. Zmiany te obecne są nie tylko w ścianach naczyń krwionośnych, ale także w takich narządach jak: serce, wątroba, nerki, czy nawet w mózgu. Uzyskane wyniki wskazują jak ważnym z punktu widzenia klinicznego jest poznanie przyczyn powstawania tolerancji na nitroglicerynę jak również znalezienie sposobu jej zapobiegania.

Przyczyny pojawiania się tolerancji na nitroglicerynę nie są do końca wyjaśnione i od wielu lat wysnuwa się różne hipotezy na ten temat. Znalezienie rozwiązania tego problemu jest bardzo ważne z punktu widzenia współczesnej medycyny, gdyż nitrogliceryna i inne nitraty są jednymi z podstawowych leków stosowanych w niedotlenieniu mięśnia sercowego.

Do tej pory opublikowano ponad 15000 artykułów traktujących o nitroglicerynie i innych nitratach, a jednak ciągle pozostaje wiele niewiadomych kwestii odnoszących się do sposobu ich działania [81]. I również wyniki zawarte w tej pracy zostały już w większości opublikowane [31, 32].

Niniejsza praca także nie rozwiązuje do końca kwestii powstawania tolerancji na nitroglicerynę i potrzeba przeprowadzić jeszcze wiele badań związanych z tym tematem, aby zbliżyć się do rozwiązania tej intrygującej od lat zagadki.

Nie mniej jednak w przedstawionej pracy wykazano, że zjawisko tolerancji na nitroglicerynę nie jest obojętne dla organizmu. W stanie tym dochodzi do rozwoju stresu oksydacyjnego w całym organizmie, obserwuje się podwyższone stężenia reaktywnych form tlenu i zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych, a także S-transferazy glutationowej i γ -glutamylotranspeptydazy w tkankach oraz osoczu. W tolerancji na nitroglicerynę obniżony jest poziom NO aortalnej i osoczu oraz S-nitrozotiolu w osoczu, a także poziom siarki sulfanowej w wątrobie oraz aktywność rodanazy w sercach i wątrobie.

Kwas α -liponowy zapobiega zmianom poziomów reaktywnych form tlenu, NO, S-nitrozotiolu i siarki sulfanowej oraz aktywności enzymów takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, katalaza, S-transferaza glutationowa, γ -glutamylotranspeptydaza i rodanaza, zaburzonym w stanie tolerancji na nitroglicerynę.

Nie budzi żadnych wątpliwości fakt, że bezpośrednie działanie antyoksydacyjne kwasu α -liponowego, przywracanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz enzymów uczestniczących w biotransformacji nitrogliceryny wiąże się z hamowaniem rozwoju tolerancji na nitroglicerynę. Wpływ kwasu α -liponowego na zjawisko tolerancji na nitroglicerynę jest niezaprzeczalny, ale poznanie wszystkich mechanizmów jego korzystnego działania w tym aspekcie wymaga dalszych badań.

VIII. Wnioski

Na podstawie zebranych wyników badań można stwierdzić, że:

- Podawanie nitrogliceryny przez 4 dni w dawce 3 x 10 mg/kg m.c./dzień nie prowadzi do rozwinięcia tolerancji na nitroglicerynę, jednakże prowadzi do obniżenia wyjściowego ciśnienia tętniczego krwi u szczurów normotensyjnych
- Podawanie nitrogliceryny przez 8 dni w dawce 3 x 10 mg/kg m.c./dzień prowadzi do rozwinięcia tolerancji na nitroglicerynę i obniżenia wyjściowego ciśnienia krwi u szczurów normotensyjnych
- Podawanie kwasu α -liponowego przez 8 dni w dawce 2 x 50 mg/kg/dzień nie wpływa na ciśnienie tętnicze krwi u szczurów
- Wielokrotne podawanie kwasu α -liponowego nie wpływa na efekt hipotensyjny nitrogliceryny podanej jednorazowo w dawce 150 μ g/kg m.c.
- Jednokrotne podanie kwasu α -liponowego w dawce 35 mg/kg m.c./dzień nie wpływa na tolerancję na nitroglicerynę
- Podawanie kwasu α -liponowego przez 8 dni w dawce 35 mg/kg m.c./dzień częściowo zapobiega rozwojowi tolerancji
- Podawanie kwasu α -liponowego przez 8 dni w dawce 2 x 50 mg/kg m.c./dzień całkowicie zapobiega rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę.
- Pojawianie się tolerancji na nitroglicerynę w wyniku wielokrotnego podawania nitrogliceryny 1) nasila procesy peroksydacyjne w naczyniach, sercu, wątrobie, nerkach i mózgu oraz wpływa w sposób zróżnicowany na enzymy antyoksydacyjne, 2) zmniejsza stężenie NO w aortach i osoczu oraz stężenie S-nitrozotioili w osoczu, 3) obniża aktywność S-transferazy glutationowej w osoczu i sercu
- Niekorzystne zmiany, związane ze wzrostem stresu oksydacyjnego, zaobserwowane podczas tolerancji na nitroglicerynę nie ograniczają się tylko do naczyń, ale występują także w innych narządach (serce, wątroba, nerki i mózg), co wydaje się być niebezpiecznym działaniem niepożądanym przy przewlekłym stosowaniu nitrogliceryny

- **Przyczyny rozwoju tolerancji na nitroglicerynę:**

- Nasilenie stresu oksydacyjnego, który może być spowodowany spadkiem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej
- Spadek aktywności S-transferazy glutationowej czyli zahamowanie jej udziału w procesie bioaktywacji nitrogliceryny
- Spadek stężenia NO w aortach i osoczu

- **Przypuszczalny mechanizm zapobiegania przez kwas α -liponowy rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę:**

- Silne działanie antyoksydacyjne
- Zmiana aktywności zaburzonych w przebiegu tolerancji na nitroglicerynę enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POX, CAT) oraz enzymów związanych z biodegradacją nitrogliceryny (S-transferaza glutationowa)
- Dostarczanie grup tiolowych, które są niezbędne w procesie biodegradacji nitrogliceryny
- Utrzymanie wysokiego poziomu tlenu azotu w aortach i osoczu

IX. Streszczenie

Nitrogliceryna jest najczęściej stosowanym lekiem w ostrych napadach dusznicy bolesnej. Jednakże przewlekłe i zbyt częste jej stosowanie prowadzi do rozwoju tolerancji, objawiającej się spadkiem siły działania klinicznego i hemodynamicznego. Mechanizm powstawania tolerancji na nitroglicerynę nie jest do końca wyjaśniony. Przypuszczalnie tolerancja na nitroglicerynę jest wynikiem wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu i załamania mechanizmów obronnych organizmu. Do tolerancji dochodzi w skutek zaburzenia procesu uwalniania NO z nitrogliceryny, przy podniesionym stężeniu reaktywnych form tlenu i zahamowania aktywności enzymów biorących udział w biotransformacji nitrogliceryny, jak np.: dehydrogenazy aldehydowej (ALDH-2).

Celem niniejszej pracy było oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji u szczurów po wielokrotnym podawaniu nitrogliceryny oraz próba wyjaśnienia mechanizmu jej powstawania.

Kwas α -liponowy wybrano do badań, ponieważ: wykazuje silne działanie antyoksydacyjne, jest zdolny do stabilizacji i regeneracji grup tiolowych, jest niezbędny do odzyskiwania aktywności ALDH-2.

Badania farmakologiczne obejmowały: oznaczenie wpływu nitrogliceryny na ciśnienie tętnicze szczura, wywoływanie tolerancji na nitroglicerynę u szczurów w badaniach *in vivo* oraz oznaczenie wpływu kwasu α -liponowego na rozwój tolerancji na nitroglicerynę, na ciśnienie tętnicze szczura po wielokrotnym podaniu, a także na efekt hipotensyjny nitrogliceryny po jednokrotnym i wielokrotnym podaniu. Wykazano, że po podawaniu nitrogliceryny przez 8 dni w dawce 10 mg/kg m.c. 3 razy na dzień dochodzi do rozwoju tolerancji na nitroglicerynę. Kwas α -liponowy podawany równolegle z nitrogliceryną w dawce 50 mg/kg m.c. 2 razy na dzień przez 8 dni zapobiegał rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę. Dowodzi tego spadek ciśnienia tętniczego krwi po dożylnym podaniu nitrogliceryny 9 dnia, przeciwnie niż w grupie z rozwiniętą tolerancją na nitroglicerynę.

Badania biochemiczne obejmowały: oznaczenie wpływu wielokrotnego podawania nitrogliceryny i kwasu α -liponowego na: 1) procesy peroksydacyjne oraz enzymy antyoksydacyjne, 2) poziom niebiałkowych tioli, aktywność S-transferazy glutationowej oraz aktywność γ -glutamylotranspeptydazy, 3) poziomy tlenku azotu oraz S-nitrozotiole, 4) poziom siarki sulfanowej i aktywność rodanazy w tkankach oraz osoczu szczura. Wykazano, że w stanie tolerancji na nitroglicerynę: 1) nasilają się procesy peroksydacyjne w naczyniach,

sercu, wątrobie, nerkach i mózgu oraz zmienione są aktywności enzymów antyoksydacyjnych, 2) zmniejszone jest stężenie NO w aortach i osoczu oraz stężenie S-nitrozotioili w osoczu, a także 3) obniżona jest aktywność S-transferazy glutationowej w osoczu i sercu. Równoczesne podawanie kwasu α -liponowego z nitrogliceryną zapobiegało tym niekorzystnym zmianom.

Na przypuszczalny mechanizm zapobiegania przez kwas α -liponowy rozwojowi tolerancji na nitroglicerynę składa się: 1) silne działanie antyoksydacyjne, 2) zmiana aktywności zaburzonych w przebiegu tolerancji na nitroglicerynę enzymów antyoksydacyjnych oraz enzymów związanych z biodegradacją nitrogliceryny, 3) dostarczanie grup tiolowych, które są niezbędne w procesie biodegradacji nitrogliceryny, 4) utrzymanie wysokiego poziomu tlenu azotu w aortach i osoczu.

Wpływ kwasu α -liponowego na zjawisko tolerancji na nitroglicerynę jest niezaprzeczalny, ale całkowite poznanie wszystkich mechanizmów jego korzystnego działania w tym aspekcie wymaga dalszych badań.

X. Literatura

1. Abou-Mohamed G, Johnson JA, Jin L, El-Remessy AB, Do K, Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Caldwell RW. Roles of superoxide, peroxynitrite and protein kinase C in the development of tolerance to nitroglycerin. *J Pharmacol Pharmacol Ther.* 2004; 308(1):289-299.
2. Abrams J, Elkayam U, Thadani U, Fung H-L. Tolerance: An Historical Overview. *Am J Cardiol* 1998;81(1A):3A-14A.
3. Agvald P, Hammar L, Gudtafsson LE. Nitroglycerin-patch induced tolerance is associated with reduced ability of nitroglycerin to increase exhaled nitric oxide. *Vascular Pharmacol.* 2005;43:449-457.
4. Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clin Chim Acta.* 2006;372:134-139.
5. Bartosz G. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.* Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa 2004;369-371,377-379.
6. Beretta M, Gruber K, Kollau A, Russwurm M, Koesling D, Goessler W, Keung WM, Schmidt K, Mayer B. Bioactivation of nitroglycerin by purified mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases. *J Biol Chem.* 2008;283(26):17873-80.
7. Bessenge E, Fink N, Skatchkov M. Dietary supplement with vitamin C prevents nitrate tolerance. *J Clin Invest.* 1998;102:67-71.
8. Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac.* 1997;29(3):315-331.
9. Bilska A, Włodek L.: Lipoic acid – the drug of the future? *Pharmacol Rep.* 2005;57:570-577.
10. Bilska A, Dudek M, Iciek M, Kwiecień I, Sokołowska-Jeżewicz M, Filipek B, Włodek L. Biological actions of lipoic acid associated with sulfane sulfur metabolism. *Pharm Rep.* 2008;60:225-232.
11. Boesgaard S, Nielsen-Kudsk JE, Laursen JB, Aldershvile J. Thiols and nitrates: reevaluation of the thiol depletion theory of nitrate tolerance. *Am J Cardiol* 1998;81(1A):21A–29A.
12. Boesgaard S. Thiol compounds and organic nitrates. *Dan Med Bull.* 1995;42:473-484.
13. Bondy SC, Guo SX. Effect of ethanol treatment on indices of cumulative oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 1994;270:349-355.
14. Booth BP, Tabrizi-Fard MA, Fung H. Calcitonin gene-related peptide-dependent vascular relaxation of rat aorta. An additional mechanism for nitroglycerin. *Biochem. Pharmacol.* 2000;15:1603-1609.

15. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Trischler HJ, Packer L, Rihn BH. α -Lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Rad Biol Med*. 1998;24(6):1023-1039.
16. Cantor EJP, Mancini EV, Seth R, Yao X-Y, Netticadan T. Oxidative stress and heart disease: cardiac dysfunction, nutrition, and gene therapy. *Curr Hyperten Rep*. 2003;5:215-220.
17. Carlson DA, Smith AR, Fischer SJ, Young KL, Packer L. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoate to healthy human subjects. *Alter Med Rev*. 2007;12(4):343-351.
18. Chen Z, Stamler JS. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trend Cardiovasc Med*. 2006;16:259-265.
19. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *PNAS*. 2002;99(12):8306-8311.
20. Chen Z, Nie S-D, Shan W, Jiang D-J, Shi R-Z, Zhou Z, Guo R, Zhang Z, Li Y-J. Decrease in endogenous CGRP release in nitroglycerin tolerance: Role of ALDH-2. *Eur J Pharmacol*. 2007;571:44-50.
21. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induce relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:2316-2323.
22. Chong S, Fung HL. Biochemical and pharmacological interactions between nitroglycerin and thiols. Effects of thiol structure on nitric oxide generation and tolerance reversal. *Biochem Pharmacol*. 1991;42:1433-1439.
23. Chung SJ, Fung HL. Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;253:614-619.
24. Cianci M, Gliubich F, Zanotti G, Berni R. Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1481:103-108.
25. Csont T, Ferdinandy P. Cardioprotective effects of glycerin trinitrate" beyond vascular nitrate tolerance. *Pharmacol Therap*. 2005;105:57-58.
26. Czech E, Hartleb M. Poliformizm genetyczny dehydrogenazy aldehydowej-2 (ALDH2) i znaczenie patofizjologiczne i kliniczne aldehydu octowego. *Alkoholizm i Narkomania*. 2003;16(1-2):11-24.
27. Daiber A, Mülsch A, Hink U, Mollnau H, Warnholtz A, Oelze M, Münzel T. The oxidative stress concept of nitrate tolerance and the antioxidant properties of hydralazine. *Am J Cardiol*. 2005;96:S25i-S36i.
28. Difabio J, Yanbin JI, Vasiliou V, Thatcher GRJ, Bennett BM. Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitrate tolerance. *Mol Pharmacol*. 2003;64:1109-1116.

29. Dikalov S, Fink B, Skatchkov M, Stalleicken D, Bassenge E. Formation of reactive oxygen species by pentaerithrityltetranitrate and glyceryl trinitrate in vitro and development of nitrate tolerance. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286:938-944.
30. Du YH, Peng J, Huang ZZ, Jiang DJ, Deng HW, Li YJ. Delayed cardioprotection afforded by nitroglycerin is mediated by alpha-CGRP via activation of inducible nitric oxide synthase. *Int J Cardiol.* 2004; 93:49-54.
31. Dudek M, Bednarski M, Bilska A, Iciek M, Sokołowska-Jeżewicz M, Filipek B, Włodek L. The role of lipoic acid in prevention of nitroglycerin tolerance. *Eur J Pharmacol.* 2008;591:203-210.
32. Dudek M, Bilska A, Bednarski M, Iciek M, Kwiecień I, Sokołowska-Jeżewicz M, Filipek B, Włodek L. The effect of nitroglycerin tolerance on oxidative stress and anaerobic sulfur metabolism in rat tissues. *Fund Clin Pharmacol.* [praca w druku].
33. Dupuis J, Lalonde G, Lemieux R, Rouleau JL. Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure: role of increased intravascular volume: volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acetylcysteine. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16:923-931.
34. Esplugues JV, Rocha M, Nunes C, Bosca I, Ibiza S, Herance JR, Ortega A, Serrador JM, D'Ocon P, Victor VM. Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. *Circ Res.* 2006;99:1067-1075.
35. Fung H-L, Booth BO, Bauer JA. Pharmacodynamics of in vivo nitrate action. *Am J Cardiol.* 1998;81(1A):15A-20A.
36. Fung HL, Chong S, Kowaluk E, Hough K, Kakemi M. Mechanisms for the pharmacological interaction of organic nitrates with thiols. Existence of an extracellular pathway for reversal of nitrates vascular tolerance by N-acetylcysteine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;245:524-530.
37. Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, Simoes DDC, Roussos C, Papapetropoulos A. Regulation of expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.* 2007;150:1084-1091.
38. Ghatta S, Hemmer RB, Uppala S, O'Rourke ST. Role of endogenous hydrogen peroxide in development of nitrate tolerance. *Vasc Pharmacol.* 2007;46:247-252.
39. Ghatta S, O'Rourke ST. Nitroglycerin-induced release of calcitonin gene-related peptide from sensory nerves attenuates the development of nitrate tolerance. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47:175-181.
40. Glasser SP. Clinical mechanisms of nitrate action. *Am J Cardiol.* 1998;81(1A):49A-53A.
41. Gori T, Burstein JM, Ahmed S. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation.* 2001;104:1119-1123.

42. Gori T, Parker JD. The puzzle of nitrate tolerance. Pieces smaller than we thought? *Circulation*. 2002;106:2404-2408.
43. Gori T, Parker JD. Nitrate tolerance. A unifying hypothesis. *Circulation*. 2002;106:2510-2513.
44. Gruhn N, Aldershvile J, Boesgaard S. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in nitroglycerin-tolerant rats. *Eur J Pharmacol*. 2001; 416:245-249.
45. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formulation. *J Biol Chem*. 1974;249:7130-7139.
46. Hanspal IS, Magid KS, Webb DJ, Megson IL. The effect of oxidative stress on endothelium-dependent and nitric oxide donor-induced relaxation: Implication for nitrate tolerance. *Nitric Oxide Biol Chem*. 2002;6(3):263-270.
47. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou M-H, Daiber A, Mollnau H, August M, Baldus S, Tsilimingas N, Walter U, Ullrich V, Münzel T. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(10):1826-1834.
48. Hink U, Daiber A, Kayhan N, Trichler J, Kraatz C, Oelze M, Mollnau H, Wenzel P, Vahl CF, Ho KK, Weiner H, Münzel T. Oxidative inhibition of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes nitroglycerin tolerance in human blood vessels. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(23):2226-2232.
49. Hink U. Nitroglycerin hits the nerve. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(11):961-963.
50. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Rad Biol Med*. 2000;28(10):1478-1486.
51. Hollenberg SM. Vasodilators in acute heart failure. *Heart Fail Rev*. 2007;12:143-147.
52. Holmquist L, Stuchbury G, Berbaum K, Muscat S, Young S, Hager K, Engel J, Münch G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. *Pharmacol. Therap*. 2007;113:154-164.
53. Hu C-P, Li Y-J, Deng H-W. The cardioprotective effects of nitroglycerin-induced preconditioning are mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol*. 1999;369:189-194.
54. Huellner MW, Schrepfer S, Wevand M, Weiner H, Wimplinger I, Eschenhagen T, Rau T. Inhibition of aldehyde dehydrogenase type 2 attenuates vasodilatory action of nitroglycerin in human veins. *FASEB J*. 2008;[epub ahead of print]
55. Husain K. Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide and oxidants/antioxidants in the rat heart. *Pharmacol Res*. 2003;48:253-261.

56. Husain K. Interaction of regular exercise and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure and rat aortic antioxidants. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1688:18-25.
57. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates and nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;218:739-749.
58. Johnson P. Antioxidant enzyme expression in heart and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2002;133:493-505.
59. Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, Nakayama K, Nakayama K. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett*. 2000;476:306-311.
60. Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerberg A, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous anti protein-containing samples. *Methods Enzymol*. 2002;359:158-168.
61. Knot HJ. Nitrate tolerance in hypertension. New insight into a century-old problem. *Circ Res*. 2003;93:799-801.
62. Kollau A, Hofer A, Russwurm M, Koesling D, Keung WM, Schmitt K, Brunner F, Mayer B. Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide. *Biochem J*. 2005;385:769-777.
63. Kurz M, Boyer TD, Whalen R, Peterson TE, Harrison DG. Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione S-transferase and relationship between NO- and NO₂-formation. *Biochem J*. 1993;292:545-550.
64. Kwiecień I, Sokołowska M, Luchter –Wasylewska E, Włodek L. Inhibition of the catalytic activity of rhodanese by S-nitrosylation using nitric oxide donors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:1645-1657.
65. Lande de la I, Stafford I, Horowitz JD. Tolerance induction by transdermal glyceryl trinitrate in rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;374:71-75.
66. Lande de la I, Stepien JM, Philpott AC, Hughes PA, Stafford I, Horowitz JD. Aldehyde dehydrogenase, nitric oxide synthase and superoxide in ex vivo nitrate tolerance in rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2004;496:141-149.
67. Landmesser U, Harrison DG, Drexler H. Oxidant stress – a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006;62:13-19.
68. Lassègue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17:852-860.

69. Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim M-S, Jo I, Oh GT, Park I-S, Youn JH, Park S-W, Lee K-U, Park J-Y. α -lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2488-2494.
70. Lee W-I, Fung H-L. Mechanism-based partial inactivation of glutathione S-transferases by nitroglycerin: tyrosine nitration vs sulfhydryl oxidation. *Nitric Oxide* 2003;8:103-110.
71. Leguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Rad Biol Med.* 2003;34(1):1-10.
72. Li Y-J, Du Y-H. CGRP-mediated cardiovascular effect of nitroglycerin. *Med Hypotheses.* 2003;60(5):693-698.
73. Liu J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient α -lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res.* 2008;33:194-203.
74. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
75. Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep.* 2007;59:4-24.
76. Mackenzie IS, Maki-Petaja KM, M, McEniery CM, Bao YP, Wallace SM, Cheriyan J, Monteith S, Brown MJ, Wilkinson IB. Aldehyde dehydrogenase 2 plays a role in the bioactivation of nitroglycerin in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1891-1895.
77. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varalakshmi P. The influence of lipoic acid on adriamycin induced nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem.* 2003;247:15-22.
78. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2003;14:288-294.
79. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J. Improved methods to measure and products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide.* 1997;1:177-189.
80. deMaster EG, Redfern B, Quast BJ, Dahlseid T, Nagasawa HT. Mechanism for the inhibition of aldehyde dehydrogenase by nitric oxide. *Alcohol.* 1997; 14(2):181-189.
81. Mayer B, Beretta M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *Br J Pharmacol.* 2008;155(2):170-184.

82. McGuire JJ, Anderson DJ, McDonald BJ, Narayanasami R, Bennett BM. Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glycerin trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem Pharmacol*. 1998;56:881-893.
83. McVeigh GE, Hamilton P, Wilson M, Hanratty CG, Leahey WJ, Devine AB, Morgan DG, Dixon LJ, McGrath LT. Platelet Nitric Oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance. Effect of supplemental ascorbate. *Circulation*. 2002;106:208-213.
84. Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, Champlain de J. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens*. 2003;16:173-179.
85. Miller MR, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol*. 2007;151:305-321.
86. Minamiyama Y, Takemura S, Hai S, Suehiro S, Okada S. Vitamin E deficiency accelerates nitrate tolerance via a decrease in cardiac P450 expression and increased oxidative stress. *Free Rad Biol Med*. 2006;40:808-816.
87. Minamiyama Y, Takemura S, Tamasaki K, Hai S, Hirohashi K, Funae Y, Okada S. Continuous administration of organic nitrate decreases hepatic cytochrome P450. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:729-735.
88. Mollnau H, Wenzel P, Oelze M, Treiber N, Pautz A, Schulz E, Schuhmacher S, Reifenberg K, Stalleichen D, Scharffetter-Kochanek K, Kleinert H, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance – comparison of nitroglycerin and pentaerithrityl tetranitrate in Mn-SOD^{+/-} mice. *BMC Cardiovascular disorders*. 2006;6(44):1-10.
89. Moon K-H, Kim B-J, Song BJ. Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *FEBS Lett*. 2005;579(27):6115-6120.
90. Münzel T, Daiber A, Mülsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005;97:618-628.
91. Münzel T, Wenzel P, Daiber A. Do we still need organic nitrates? *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(12):1296-1298.
92. Münzel T, Hink U, Yigit H, Macharzina R, Harrison DG, Mülsch A. Role of superoxide dismutase in in vivo and in vitro nitrate tolerance. *Br J Pharmacol*. 1999;127:1224-1230.
93. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Biochem*. 2002;40:463-470.
94. Nie S-D, Hu Ch-P, Chen Y-R, Wang S, Deng H-W, Li Y-J. Reversal of tolerance to nitroglycerin with vinpocetine: A role of calcitonin gene-related peptide. *Inter J Cardiol*. 2008;125:436-438.

95. Nigam R, Anderson DJ, Lee SF, Bennet BM. Isoform-specific biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic glutathione S-transferase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;279:1527-1534.
96. Ohkawa H, Ohshi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-358.
97. Orlowski M, Meister A. γ -Glutamyl-p-nitroanilide. A new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltranspeptidase activities. *Biochim Biophys Acta*. 1963;73:679-681.
98. Oroszi G, Szilvassy Z, Nemeth J, Ferdinandy P, Szolcsanyi J, Tosaki A. Interaction between capsaicin and nitrate tolerance in isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol*. 1999;368:R1-R3.
99. O'Rourke ST, Hammad H, Delagrange P, Scalbert E, Vanhoutte PM. Melatonin inhibits nitrate tolerance in isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol*. 2003;139:1326-1332.
100. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad Biol Med*. 1995;19(2):227-250.
101. Parker JD. Nitrate tolerance, oxidative stress, and mitochondrial function: another worrisome chapter on the effects of organic nitrates. *J Clin Invest*. 2004;113:352-354.
102. Parker JD, Farrell B, Fenton T, Parker JO. Effects of diuretic therapy on the development of tolerance during continuous therapy with nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:616-622.
103. Parker JD, Farrell B, Fenton T, Cohan M, Parker JO. Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. *Circulation*. 1991;84:2336-2345.
104. Rodriguez-Martinez MA, Ruiz-Torres A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev*. 1992;66:213-222.
105. Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1998;16:1267-1271.
106. Sabharwal AK, May JM. α -lipoic acid and ascorbate prevent LDL oxidation and oxidant stress in endothelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2008;309:125-132.
107. Sadi G, Yılmaz Ö, Güray T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol Cell Biochem*. 2008;309:109-116.

108. Sianz J, Wangenstein R, Gómez I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P, Vargas F. Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens*. 2005;18:871-877.
109. Schnackenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Op Pharmacol*. 2002;2:121-125.
110. Schulman IH, Zhou M-S, Raji L. Reactive Oxygen Species in hypertension and atherogenesis. *Curr Hyperten Rep*. 2005;7:61-67.
111. Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagents. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.
112. Sellke FW, Tomanek RJ, Harisson DG. L-cysteine selectively potentiates nitroglycerin-induced dilatation of small coronary microvessels. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;258:365-369.
113. Smith AR, Visioli F, Frei B, Hagen TM. Lipoic acid significantly reestores, in rats, the age-related decline in vasomotion. *Br J Pharmacol*. 2008;153(8):1615-1622.
114. Sörbo BH. W: Colwick SP, Kaplan NO. (Eds.). Rhodanese. *Methods in Enzymology*, vol. II. Academic Press, New York. 1955:334-337.
115. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mülsch A, Schulz E, Keaney JF, Stamler JS, Münzel T. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*. 2004; 113:482-489.
116. Szöcs K, Lassègue B, Wenzel P, Wendt M, Daiber A, Oelze M, Meinertz T, Münzel T, Baldus S. Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:1111-1118.
117. Takaoka M, Kobayashi Y, Yuba M, Ohkita M, Matsumura Y. Effects of α -lipoic acid on deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Eur J Pharmacol*. 2001;424:121-129.
118. Thatcher GRJ, Nicolescu AC, Bennett BM, Toader V. Mechanisms and novel directions in the biological applications of nitric oxide donors. *Free Rad Biol Med*. 2004;37(8):1122-1143.
119. Thirunavukkarasu V, Nandhini ATA, Anuradha CV. Lipoic acid attenuates hypertension and improves insulin sensitivity, kallikrein activity and nitrite levels in high fructose-fed rats. *J Comp Physiol B*. 2004;174:587-592.
120. Thirunavukkarasu V, Nandhini A, Anuradha CV. Lipoic acid restores antioxidant system in tissues of hyperinsulinaemic rats. *Ind J Med Res*. 2003; 118:134-140.
121. Touyz R. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hyperten Rep*. 2000;2:98-105.

122. Vasdev S, Gill V, Longerich L. Antihypertensive effect of alpha lipoic acid supplementation. *Cur Top Nutr Res.* 2004;2:137-152.
123. Vasdev S, Gill V. Antioxidants in the treatment of hypertension. *Inter J Angiol.* 2005;14:60-73.
124. Wang EQ, Lee W-I, Fung H-L. Lack of critical involvement of endothelial nitric oxide synthase in vascular nitrate tolerance in mice. *Br J Pharmacol.* 2002;135:299-302.
125. Warnholz A, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T. Mechanisms underlying nitrate-induced endothelial dysfunction: insight from experimental and clinical studies. *Hard Fail Rev.* 2002;7:335-345.
126. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Regulation of antioxidant and oxidant enzymes in vascular cells and implications for vascular disease. *Curr Hyperten Rep.* 2006;8:69-78.
127. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, Ho KK, Weiner H, Bachschmid M, Münzel T, Daiber A. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implication for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem.* 2007; 282(1):792-799.
128. Wenzel P, Müller J, Zurmeyer S, Schuhmacher S, Schulz E, Oelze M, Pautz A, Kawamoto T, Wojnowski L, Kleinert H, Münzel T, Daiber A. ALDH-2 deficiency increases cardiovascular oxidative stress – Evidence for indirect antioxidative properties. *Bioch Bioph Res Commun.* 2008;367:137-143.
129. Wollin S, Jones PJH. α -Lipoic acid and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2003;133:3327-3330.
130. Wood IL. Sulfane sulfur. *Methods Enzymol.* 1987;143:25-29.
131. Yang R-I, Li W, Shi Y-H, Le G-W. Lipoic acid prevents high-fat diet-induced dyslipidemia and oxidative stress: a microarray analysis. *Nutr.* 2008;24:582-588.
132. Zhang WJ, Bird KE, McMillen TS, LeBoeuf RC, Hagen TM, Frei B. Dietary alpha-lipoic acid supplementation inhibits atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient and apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2008;117:421-428.
133. Zhang WJ, Frei B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-induced and NF- κ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J.* 2001;15:2423-2432.
134. Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;144:4077-4082.

135. Zhou Z-H, Jiang J-I, Deng H-W, Li Y-J. Reversal of tolerance to nitroglycerin with N-acetylcysteine or captopril: a role of calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol.* 2002;439:129-134.
136. Zhou ZH, Deng HW, Li YJ. The depressor effect of nitroglycerin is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Life Sci.* 2001;69:1313-1320.
137. Zou M-H. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostag Lip Med.* 2007;82:119-127.