



# **GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**Michał Stanisław Majewski**

**BADANIE AKTYWNOŚCI METABOLITÓW L-TRYPTOFANU  
NA DRODZE SZLAKU KYNURENINOWEGO  
JAKO POTENCJALNYCH SUBSTANCJI O DZIAŁANIU  
WAZOAKTYWNYM**

Praca wykonana  
w Katedrze Farmakologii i Toksykologii  
Wydziału Nauk Medycznych  
UWM  
i przedstawiona  
Radzie Wydziału Farmaceutycznego  
w celu uzyskania stopnia  
doktora nauk farmaceutycznych

Promotor rozprawy  
**dr hab. n. wet Waldemar J. Grzegorzewski**

*Gdańsk 2015*

*Kolegom i Koleżankom,  
za fachową pomoc w redagowaniu tej pracy  
składam serdeczne podziękowania.*

## Spis treści

<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>6</b>
<b>WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>8</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>10</b>
1.1. Wprowadzenie .....	10
1.2. Szlak kynureninowy .....	12
1.3. Budowa i funkcja naczyń tętniczych .....	26
1.4. Przekazywanie sygnałów w komórce mięśni gładkich naczyń .....	28
1.4.1. Budowa i funkcja błony komórkowej .....	28
1.4.2. Molekularny mechanizm działania receptora $\alpha$ -1 adrenergicznego .....	28
1.4.3. Molekularny mechanizm działania receptorów naczyniowych 5-HT .....	29
1.4.4. Wpływ KCl na napięciowo zależne kanały $Ca^{2+}$ ( $Ca_v1.2$ ) obecne w błonie komórkowej mięśni gładkich naczyń .....	30
1.4.5. Kanały potasowe w komórkach śródbłonna oraz mięśni gładkich naczyń .....	30
<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>31</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY</b> .....	<b>32</b>
3.1. Materiał .....	32
3.2. Metody .....	33
3.2.1. Pomiar kurczliwości naczyń tętniczych .....	33
3.2.2. Barwienia histologiczne fragmentów naczyń .....	38
3.3. Badane związki .....	39
3.4. Analiza statystyczna .....	41
<b>4. WYNIKI</b> .....	<b>42</b>
4.1. Dobór odpowiednich stężeń substancji referencyjnych oraz dobór właściwego obciążenia spoczynkowego .....	42
4.2. Wpływ badanych związków na napięcie spoczynkowe izolowanych naczyń tętniczych .	50
4.3. Wpływ badanych związków na reaktywność naczyń tętniczych w obecności fenylefryny, serotoniny oraz KCl .....	52
4.4. Ocena preparatów histologicznych .....	78
<b>5. DYSKUSJA</b> .....	<b>80</b>
<b>6. WNIOSKI</b> .....	<b>87</b>
<b>7. TABELLE</b> .....	<b>89</b>
<b>8. PIŚMIENNICTWO</b> .....	<b>96</b>
<b>WYKAZ TABEL</b> .....	<b>114</b>
<b>WYKAZ RYCIN</b> .....	<b>115</b>
<b>ZAŁĄCZNIKI</b> .....	<b>119</b>

## STRESZCZENIE

Tryptofan należy do aminokwasów egzogennych niezbędnych do syntezy białek. W organizmie człowieka ulega trzem przemianom: dekarboksylacji z utworzeniem tryptaminy, hydroksylacji z przekształceniem w 5-hydroksytryptofan i utworzenia serotoniny (5-HT) oraz rozerwaniu pierścienia indolowego, w wyniku czego powstają kynureniny. Z puli tryptofanu aż 94% jest metabolizowane na drodze szlaku kynureninowego (KP). Przemiana ta prowadzi do powstania wielu biologicznie aktywnych związków, które mogą wykazywać względem siebie działanie antagonistyczne. Przez wiele lat KP był postrzegany jako źródło substancji wysokoenergetycznych. Dopiero kiedy odkryto, że podanie niektórych kynurenin do mózgu szczurów powodowało drgawki i zmiany w ich zachowaniu, wzrosło zainteresowanie znaczeniem kynurenin w różnych procesach chorobowych. W badaniach *in vivo* udowodniono, że zarówno tryptofan jak i pierwszy metabolit tryptofanu L-kynurenina podane obwodowo, obniżają ciśnienie tętnicze krwi u szczurów oraz działają depresyjnie na mięsień sercowy i mięśnie gładkie. W badaniach prowadzonych na izolowanych pierścieniach tętnicy wieńcowej świń, L-kynurenina, w stężeniach znacznie przekraczających fizjologiczne, powodowała relaksację obkurczonych roztworem fenylefryny naczyń aorty.

Celem niniejszej pracy było określenie bezpośredniego wpływu poszczególnych elementów KP na reaktywność izolowanych naczyń tętniczych szczura w badaniach *in vitro*. Określono także stopień aktywności naczyniowej analizowanych związków w odniesieniu do fenylefryny, 5-HT, jak również roztworu KCl. Dodatkowo podjęto próbę określenia stabilności analizowanych fragmentów izolowanych naczyń tętniczych podczas długotrwałej inkubacji.

W tym celu podjęto badanie izometrycznej odpowiedzi skurczowej izolowanych fragmentów tętnic, pochodzących z czterech różnych naczyń tętniczych szczura (aorta część zstępująca, aorta część wstępująca, tętnica płucna oraz odcinki II rzędu tętnicy krezkowej górnej) przy pomocy inkubacji tkankowych. Pobrane odcinki naczyń zostały starannie oczyszczone z tkanki łącznej, a następnie przewieszane przez światło naczynia na haczykach ze stali nierdzewnej w 5 ml komorach inkubacyjnych do badań

izolowanych naczyń (Mayflower Tissue Bath of Hugo Sachs Elektronik, Germany) w warunkach izometrycznych (F30, TAM-A typ 705/1, Hugo Sachs Elektronik, Germany). Przed przystąpieniem do właściwej analizy, wyznaczono optymalne napięcie spoczynkowe. Po ustabilizowaniu naczyń podawano do komór inkubacyjnych wzrastające, kumulacyjne dawki analizowanych związków, a następnie analizowano reakcje naczyń na zastosowane stężenia (PowerLab, ADInstruments, Australia). W czasie trwania doświadczenia medium napowietrzano karbogenem. Wykonano także barwienia hematoksylina–eozyna, w celu określenia ewentualnego nieswoistego – toksycznego działania analizowanych związków na pierścienie naczyń w czasie długotrwałej inkubacji.

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że wybrane metabolity szlaku kynureninowego wywierają wpływ rozkurczający na mięśnie gładkie naczyń. Kwas pikolinowy rozkurcza mięśnie gładkie naczyń, poddane wcześniejszemu działaniu 5-HT, a siła działania rozkurczowego zależy od pochodzenia danego odcinka naczynia. Ponadto, kwas pikolinowy w stosunkowo wysokich stężeniach wywołuje rozkurcz naczyń, poddanych wcześniejszemu działaniu fenylefryny oraz KCl. L-kynurenina rozkurcza mięśnie gładkie naczyń, poddane wyłącznie działaniu fenylefryny i KCl. Nie wpływa istotnie na naczynia poddane działaniu 5-HT. Z kolei kwas 3-hydroksyantranilowy i kwas ksanturenowy, w sposób zależny od dawki, rozkurczają mięśnie gładkie naczyń poddane wcześniejszemu działaniu 5-HT. Tryptofan, kwas kynureninowy, 3-hydroksy-L-kynurenina, kwas antranilowy, kwas chinolinowy oraz kwas nikotynowy, w zastosowanym zakresie stężeń, nie wpływają istotnie na izolowane naczynia tętnicze szczura. Usunięcie śródbłonna nie ma wpływu na działanie kynurenin, co wskazuje, że mechanizm działania rozkurczowego na naczynia, związany jest bezpośrednio z wpływem na komórki mięśni gładkich naczyń. Wyniki badań sugerują udział receptora alfa-1 adrenergicznego, receptora 5-HT<sub>2a</sub> oraz wpływ kanałów Ca<sup>2+</sup> sterowanych potencjałem w opisanym działaniu rozkurczowym na naczynia.

Otrzymane wyniki wskazują na wyższą wrażliwość naczyń oporowych, odpowiedzialnych za spadek ciśnienia np. w czasie trwania wstrząsu septycznego, w porównaniu do naczyń przewodzących. Ponadto na podstawie wykonanych eksperymentów stwierdzono, że izolowane naczynia zachowują swoją funkcjonalność przez 6 godzin trwania doświadczenia, co umożliwia przeprowadzenie badania w czasie długotrwałej inkubacji.

## SUMMARY

Tryptophan is an essential amino acid which is necessary for protein synthesis and thus must be obtained in the form of food. In the human body, it undergoes three physiological changes: decarboxylation to form tryptamine, hydroxylation, with the conversion to 5-hydroxytryptophan and serotonin (5-HT), and the last process, but not the least, results in the formation of kynurenines via the disruption of the indole ring. From the general pool of tryptophan, up to 94% is metabolized along the kynurenine pathway (KP). This transformation leads to the formation of many biologically active compounds which exhibit antagonist activity with respect to each other. For many years, KP was seen as a source of high-energy substances. Only when it was discovered that the administration of certain types of kynurenine into the rat brain caused severe seizures and changes in animal behavior, the interest in the importance of kynurenines in a variety of diseases flourished. *In vivo* studies demonstrated that both tryptophan and the first tryptophan metabolite, L-kynurenine, when administered peripherally, lowered blood pressure and depressed the contractility of heart muscle and smooth muscles in rats. Studies with isolated porcine coronary artery rings revealed that L-kynurenine at a concentration well exceeding physiological norms, caused relaxation of the phenylephrine pre-constricted aortic rings.

The aim of this study was to determine the direct impact of the KP elements on the reactivity of the isolated rat arteries during *in vitro* studies. Moreover, the degree of vascular activity of the analyzed compounds was compared to phenylephrine, KCl, as well as 5-HT activity. In addition, an attempt was made to determine the stability of the isolated rings of the arteries during prolonged incubation.

For this purpose, the isometric contractile response of isolated arterial segments from four different rat vessels [descending aorta, ascending aorta, pulmonary artery, and small (second-order) branches of the superior mesenteric artery] was performed by incubating the arterial segments in tissue chambers. Isolated blood vessels were carefully cleaned of fat and connective tissue, and mounted on stainless steel hooks in 5 ml incubation chambers to analyze the tension of the isolated blood vessels (Bath Tissue Mayflower Hugo Sachs Elektronik, Germany) under isometric conditions (F30, TAM-A Type 705/1, Hugo Sachs Elektronik, Germany). Before the proper analysis was run, the optimal resting tension was determined. After stabilization of the blood vessels, increasing concentrations of the studied compounds were added in cumulative

concentrations into the incubation chambers, and the vascular response to the applied doses was analyzed (PowerLab, ADInstruments, Australia). During the entire experiment, the medium was aerated with carbogen. Hematoxylin-eosin staining was also performed, in order to determine any non-specific, potentially toxic effect of the studied compounds on the artery rings during long-term incubation.

On the basis of the research performed, it was found that the selected metabolites of tryptophan metabolism along the KP have a relaxant effect on the vascular smooth muscles. Picolinic acid had a relaxant effect on the vascular smooth muscles subjected to a 5-HT pretreatment, and the activity and the potency depended on the origin of the particular section of the blood vessel being used. Furthermore, picolinic acid in relatively high concentrations caused vasodilation of pre-constricted artery rings with phenylephrine and KCl. L-kynurenine caused a vasorelaxation of the vascular smooth muscles treated only with phenylephrine and KCl. L-kynurenine did not affect the blood vessels treated with a 5-HT solution. In turn, the 3-hydroxyanthranilic acid and xanthurenic acid, in a dose dependent manner, caused relaxation of the smooth muscles in arteries subjected to a previous treatment with 5-HT. Tryptophan, kynurenic acid, 3-hydroxy-L-kynurenine, anthranilic acid, quinolinic acid and nicotinic acid, in the range of concentrations used, did not significantly influence the isolated rat arteries. The removal of the endothelium did not affect the obtained results, which indicates that the mechanism of action is directly related with the effect on vascular smooth muscle cells. The obtained results suggest the engagement of alpha 1 adrenergic receptor, 5-HT<sub>2A</sub> receptor and the effect of voltage gated Ca<sup>2+</sup> channels in control of the vasodilatation of isolated blood vessels.

The obtained results show a higher sensitivity of the resistance vessels (the second-order branches of the superior mesenteric artery) responsible for the drop in pressure as is found in septic shock, when compared to conduit arteries (the aorta and pulmonary artery). In addition, it was found that the isolated vessels retain their functionality for up to 6 hours during the experiment, which allows an analysis to be performed during long-term incubation.

## WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 3-HAO** – dioksygenaza kwasu 3-hydroksyantranilowego - (*ang. 3-hydroxy-anthranilic acid dioxygenase*);
- 3-OH-AA** – kwas 3-hydroksyantranilowy - (*ang. 3-hydroxyanthranilic acid*);
- 3-OH-L-KYN** – 3-hydroksykynurenina - (*ang. 3-hydroxy-L-kynurenine*);
- 5-HT** – serotonina - (*ang. 5-hydroxytryptamine*);
- A** – aorta - (*ang. aorta*);
- AA** – kwas antranilowy - (*ang. anthranilic acid*);
- BBB** – bariera krew-mózg - (*ang. blood-brain barrier*);
- cAMP** – cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan - (*ang. cyclic adenosine monophosphate*);
- DAG** – diacyloglicerol - (*ang. diacyl-glycerol*);
- ENS** – jelitowy system nerwowy - (*ang. enteric nervous system*);
- FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy - (*ang. flavin adenine dinucleotide*);
- Glu** – kwas L-glutaminowy - (*ang. glutamic acid*);
- IC<sub>50</sub>** – połowa maksymalnego stężenia hamującego - (*ang. half maximal inhibitory concentration*);
- IDO** – 2,3-dioksygenaza indoloaminy - (*ang. Indoleamine-2,3-dioxygenase*);
- IFN** – interferon - (*ang. interferon*);
- iNOS** – Indukowalna syntaza tlenku azotu - (*ang. Inducible nitric oxide synthases*);
- IP3** – trifosforan-1,4,5-inozytolu - (*ang. inositol trisphosphate*);
- KAT** – Aminotransferaza kynureninowa - (*ang. Kynurenine aminotransferase*);
- KMO** – 3-monooksygenaza kynureninowa - (*ang. Kynurenine 3-monooxygenase*);
- KP** – szlak kynureninowy - (*ang. kynurenine pathway*);
- KYNA** – kwas kynureninowy - (*ang. kynurenic acid*);
- KYNU** – Kynureninaza - (*ang. Kynureninase or L-kynurenine hydrolase*);
- L-kyn** – L-kynurenina - (*ang. L-kynurenine*);
- LPS** – lipopolisacharyd - (*ang. lipopolysaccharide*);
- NAD<sup>+</sup>** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy - (*ang. nicotinamide adenine dinucleotide*);
- NFKYN** – N-formylo-L-kynurenina - (*ang. N-formyl-L-kynurenine*);
- NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy - (*ang. N-methyl-D-aspartate*);
- NO** – tlenek azotu - (*ang. nitric oxide*);



**OUN** – ośrodkowy układ nerwowy;

**PA** – kwas pikolinowy - (*ang. picolinic acid*);

**PI(4,5)P2** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan - (*ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*);

**PKA** – Kinaza białkowa A - (*ang. Protein kinase A*);

**PKC** – Kinaza białkowa C - (*ang. Protein kinase C*);

**PLP** – fosforan pirydoksalu - (*ang. pyridoxal 5'-phosphate*);

**PLC** – Fosfolipaza C - (*ang. phospholipase C*);

**QPRT** – Fosforybozylo transferaza chinolinowa - (*ang. Quinolinate phosphoribosyl transferase*);

**QUIN** – kwas chinolinowy - (*ang. quinolinic acid*);

**RE** – retikulum endoplazmatyczne - (*ang. endoplasmic reticulum*);

**ROS** – reaktywne formy tlenu - (*ang. reactive oxygen species*);

**TK** – odcinki II rzędu tętnicy krezkowej - (*ang. second-order mesenteric arteries*);

**TP** – tętnica płucna - (*ang. pulmonary artery*);

**TPH** – Hydroksylaza tryptofanowa - (*ang. Tryptophan hydroxylase*);

**TRP** – L-tryptofan - (*ang. L-tryptophan*);

**TDO** – 2,3-dioksygenaza tryptofanowa - (*ang. Tryptophan 2,3-dioxygenase*);

**XA** – kwas ksanturenowy - (*ang. xanthurenic acid*).

## 1. WSTĘP

### 1.1. Wprowadzenie

W organizmie człowieka z puli tryptofanu (Trp), zaledwie 4% służy do biosyntezy białek, natomiast pozostała część jest metabolizowana na drodze trzech przemian:

a) na drodze szlaku kynureninowego (KP). W ten sposób metabolizowane jest aż 94% Trp [17, 32]. Podczas tej przemiany powstają liczne, aktywne biochemicznie substancje endogenne, będące w większości również aminokwasami, noszącymi wspólną nazwę „kynurenin”, od pierwszego metabolitu tryptofanu – L-kynureniny (L-kyn). Badania prowadzone na pochodnych L-kyn wskazują udział tych związków w regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych, a co za tym idzie wpływ na regulację ciśnienia tętniczego i ukrwienie tkanek [78, 79]. Metabolizm L-kyn, poprzez liczne produkty pośrednie, prowadzi do otrzymania aktywnej formy niacyny, będącej składnikiem dwóch ważnych koenzymów: dinukleotydu nikotynamidoadeninowego ( $\text{NAD}^+$ ) oraz fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego ( $\text{NADP}^+$ ), działających jako przenośniki elektronów [69]. Koenzymy te są odpowiedzialne za utrzymywanie prawidłowych funkcji fizjologicznych, prawidłowe funkcjonowanie mózgu i obwodowego układu nerwowego, udział w syntezie hormonów płciowych, kortyzolu, tyroksyny i insuliny [108].

b) hydroksylacji do 5-hydroksytryptofanu, a następnie w obecności aktywnej formy witaminy B<sub>6</sub> ulega przemianie do serotoniny (5-HT) oraz melatoniny, substancji odgrywających fundamentalną rolę w regulowaniu funkcji naczyń krwionośnych [114] oraz ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [120].

5-HT jest neuroprzebieźnikiem odpowiedzialnym za prawidłowe zachowanie seksualne [147] oraz impulsywne (agresja, nastrój) [26], a także sen i czuwanie. Ostatnie badania wykazały, że działa poprzez receptory 5-HT<sub>1B</sub> i 5-HT<sub>2A</sub> zlokalizowane w błonie komórkowej mięśni gładkich naczyń, silnie kurcząc w warunkach *in vivo* na naczynia tętnicze człowieka [41, 70], szczura [73] i królika [110, 184]. Dodatkowym działaniem 5-HT jest rozszerzenie naczyń, poprzez uwalnianie tlenku azotu (NO) z komórek śródbłonna [41] (tabela 1). Przemiany Trp w 5-HT zachodzą głównie w ścianie tętnic [110]. Czynniki takie jak stres, insulinooporność, niedobór magnezu oraz witaminy B<sub>6</sub>, jak również podeszły wiek, mają znamienity wpływ na szybkość syntezy 5-HT, spowalniając tym samym ten proces [61].

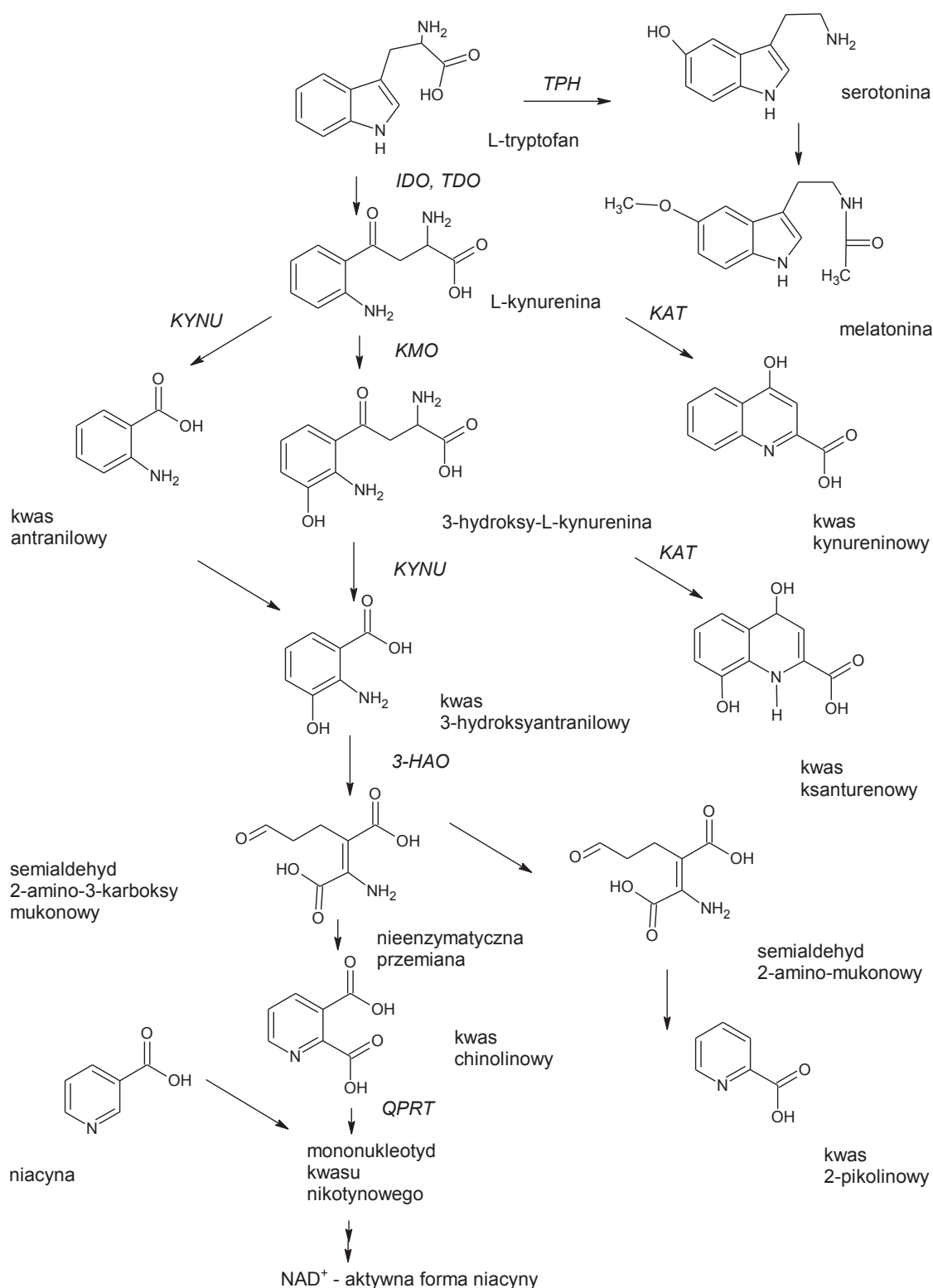
Z kolei melatonina, wydzielana podczas snu jest odpowiedzialna za zachowanie prawidłowego rytmu okołodobowego oraz za prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego. Do innych właściwości melatoniny możemy zaliczyć jej działanie obkurczające naczynia [114], antyoksydacyjne [148], przeciwzapalne [36, 100] oraz antyapoptotyczne [54, 159].

c) dekarboksylacji do tryptaminy. Związki zawierające w swojej strukturze układ tryptaminy znalazły zastosowanie w medycynie. Przykładowo sumatryptan jako agonista receptorów typu 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1B</sub> powodujący skurcz naczyń mózgowych, znalazł zastosowanie w leczeniu migreny [81]. Johimbina jest związkiem wielopierścieniowym, otrzymywanym z kory drzewa z gatunku johimba lekarska (*Pausinystalia johimbe*) [2]. Jako antagonist presynaptycznych receptorów alfa 2 adrenergicznych powoduje rozkurcz i rozszerzenie naczyń krwionośnych. W medycynie analizowano johimbinę pod kątem stosowania w leczeniu zaburzeń erekcji [136, 143, 158]. Pochodne tryptaminy to również substancje o działaniu psychoaktywnym (LSD, psylocybina, dimetyltryptamina) [180].

## 1.2. Szlak kynureninowy

Ta droga metabolizmu tryptofanu została nazwana w 1947 roku szlakiem kynureninowym (ryc. 1). W wyniku przemiany Trp na drodze KP, dochodzi do powstania wielu aktywnych metabolitów, które mogą wykazywać względem siebie działanie antagonistyczne. Proces przemiany Trp rozpoczyna się od oksydacyjnego rozerwania pierścienia indolowego przez jeden z dwóch enzymów katalizujących tę reakcję: konstytutywnej dioksygenazy 2,3-tryptofanowej (TDO) oraz indukowanej dioksygenazy 2,3-indoloaminy (IDO). W procesie tym powstaje nietrwała N-formyl-L-kynurenina (związek zaangażowany w biologiczną odpowiedź organizmu na działanie promieniowania słonecznego). Stwierdzono, że zmiany w ekspresji i aktywności IDO są powiązane z patogenezą wielu chorób, w tym chorobami nowotworami, stwardnieniem zanikowym bocznym i stwardnieniem rozsianym [91, 132, 160]. W czasie trwania stanu zapalnego, jak również przy zatrzymaniu akcji serca dochodzi do nasilonego metabolizmu Trp przez IDO, co prowadzi do zmniejszenia stężenia tego związku oraz do kumulacji jego toksycznych metabolitów w obrębie naczyń krwionośnych oraz OUN, co z kolei prowadzi do silnego rozkurczu naczyń i gwałtownego spadku ciśnienia krwi [57, 135, 142, 183].

Kolejno, w zależności od stopnia wyspecjalizowania komórki, metabolizm L-kyn może przebiegać trzema różnymi drogami, co prowadzi do powstania: kwasu kynureninowego (KYNA) gł. w astrocytach, 3-hydroksykynureniny (3-OH-KYN) oraz kwasu antranilowego (AA). KYNA jest dobrze znanym antagonistą receptora nikotynowego oraz NMDA, jak również może stanowić czynnik o właściwościach przeciwutleniających pochodzenia wewnętrznego [89]. Zarówno 3-OH-KYN, jak też AA mogą dalej przekształcać się w kwas 3-hydroksyantranilowy (3-OH-AA), natomiast poza KP 3-OH-KYN przy udziale aminotransferazy kynureninowej (KAT) ulega przemianie w kwas ksanturenowy (XA). Zarówno 3-OH-KYN oraz 3-OH-AA to związki o udowodnionym, silnym działaniu toksycznym [141]. Pod wpływem oksygenazy kwasu 3-hydroksyantranilowego (3-HAO) z 3-OH-AA powstaje semialdehyd 2-amino-3-karboksymukonowy, który następnie przechodzi proces dekarboksylacji w semialdehyd 2-aminomukonowy, oraz nieenzymatycznej konwersji do kwasu 2-pikolinowego (PA) [64]. Kwas 2-pikolinowy jest izomerem kwasu nikotynowego (syn. kwas 3-pikolinowy, witamina B<sub>3</sub>).



Ryc. 1. Metabolizm tryptofanu na drodze szlaku kynureninowego i serotoninowego. **IDO**, 2,3-dioksygenaza indoloaminy; **TDO**, 2,3-dioksygenaza tryptofanowa; **KMO**, 3-monooksygenaza kynureninowa; **KYNU**, Kynureninaza; **3-HAO**, Dioksygenaza kwasu 3-hydroksyantranilowego; **QPRT**, Fosforybozylo transferaza chinolinowa; **KAT**, Aminotransferaza kynureninowa; **TPH**, Hydroksylaza tryptofanowa.

W przypadku wysycenia dekarboksylazy semialdehydu amino- $\beta$ -karboksymukonowego substratem, dochodzi do nieenzymatycznej przemiany semialdehydu do kolejnego silnie toksycznego związku – kwasu chinolinowego (QUIN) [29, 76, 89].

### *Czynniki modulujące przemiany tryptofanu*

Przemiany na drodze KP podlegają kontroli wielu czynników, w tym między innymi witamin i minerałów, które to mogą modulować aktywność enzymatyczną. Ponadto metabolizm Trp ulega zaburzeniu w czasie rozwoju stanu zapalnego, w chorobach zakaźnych i zwyrodnieniowych, co może prowadzić do dysfunkcji śródbłonna, rozwoju zmian miażdżycowych, sepsy oraz niewydolności wielu narządów [119]. Sepsa prowadzi do wzrostu stężenia L-kyn, jak również czynników prozapalnych, co prowadzi do silnego rozszerzenia naczyń krwionośnych, z drastycznym spadkiem ciśnienia tętniczego krwi [84]. Z kolei w przypadku zatrzymania krążenia, opisano wzrost stężenia dwóch metabolitów Trp tj. kwasu 3-OH-KYN oraz KYNA [135].

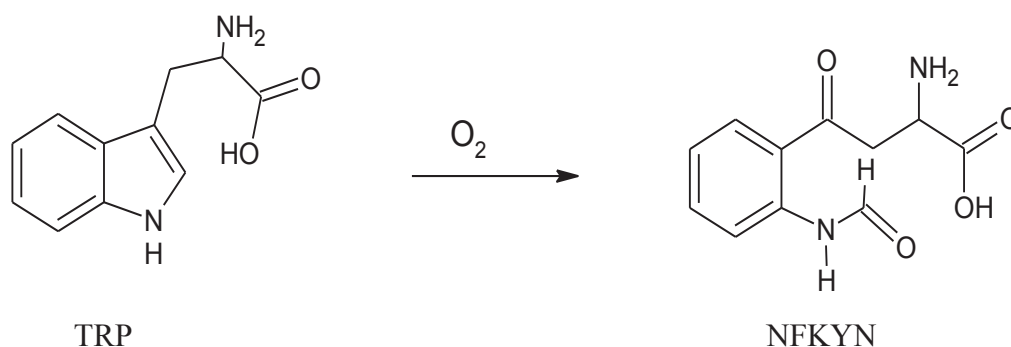
### *Wpływ witamin i minerałów na przemiany enzymatyczne zachodzące na drodze szlaku kynureninowego*

Metabolizm Trp na drodze KP wymaga obecności enzymów, które występują głównie w mózgu (m.in. w prążkowiu i jądrze ogoniastym), gdzie wyspecjalizowane komórki (głównie astrocyty) odpowiadają za poszczególne etapy przemian Trp [169]. Z kolei na obwodzie najwyższe stężenie tych enzymów odnotowano w wątrobie i nerkach [15]. Podczas procesu starzenia organizmu (badania prowadzone na szczurach) odnotowano istotne wahania aktywności enzymów zaangażowanych w szlak przemian Trp. Zmiany te mogą mieć znaczący wpływ na główne procesy biologiczne zachodzące w organizmie, w tym na funkcję limfocytów, syntezę NAD(P)(H), transmisję synaptyczną NMDA, co może w konsekwencji przyczyniać się do pojawienia się zmian degeneracyjnych w podeszłym wieku.

### *Oksygenazy*

Pierwszy, a zarazem ograniczający etap przemian KP, polega na oksydacyjnym rozszczepianiu podwójnego wiązania 2,3-pierścienia indolowego Trp, w wyniku czego tworzy się nietrwały produkt przejściowy - N-formyl-L-kynurenina (NFKYN), który

następnie ulega przekształceniu w L-kyn (ryc. 2, ryc. 3). Reakcja ta jest katalizowana przez enzymy dioksygenazy zawierające w swojej strukturze cząsteczkę hemu [3]. Do tej grupy zaliczamy TDO, podlegającą ekspresji konstytutywnej oraz prozapalną, stymulowaną przez cytokiny IDO1.



Ryc. 2. Przemiana tryptofanu z rozerwaniem pierścienia indolowego poprzez nietrwały związek N-formyl-L-kynureninę (NFKYN)

W wyniku przemian utleniania Trp do L-kyn, powstają również nadtlenki, które zapoczątkowują powstawanie bardzo reaktywnych i potencjalnie szkodliwych rodników tlenowych i hydroksylowych [12, 32].

#### *Dioksygenaza tryptofanowa (TDO)*

Po raz pierwszy enzym ten opisano w 1930 roku. Występuje głównie w wątrobie ssaków i czynniki, takie jak głód, melatonina, L-tryptofan i kwas nikotynowy mogą indukować ten enzym [131, 138, 182]. TDO substratowo jest specyficzny dla L-Trp oraz jego nielicznych pochodnych, w których strukturze podstawniki mogą występować w pozycjach 5 i 6 związku [38, 150].

Aktywność TDO może być hamowana poprzez powstające na drodze przemian KP produkty, tj. L-kyn, 3-OH-L-KYN, KYNA, XA, NADH [131]. Natomiast substancje egzogenne m.in. glikokortykosteroidy, glukagon, morfina, teofilina oraz pochodne kwasu salicylowego pobudzają aktywność TDO i w ten sposób mogą modulować KP [106]. Poziom Trp i aktywność TDO we wszystkich tkankach maleje wraz z procesem starzenia się organizmu, na co wskazują Braidy i wsp. w badaniach prowadzonych na samicach szczura [15].

### *Dioksygenaza indoloaminy typu I (IDO1)*

IDO, podobnie jak inne hemoproteiny, wiąże jedną cząsteczkę O<sub>2</sub> do dezoksybiałka, które to białko bierze udział w reakcjach utleniania Trp. W wątrobie i jelitach enzym ten jest jedną z kluczowych oksygenaz. Występowanie IDO wykazano również w narządach innych niż wątroba, przede wszystkim w mózgu, płucach, nerkach, śledzionie, przewodzie pokarmowym, łożysku oraz naczyniach krwionośnych [181, 182]. W śródbłonku naczyń enzym ten bierze udział w przemianie Trp do L-kyn, wyłącznie w obecności sprawnego śródbłonka, co konsekwentnie prowadzi do silnego spadku ciśnienia tętniczego krwi [84].

Co więcej, wykazano, że enzym ten posiada szerszy zakres działania niż TDO, obejmując swoim działaniem zarówno wbudowywanie tlenu do wszystkich substratów specyficznych zarówno dla TDO, jak również do D-tryptofanu, tryptaminy, 5-HT, epinefryny i wielu innych pochodnych zawierających strukturę Trp [164].

Głównym czynnikiem regulującym aktywność IDO w tkankach, jest stężenie samego substratu [77, 162]. Wzrost stężenia substratu powoduje zwiększenie aktywności tego enzymu i odwrotnie, spadek stężenia działa hamująco [107].

Czynniki takie jak interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukina-1 oraz lipopolisacharyd (LPS) indukują IDO [60, 153, 174]. Natomiast 1-metylo-D-tryptofan hamuje aktywność enzymu [68]. IDO odgrywa kluczową rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażeń, podczas rozwoju chorób nowotworowych i transplantacji, co stanowi kluczowy cel prowadzonych badań w ostatnich latach [149, 164]. Do patogenów wrażliwych na spadek zależnego od IDO stężenia Trp należą wewnątrzkomórkowe pasożyty (*Toxoplasma gondii*, *Plazmodium*), wirusy (wirus opryszczki), bakterie wewnątrzkomórkowe (Chlamydie i Riketsje) oraz bakterie zewnątrzkomórkowe (paciorkowce, gronkowce i enterokoki) [94]. Mechanizm prowadzący do obniżenia stężenia Trp kontroluje zdolność tych patogenów do namnażania w warunkach *in vivo*.

Za szczególny marker aktywności IDO uważa się stosunek L-kyn do L-trp w osoczu. Zależność ta jest ściśle powiązana z neopteryną produkowaną z trójfosforanu guanozyny i pochodzącą z makrofagów, która obok TNF- $\alpha$  oraz wolnych rodników ponadtlenkowych, jest znamienym markerem stanu zapalnego [154, 169].



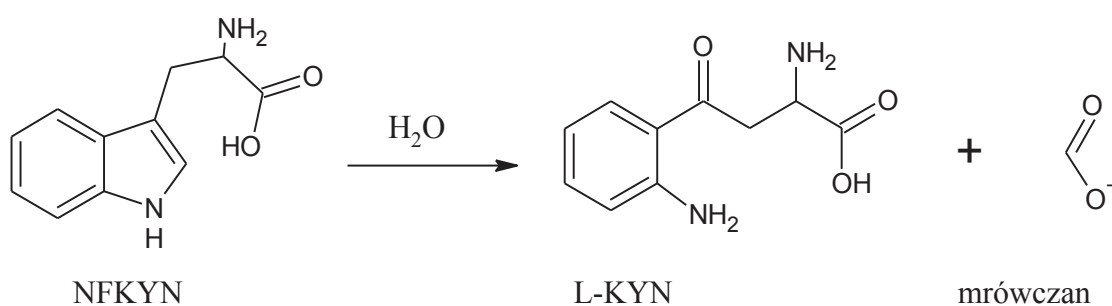
Najnowsze badania wykazują na podobieństwo w budowie IDO oraz indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS) [175].

### *Dioksygenaza indoloaminy typu II (IDO2)*

Ostatnie badania przeprowadzone u ssaków ujawniły obecność trzeciej dioksygenazy, nazwanej dioksygenazą indoloaminy typu 2 (IDO2), której to przypisuje się większą rolę w regulowaniu procesów odpornościowych w porównaniu do IDO1. Miejsce aktywne IDO2, podobnie jak IDO1 i TDO, zawiera grupę hemową zdolną do wiązania Trp [102]. Zanim dojdzie do aktywacji enzymu (IDO2) i utlenienia Trp, grupa prostetyczna hemu  $Fe^{3+}$  musi zostać zredukowana do formy  $Fe^{2+}$  [77]. Odkrycie trzeciego enzymu przyciąga duże zainteresowanie badaczy ze względu na powiązanie dysfunkcji układu TDO/IDO z patogenezą chorób nowotworowych oraz malarią [53, 117, 128].

### *Formamidaza kynureninowa (KFaza)*

Jak dotąd niewiele wiadomo na temat roli jaką pełni NFKYN [34].

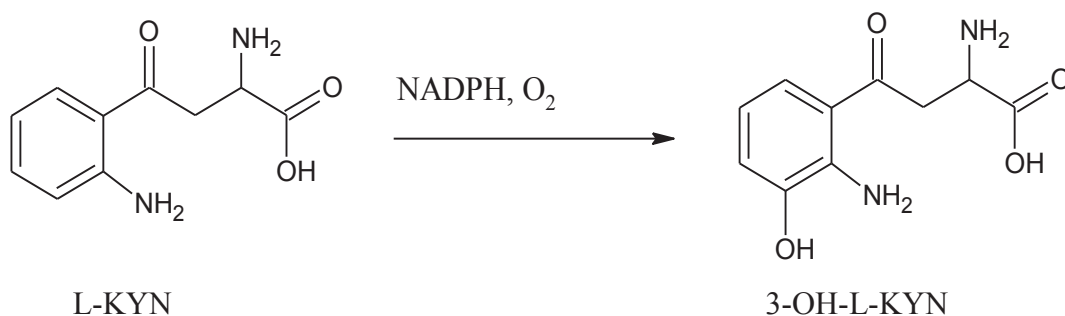


Ryc. 3. Przemiana N-formyl-L-kynureniny w L-kyn i mrówczan

Substancje takie jak kwas askorbinowy, arginina, L-Trp stymulują formamidazę [144]. Natomiast AA, 3-OH-KYN oraz  $Mn^{2+}$  działają hamująco [101, 131].

### 3-monooksygenaza kynureninowa (KMO)

Enzym KMO zlokalizowany jest w mózgu, wątrobie, nerkach, śledzionie, a także w łożysku. KMO katalizuje hydroksylację L-kyn w pozycji 3 pierścienia fenolowego z wytworzeniem 3-OH-L-KYN, endogennego generatora stresu oksydacyjnego, który powoduje apoptozę komórek nerwowych z selektywnością, co do specyficznych ich typów (ryc. 4).



Ryc. 4. Przemiana L-kyn do 3-OH-L-KYN

Aktywność KMO jest zależna w dużej mierze od właściwego stężenia dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) - pochodnej ryboflawiny (witamina B<sub>2</sub>) oraz adenozymonofosforanu (AMP). Monomeryczne białko enzymu jest niekwalencyjnie i bardzo ściśle związane z FAD, tworząc kompleks, który posiada zdolność do powolnej chemicznej dysocjacji [5]. Inne czynniki regulujące wzrost aktywności KMO to NADPH, NADH oraz związki prozapalne. Również niedobór witaminy B<sub>6</sub> wywołany, np. ciążą, zwiększa aktywność KMO [30].

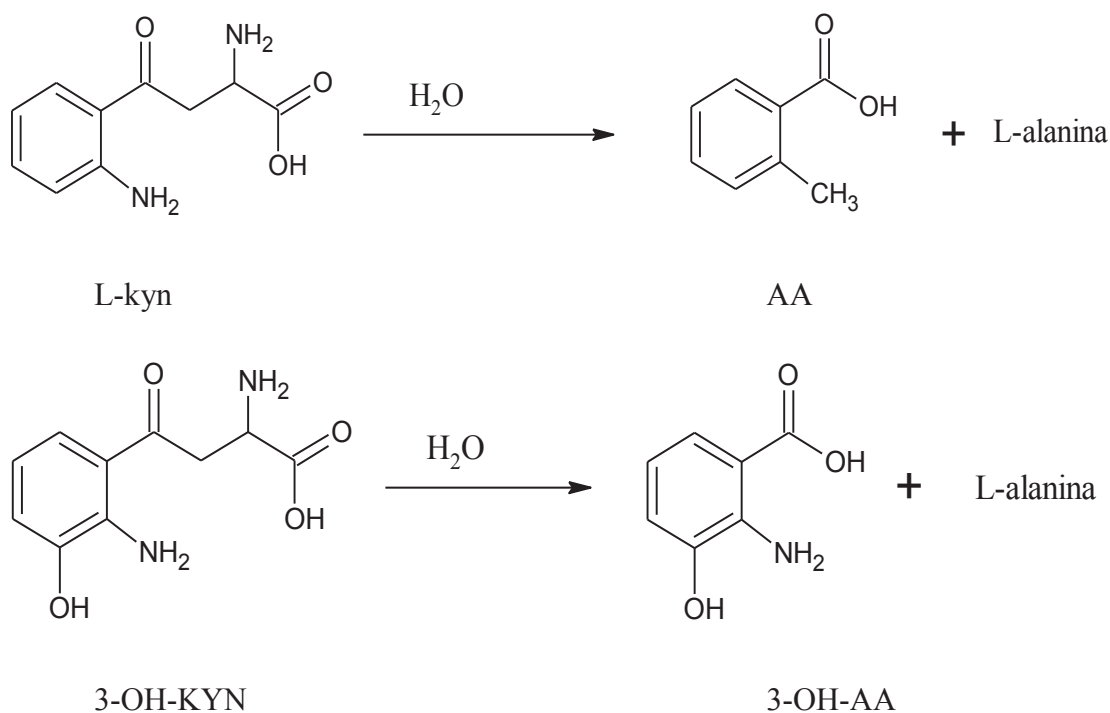
Wysoki poziom KMO stwierdza się w wątrobie i nerkach oraz w makrofagach i mikrogleju, natomiast niskie odnotowuje się we wszystkich obszarach mózgu. Wilson i wsp. wskazują, że enzym ten jest zakotwiczony w zewnętrznej błonie mitochondrialnej wszystkich typów komórek somatycznych [179].

Ostatnie badania potwierdzają również udział KMO w patogenezie choroby Huntingtona [42, 167] oraz w sepsie pourazowej [84], co czyni ten enzym ważnym celem terapeutycznym, mogącym pomóc w opracowywaniu wielu nowych leków [106, 140]. 3-OH-L-KYN, będąca produktem reakcji katalizowanej przez KMO, jest toksyczna dla komórek, gdyż sprzyja wytwarzaniu w łańcuchu oddechowym reaktywnych form tlenu [31].

Nadmiar witaminy B<sub>6</sub> w diecie ciężarnych myszy hamuje aktywność KMO zarówno w wątrobie, jak i w łożysku, na co wskazują w swoich badaniach Rios-Avila i wsp., Ciorba oraz van de Kamp i Smolen [27, 134, 171]. Wśród innych związków

hamujących aktywność enzymu należy wymienić: AA, XA,  $\text{Cl}^-$  [16].

### *Kynureninaza (KYNU)*



Ryc. 5. Hydroliza L-kyn i 3-OH-KYN do AA i 3-OH-AA

KYNU jest enzymem zależnym od pirydoksyny (witaminy  $\text{B}_6$ ). Zarówno L-kyn jak i 3-OH-L-KYN mogą ulegać odpowiednio utlenieniu do AA lub 3-OH-AA [126] (ryc. 5).

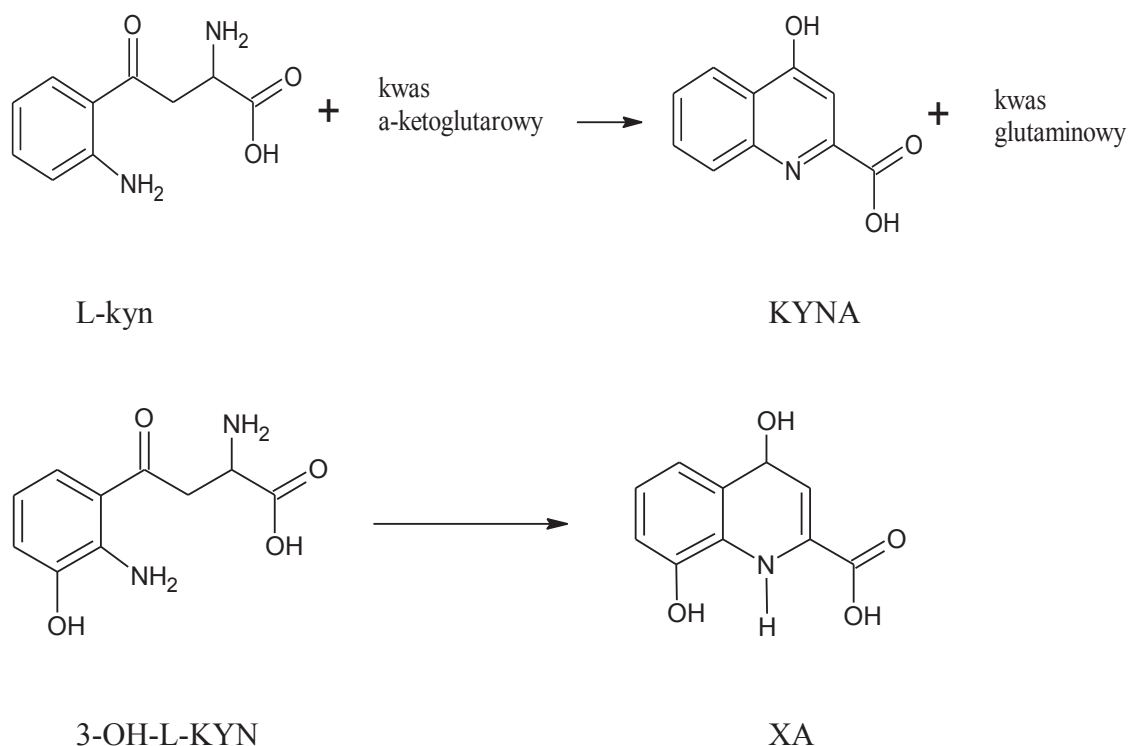
Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na udział minerałów w kontroli aktywności KYNU.  $\text{Mn}^{2+}$  aktywuje KYNU, podczas gdy  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  działają hamująco na enzym. Spośród wymienionych minerałów najsilniejszym inhibitorem aktywności enzymatycznej KYNU jest  $\text{Cu}^{2+}$ , a najsłabszym  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ ) [35]. Mechanizm, odpowiedzialny za hamowanie aktywności KYNU, polega na blokowaniu tego enzymu poprzez inaktywację grup sulfhydrylowych.

### Aminotransferazy kynureninowe (KATs)

KATs to grupa enzymów zaangażowanych w nieodwracalną transaminację L-kyn w ludzkiej tkance mózgowej. Enzymy te zlokalizowane są głównie w astrocytach, natomiast na obwodzie stwierdzono ich duże stężenie w nerkach i wątrobie.

Dotychczas zostały zidentyfikowane cztery izoformy tego enzymu (KAT-I, KAT-II, KAT-III oraz KAT-IV), z czego przede wszystkim KAT-II jest odpowiedzialny za syntezę KYNA w tkance mózgowej [13]. Ponadto grupa enzymów KAT zaangażowana jest w biosyntezę kwasu glutaminowego i asparaginowego, które działają jako neurotransmitery receptora NMDA ssaków (ryc. 6). KAT odpowiada również za transaminowanie 3-OH-L-KYN do XA. Jednak jak dotąd funkcja ta jest rzadko opisywana w literaturze [51].

Aktywność izoformy I KAT jest silnie hamowana przez glutaminian, podczas gdy typ II KAT jest niewrażliwy na działanie glutaminianu. KAT-II uważany jest za enzym zaangażowany w większość przemian KYNA w mózgu.



Ryc. 6. Przeniesienie grupy aminowej z L-kyn i 3-OH-L-KYN. Produktami reakcji są odpowiednio KYNA i XA.

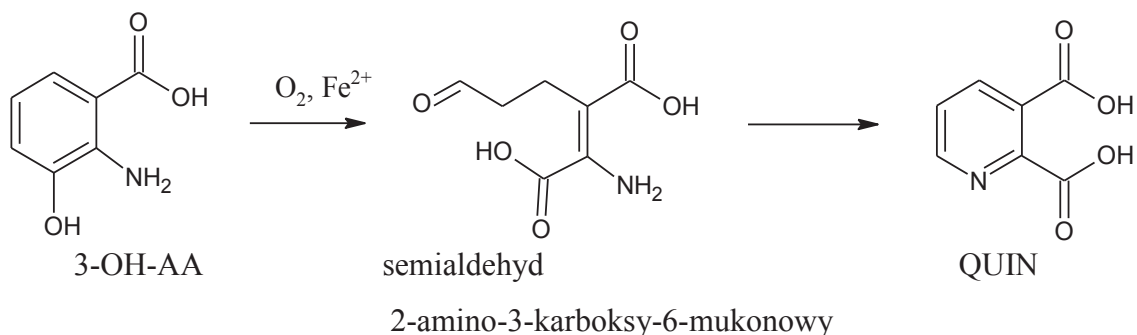
KAT, podobnie jak KYNU, jest enzymem zależnym od obecności witaminy B<sub>6</sub> i analogicznie jak KYNU wykorzystuje te same substraty [10, 157]. Stopień zależności pomiędzy aktywnością KAT, a koncentracją witaminy B<sub>6</sub>, jest dość zmienny. Jedni autorzy donoszą, że zarówno w stanach niedoboru witaminy B<sub>6</sub> oraz w ciąży, dominują metabolity i produkty pośrednie działania KAT, wskazujące na zablokowanie szlaku na poziomie KYNU. Chociaż oba enzymy wymagają do swojej aktywacji obecności witaminy B<sub>6</sub>, to KYNU jest enzymem bardziej wrażliwym na szybsze wyczerpywanie witaminy B<sub>6</sub> niż KAT. Zauważono również, że stan ciąży wywiera dodatkowo zwiększony hamujący wpływ na aktywność KYNU, niż niedobór samej witaminy B<sub>6</sub>, zarówno u ludzi, jak i gryzoni [34]. Należy dodać, że deficyt pirydoksyny w diecie ciężarnej kobiety potęguje wpływ tego stanu na aktywność KYNU.

Co więcej, wykazano, że w przypadku niedoboru witaminy B<sub>6</sub> w diecie, aktywność KYNU w nerkach ulega wyraźnemu obniżeniu, podczas gdy aktywność KAT zwiększa się. Z kolei umiarkowany niedobór tej witaminy w organizmie powoduje wzrost stężenia 3-OH-L-KYN z jednoczesnym obniżeniem zawartości KYNA i AA w osoczu u człowieka. Tymczasem Thackray i wsp. odnotowali wzrost stężenia KYNA w osoczu szczura przy umiarkowanym deficycie witaminy B<sub>6</sub> [157]. Znaczne niedobory witaminy B<sub>6</sub> prowadzą do równoczesnego wzrostu koncentracji KYNA i XA zarówno we krwi obwodowej, jak i w moczu, co wskazuje na blok na poziomie KYNU [80, 173]. Zwiększone stężenie 3-OH-L-KYN stanowi ważny wskaźnik zaburzeń przemian witaminy B<sub>6</sub> [170]. Gdy pojawia się niedobór witaminy B<sub>6</sub>, organizm wydziela więcej XA i 3-OH-L-KYN, natomiast mniej produktów metabolizmu niacyny. Wobec powyższego, wskaźnik substrat–produkt (3-OH-L-KYN do 3-OH-AA) zaproponowano jako dość czuły i specyficzny wskaźnik niedoboru witaminy B<sub>6</sub>. Co więcej, wykazano, że aktywność enzymatyczna KYNU jest znacząco hamowana w obecności produktu reakcji katalizowanej przez KYNU – L-alaniny. Tymczasem dodanie witaminy B<sub>6</sub> do medium zawierającego inaktywowany przy użyciu L-alaniny enzym KYNU, przywraca aktywność biologiczną KYNU (badania *in vitro*) [105].

Z kolei, w ludzkim organizmie, Trp i fenyloalanina mogą obniżać aktywność enzymatyczną KAT-I [52]. Podobne działanie posiadają estrogeny [24]. Kocki i wsp. wskazują na hamujący wpływ L-cysteiny na funkcję izoformy II KAT obecnej w mózgu szczura [72].

### *Dioksygenaza kwasu 3-hydroksyantranilowego (3-HAO)*

3-HAO przekształca 3-OH-AA w nietrwały semialdehyd 2-amino-3-karboksy-6-mukonowy (ryc. 7). Do aktywacji tego enzymu niezbędna jest obecność jonów żelaza  $Fe^{2+}$  [82]. 3-HAO występuje w błonie mitochondrialnej neuronów oraz w synapsach pobudzających. Enzym ten zlokalizowany jest głównie w mózgu, ale wykazano również jego obecność w komórkach prozapalnych [89] oraz w tkankach wątroby [137], gdzie pewne cytokiny (np. LPS) stymulują wytwarzanie QUIN.



Ryc. 7. Przemiana 3-OH-AA z udziałem 3-HAO do semialdehydu, a następnie nieenzymatyczna przemiana do QUIN.

Dodanie jonów  $Fe^{2+}$  do homogenatów komórek prądkowia stymuluje sześciokrotnie aktywność 3-HAO, zarówno u zwierząt laboratoryjnych (szczur, mysz), jak i u ludzi [151]. Z kolei, pobudzający wpływ jonów  $Fe^{2+}$  na aktywność tego enzymu może być zniesiony poprzez zastosowanie dodatku do medium ferrytyny (białka kompleksującego jony żelaza). Jony  $Fe^{2+}$  uwalniane podczas uszkodzeń neuronalnych, zwiększają wytwarzanie QUIN, powodując tym samym jeszcze większe uszkodzenia w obrębie komórek. Natomiast jony  $Zn^{2+}$  działają hamująco na enzym [19].

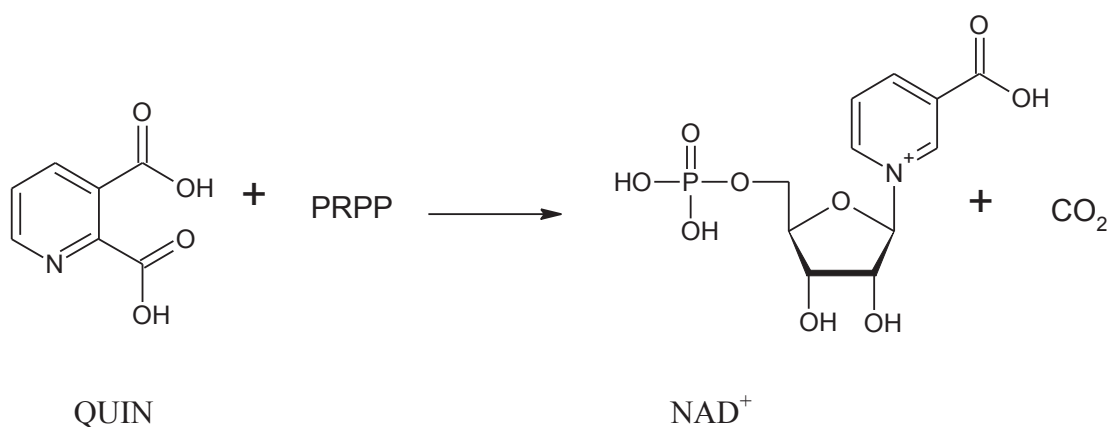
U osób z cukrzycą insulinozależną system immunologiczny, jak również neuronalny, podlega wpływom zwiększonej ilości L-kyn i QUIN, na co wskazują w badaniach Sasaki i wsp. [64]. Natomiast w badaniach tych nie dochodziło do zwiększenia stężenia 2-PA i nikotynamidu, wobec tego nie wywierały one takiego wpływu na omawiane systemy.

### *Decarboksylaza semialdehydu 2-amino-3-karboksy-6-mukonowego*

Prowadzi do przemiany semialdehydu 2-amino-3-karboksy-6-mukonowego w semialdehyd 2-amino-6-mukonowy i CO<sub>2</sub>. Związki takie jak KYNA, 2-PA, QUIN powodują wzrost aktywności enzymu, natomiast jony Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> działają hamująco na enzym [129].

### *Fosforybozylotransferaza chinolinowa (QPRTaza)*

Rolą enzymu QPRT jest katabolizm QUIN i 5-fosforybozylo-1-porofosforanu (PRPP) do NAD<sup>+</sup> i dwutlenku węgla (ryc. 8).



Ryc. 8. Przemiana QUIN do mononukleotydu kwasu nikotynowego

NAD<sup>+</sup> jest znamionym kofaktorem wielu reakcji enzymatycznych m.in. polimerazy PARP (ang. poly (ADP-ribose) polymerase) naprawiającej DNA bądź programującej śmierć komórki. Jony magnezowe są niezbędnym elementem aktywującym enzym QPRT [83, 145]. Ponadto istnieją dowody potwierdzające, iż w celu dalszej katalizy, w miejscu aktywnym enzymu, muszą być obecne związki o strukturze cysteiny [37, 116]. Natomiast niedobór kofaktorów może być pośrednią przyczyną gromadzenia się toksycznego QUIN w tkankach. Generowanie wolnych rodników oraz stres oksydacyjny są odpowiedzialne za toksyczność indukowaną przez QUIN. Co więcej, QUIN często odgrywa ważną rolę w patogenezie różnych chorób neurologicznych u ludzi, jak również charakteryzuje się dużą ekscytotoksycznością w warunkach *in vivo*.

Patologiczne wysokie stężenie QUIN stwierdzono w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Huntingtona [49, 167]. Jony  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  wpływają hamująco na aktywność enzymu [66]. Ponadto, tworzenie związków kompleksowych pomiędzy  $\text{Fe}^{2+}$  i QUIN może powodować oksydacyjne uszkodzenie komórek, poprzez peroksydację lipidów i hamować samoutlenianie kompleksów z żelazem, na co wskazują Stípek i wsp. [190]. Ponadto Lugo-Huitrón i wsp. opisali, iż kompleks ten może być odpowiedzialny za rozrywanie, w warunkach *in vitro*, łańcuchów DNA [89]. Sahm i wsp. wskazują QPRT jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu złośliwych glejaków [137]. Grimaldi i wsp. opisują, iż niedobór magnezu (aktywatora białek QPRT) może być odpowiedzialny za objawy zespołu Tourette'a i kilku innych współistniejących stanów chorobowych [46]. Wykazano również, że białko QPRT może hamować nadprodukcję aktywnej kaspazy typu 3, enzymu kontrolującego apoptozę komórek [65].

Aktywność QPRTazy zarówno w mózgu jak i w wątrobie zwierząt maleje wraz z wiekiem zwierzęcia, natomiast w nerkach aktywność enzymu wzrasta, na co wskazują Braidy i wsp. w swoich badaniach prowadzonych na szczurach [15].

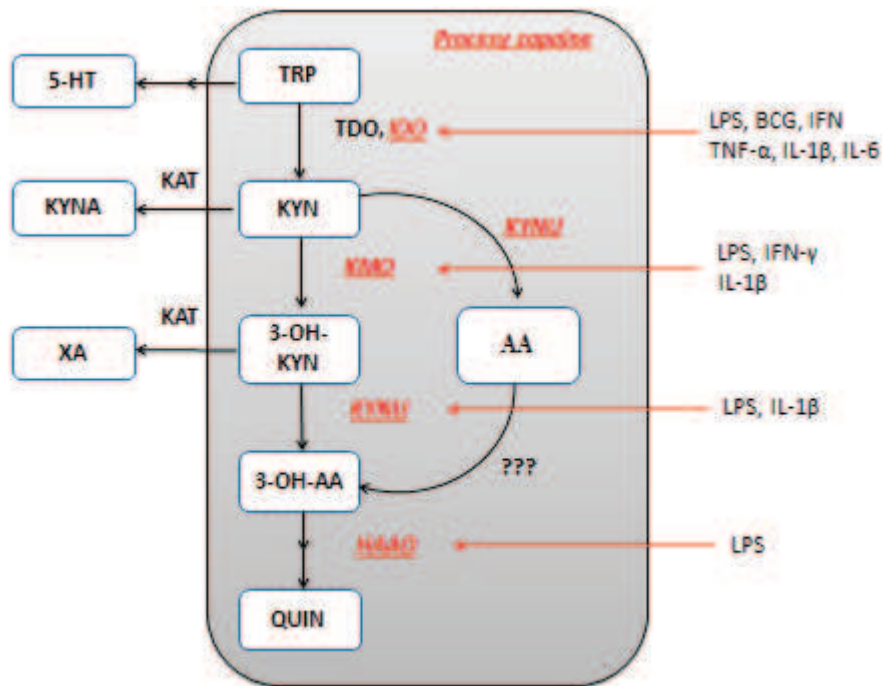
### ***Cytokiny prozapalne a regulacja ciśnienia tętniczego***

Cytokiny to cząstki białkowe o małej masie (ok. 15-30 kDa) wpływające na wzrost, proliferację i pobudzenie komórek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej oraz odpowiedzi komórek hemopoetycznych. Cytokiny mogą wybiórczo pobudzać odpowiedź komórkową lub humoralną, co w połączeniu z ich dużą ilością i wielokierunkowym działaniem powoduje, że powstaje niezwykle skuteczny, ale także bardzo skomplikowany i czuły system powiązań pomiędzy komórkami układu odpornościowego [124].

Do tej heterogennej grupy mediatorów zapalenia należą:

1. Czynniki martwicy nowotworów TNF-  $\alpha$ ,
2. Interleukiny: Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-10 oraz Il-8,
3. Neopteryna,
4. Czynniki pobudzające kolonie makrofagów (M-CSF) i granulocytów (GM-CSF).





Ryc. 9. Mediatorzy stanu zapalnego stymulujące ekspresję enzymów szlaku kynureninowego [20].

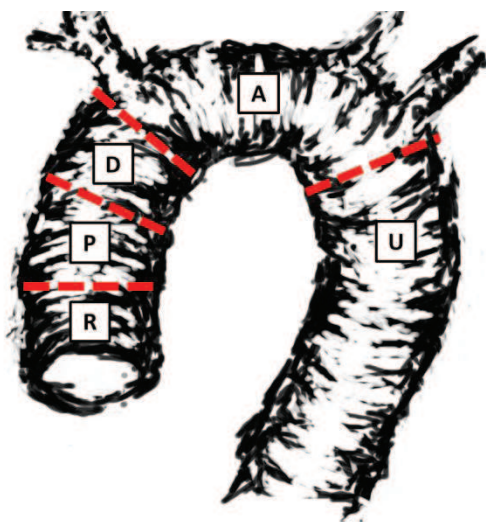
Metabolizm kynurenin jest regulowany przez liczne wymienione mediatorzy stanu zapalnego, które wywierają wpływ na ekspresję enzymów zaangażowanych w omawiany szlak przemian tryptofanu [20] (ryc. 9). Podczas trwania stanu zapalnego zmienia się dostępność substratów i w konsekwencji produktów, co spowodowane jest przejściem szlaku w stronę wzrostu aktywności enzymów głównie IDO i KMO. Powstają wówczas związki silnie neurotoksyczne (3-OH-L-KYN, 3-OH-AA oraz QUIN) oraz aktywna naczyniowo L-kyn. Proces ten z kolei sprzyja rozwojowi zależnych od układu odpornościowego procesów patologicznych.

Cytokiny prozapalne (m.in. IFN- $\gamma$  i LPS) zwiększają aktywność IDO, tym samym przesuwają Trp ze szlaku produkcji 5-HT, zmniejszając stężenie zarówno 5-HT jak i samego Trp, a zwiększają stężenie m.in. L-kyn, co prowadzi do silnego rozkurczu naczyń krwionośnych [96, 178]. Podczas indukcji ogólnoustrojowego stanu zapalnego wzrasta aktywność IDO w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, co prowadzi do spadku ciśnienia krwi [175]. Liczne procesy chorobowe, którym towarzyszy stan zapalny, mogą tworzyć warunki, w których wzrasta stężenie L-kyn, co z kolei prowadzi do spadku ciśnienia tętniczego i niewydolności wielonarządowej[119].

### 1.3. Budowa i funkcja naczyń tętniczych

Aorta odgrywa ważną rolę w przejściu krwi z lewej komory serca, amortyzując jej przepływ i przekazując krew do tkanek i narządów organizmu przy minimalnych stratach energii. Dzieli się na część wstępującą, łuk aorty oraz część zstępującą (ryc. 10). Aorta razem z tętnicami płucnymi zaliczana jest do tętnic typu sprężystego. Na przekroju poprzecznym zbudowana jest z (od światła naczynia):

- warstwy wewnętrznej (intima) zbudowanej ze śródbłonna i niewielkiej ilości tkanki łącznej wiotkiej,
- warstwy środkowej (media) najgrubszej warstwy zbudowanej głównie z koncentrycznych, naprzemiennie ułożonych blaszek sprężystych i włókien kolagenowych oraz cienkich warstw komórek mięśni gładkich,
- warstwy zewnętrznej (adventitia) zbudowanej głównie z włókien kolagenowych, przytwierdzających naczynie do otaczającej tkanki.



Ryc. 10. Ilustracja przedstawiająca poszczególne odcinki aorty. Zaczynając od lewej: R, korzeń; P, odcinek bliższy wstępujący; D, odcinek dalszy wstępujący; A, łuk aorty; U, odcinek górny zstępujący.

Ilość i wielkość komórek mięśniowych oraz blaszek sprężystych maleje wraz ze wzrostem odległości od serca. Aorta wstępująca jest szersza w porównaniu do aorty zstępującej oraz dalszych jej odcinków [111].

Z kolei tętnica kręzkowa górna wraz z odcinkami II rzędu, ze względu na swoją strukturę, histologicznie jest tętnicą typu mięśniowego. Ten rodzaj naczyń charakteryzuje się znaczną kurczliwością. W porównaniu do tętnicy typu sprężystego, warstwa środkowa tętnicy kręzkowej zbudowana jest z ciasno ułożonych komórek mięśni gładkich (około 40 warstw), którym towarzyszy niewielka ilość błon i włókien sprężystych oraz drobnych włókien kolagenowych.

Śródbłonek jest ważnym elementem naczyń krwionośnych. W komórkach śródbłonka syntetyzowane są oraz wydzielane liczne substancje biologicznie czynne, które uczestniczą w regulacji napięcia ściany naczyń. Do czynników wpływających na relaksację naczyń należą: tlenek azotu, prostacyklina, śródbłonkowo-pochodny czynnik hiperpolaryzujący, bradykinina, adrenomedullina, natriuretyczny peptyd C. Z kolei do związków obkurczających naczyń produkowanych lokalnie należą: endotelina 1, angiotensyna II, tromboksan A<sub>2</sub>, prostaglandyna H<sub>2</sub> oraz rodniki tlenowe. Uszkodzenie śródbłonka indukuje uwalnianie wielu substancji, powodujących zaburzenia w regulacji napięcia naczyń krwionośnych oraz zmiany w układzie krzepnięcia. W komórkach śródbłonka oraz w błonie komórkowej mięśni gładkich naczyń zlokalizowane są liczne receptory, które w wyniku aktywacji wywierają wpływ na pracę naczyń. W błonie komórkowej zidentyfikowano receptor endotelinowy typu A, 5-HT<sub>2A</sub> oraz 5-HT<sub>7</sub>, natomiast w komórkach endotelium występują receptory endotelinowy typu B, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> oraz 5-HT<sub>4</sub> (tabela 1).

## 1.4. Przekazywanie sygnałów w komórce mięśni gładkich naczyń

### 1.4.1. Budowa i funkcja błony komórkowej

Błona komórkowa to bardzo aktywna metabolicznie struktura, w obrębie której zachodzi wiele znamiennych procesów warunkujących m.in. wzrost, czy różnicowanie komórek. Stanowi również barierę chroniącą przed czynnikami zewnętrznymi. Nazywana jest często płynną mozaiką białkowo-lipidową ze względu na swoją strukturę. W wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej dochodzi do hydrolizy fosfatydyloinozytoli, co stanowi jeden z istotniejszych systemów przekazywania sygnałów w komórce. Enzymem regulującym ten proces jest rozpuszczalne białko cytozolowe zależne od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  – fosfolipaza C (PLC) [156].

### 1.4.2. Molekularny mechanizm działania receptora $\alpha$ -1 adrenergicznego

W swoich badaniach, Lapin i Umanskaia wskazują na kynureny i udział receptora adrenergicznego w kontroli napięcia ściany naczyń [79]. Skurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych jest wyzwalany m.in. w wyniku aktywacji receptorów alfa adrenergicznych typu pierwszego, znajdujących się na powierzchni błony komórkowej mięśni gładkich naczyń. Receptor alfa 1 adrenergiczny aktywuje PLC  $\beta$  za pośrednictwem białka Gq/11. Na powierzchni błony komórkowej PLC  $\beta$  katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu – PI(4,5)P<sub>2</sub>, co prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekaźników sygnału. Są to trifosforan-1,4,5-inozytoli (IP<sub>3</sub>) oraz diacyloglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> powoduje uwolnienie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z przestrzeni wewnątrzkomórkowych  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$ , a także wpływa na regulację procesów komórkowych, w tym odpowiada za aktywację błonowych kanałów jonowych, zarówno sodowych jak i potasowych [172]. DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), regulującą procesy odczulania receptorów, transport cząsteczek, bądź jonów przez membrany oraz uwalniania neuroprzekaźników. W dalszym etapie dochodzi do aktywacji przez IP<sub>3</sub> receptorów dla IP<sub>3</sub> obecnych w retikulum endoplazmatycznym (RE), w wyniku czego dochodzi do wzrostu  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$  w procesie napływu jonów wapnia do cytoplazmy z RE. Napływające jony wapnia mogą dalej aktywować receptory ryanodynowe obecne w RE. Jednocześnie obserwuje się aktywację przez DAG i  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$  – PKC. W efekcie, dochodzi do dalszego dynamicznego wzrostu  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$ , wynikającego z otwarcia kanałów wapniowych i napływu wapnia do cytoplazmy z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wzrost  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$  w komórce mięśniowej wpływa na interakcje aktyna – miozyna, co inicjuje skurcz włókienek mięśniowych.

### 1.4.3. Molekularny mechanizm działania receptorów naczyniowych 5-HT

Receptory 5-HT zlokalizowane są głównie w błonie komórkowej neuronów oraz w naczyniach krwionośnych (7 rodzin, z czego zidentyfikowano 14 podtypów receptorów) (tabela 1). Złożone działanie 5-HT w naczyniach krwionośnych, jest zależne od interakcji z wieloma receptorami serotoninowymi znajdującymi się w mięśniach gładkich naczyń oraz w śródbłonku, a także od lokalizacji anatomicznej naczyń, stanu zdrowia organizmu, co łącznie może prowadzić do otrzymania przeciwstawnych efektów działania [90]. Z wyjątkiem jonotropowego receptora 5-HT<sub>3</sub>, pozostałe receptory 5-HT związane są z różnymi białkami typu G [93].

Autorzy, opublikowanych dotychczas badań, wskazują na możliwy udział wybranych kynurenin w regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych poprzez receptor 5-HT [78, 79, 168]

Receptor 5-HT<sub>2A</sub> to podstawowy receptor zaangażowany w skurcz naczyń krwionośnych, poprzez aktywację kanałów wapniowych typu L, poprzez PLC oraz kinazy tyrozynowe [155]. W wyniku aktywacji receptorów związanych z kinazą tyrozynową, dochodzi do aktywacji PLC typu  $\gamma$ , hydrolizy PI(4,5)P<sub>2</sub>, w wyniku czego powstaje DAG i IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> łączy się ze specyficznym receptorem w błonie RE i otwiera znajdujące się w nim kanały, przez które do cytoplazmy uwalniane zostają jony Ca<sup>2+</sup>. Z kolei DAG aktywuje PKC.

Z kolei pobudzenie receptora 5-HT<sub>1B</sub> działającego poprzez białko Gi/Go hamuje cyklazę adenylanową, zmniejszając stężenie cAMP i aktywność kinazy białkowej A (PKA) [90].

Natomiast receptory 5-HT<sub>7</sub> oraz 5-HT<sub>4</sub> działają poprzez białko Gs, które stymuluje cyklazę adenylanową i powoduje zwiększenie stężenia cAMP powstającego z ATP. cAMP wiąże się z podjednostką enzymu, a następnie aktywuje PKA, która z kolei fosforyluje szereg białek docelowych.

PKA fosforyluje regulatorowe białka genów w jądrze, które następnie stymulują procesy transkrypcji.

#### **1.4.4. Wpływ KCl na napięciowo zależne kanały $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{Ca}_v1.2$ ) obecne w błonie komórkowej mięśni gładkich naczyń**

W komórkach mięśni gładkich naczyń istnieją również dwa typy kanałów  $\text{Ca}^{2+}$ : zależne od potencjału kanały  $\text{Ca}^{2+}$  oraz sterowane receptorem kanały  $\text{Ca}^{2+}$  (tabela 2). Stężenie  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$  jest 103-104 razy mniejsze niż stężenie wolnego wapnia w RE [98]. KCl od dawna jest stosowany jako dogodny czynnik pozwalający ominąć udział receptorów sprzężonych z białkiem G w aktywacji mięśni gładkich naczyń. Skurcz wywołany przez KCl jest efektem depolaryzacji błony komórkowej, co prowadzi do zwiększonego napływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez kanały typu L do wnętrza komórki [130]. Otwarcie tego typu kanałów następuje w skutek zmiany potencjału błonowego w stosunku do potencjału spoczynkowego komórki (-70 mV). W komórkach mięśni gładkich aktywacja kanałów  $\text{Ca}^{2+}$  inicjuje bezpośrednio skurcz poprzez napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza cytoplazmy z zewnątrz oraz pośrednio przez uwalnianie wapnia z RE. Wnikające jony  $\text{Ca}^{2+}$  aktywują i otwierają kanały rianodynowe zlokalizowane w błonie RE - jest to tzw. proces uwalniania wapnia poprzez jony wapnia [14, 22, 163].

#### **1.4.5. Kanały potasowe w komórkach śródbłonka oraz mięśni gładkich naczyń**

Kanały potasowe są kolejnym czynnikiem biorącym udział w regulacji napięcia ściany naczyń. Działanie tych kanałów może być regulowane przez stężenie samego  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$ . Otwarcie kanałów potasowych powoduje wypływ  $\text{K}^+$  z wnętrza komórki na zewnątrz błony komórkowej, czego następstwem jest hiperpolaryzacja i zamknięcie zależnych od potencjału błonowych kanałów wapniowych. W efekcie dochodzi do rozkurczu naczyń krwionośnych.

Z kolei zamknięcie kanałów potasowych w komórkach mięśni gładkich naczyń, prowadzi do spadku wartości potencjału błonowego, zwiększonego napływu jonów wapnia przez bramkowane potencjałem kanały wapniowe i skurczu naczyń [152]. Szczegółowy opis kanałów potasowych przedstawia tabela 3.

## 2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu poszczególnych elementów metabolizmu tryptofanu na drodze szlaku kynureninowego na reaktywność naczyń tętnicznych szczura w badaniach *in vitro*. W tym celu podjęto badanie izometrycznej odpowiedzi skurczowej izolowanych pierścieni (i) aorty szczura część zstępująca, (ii) aorty część wstępująca, (iii) tętnicy płucnej szczura oraz (iv) odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej przy pomocy inkubacji tkankowych.

Zasadnicze cele zrealizowane w cyklu badań prowadzonych w rozprawie doktorskiej:

1. Badanie bezpośredniego oddziaływania elementów szlaku kynureninowego na naczynia tętnicze szczura.
2. Wpływ elementów szlaku kynureninowego na naczynia poddane wcześniejszemu działaniu fenylefryny, 5-HT oraz KCl (ocena siły skurczu bądź rozkurczu naczyń).
3. Określenie aktywności naczyniowej na poziomie receptorowym ( $pIC_{50}$ ).

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał

##### a) Zgoda właściwej komisji bioetycznej

Wszelkie czynności związane z wykonywaniem doświadczeń na zwierzętach zostały przeprowadzone w sposób respektujący normy prawne obowiązujące na terenie Rzeczypospolitej Polski (art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej (Nr 06/2014/N i 31/2014/N). Zgoda została wydana do zezwolenia Nr 24/In-D/WNMed/UWM/2013 ważnego do dnia 31/12/2018 roku.

##### b) Zwierzęta doświadczalne

Szczury rasy Wistar (waga 200-250 g) w liczbie 50 sztuk, przebywały przez co najmniej 14 dni (minimum aklimatyzacyjne) w warunkach zapewniającym im dobrostan (naturalny cykl dnia i nocy – okres światła 07:00-19:00 h), z nieograniczonym dostępem do wody i karmy (standardowa karma dla gryzoni Agropol, Motycz, Polska) i stałej temperaturze ( $23 \pm 2$  °C).



## 3.2. Metody

### 3.2.1. Pomiar kurczliwości naczyń tętnicznych

#### a) Przygotowanie naczyń

Szczury płci męskiej w 10 tygodniu życia ( $n = 50$ ) zakwalifikowane do doświadczenia, przebywały na terenie jednostki doświadczalnej katedry Patofizjologii, Weterynarii Sądowej i Administracji, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej oraz Zwierzętarń Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, gdzie wypreparowano potrzebne naczynia bezpośrednio przed analizą.

#### **AORTA**

Fragmenty aorty (część wstępująca oraz zstępująca) zostały natychmiast ostrożnie wyizolowane, oczyszczone z tkanki łącznej, a następnie przygotowano pierścienie o długości 5 – 6 mm i o szerokości naczynia  $2,26 \pm 0,017$  mm. Tak otrzymane fragmenty naczyń, umieszczano na specjalnych haczykach ze stali nierdzewnej, przewieszono przez światło naczynia w komorach inkubacyjnych, zawierających bufor Krebsa-Henseleita (tabela 4). Jeden haczyk był przytwierdzony do ściany komory, natomiast drugi był podłączony do przetwornika (F30, TAM-A typ 705/1, HugoSachs Elektronik, Germany) w celu pomiaru kurczliwości (ryc. 11). Z każdego szczura wypreparowano po cztery pierścienie aorty. Całkowita ilość przebadanych pierścieni aorty wynosiła 400. Aktywność miogenną izolowanych fragmentów aorty rejestrowano w 4 komorach inkubacyjnych (objętość 5 ml) do badań izolowanych naczyń w warunkach skurczu izometrycznego (Mayflower Tissue Bath, Hugo Sachs Elektronik, Germany; ryc. 12), z zastosowaniem oprogramowania (HSE ACAD-W, Germany).

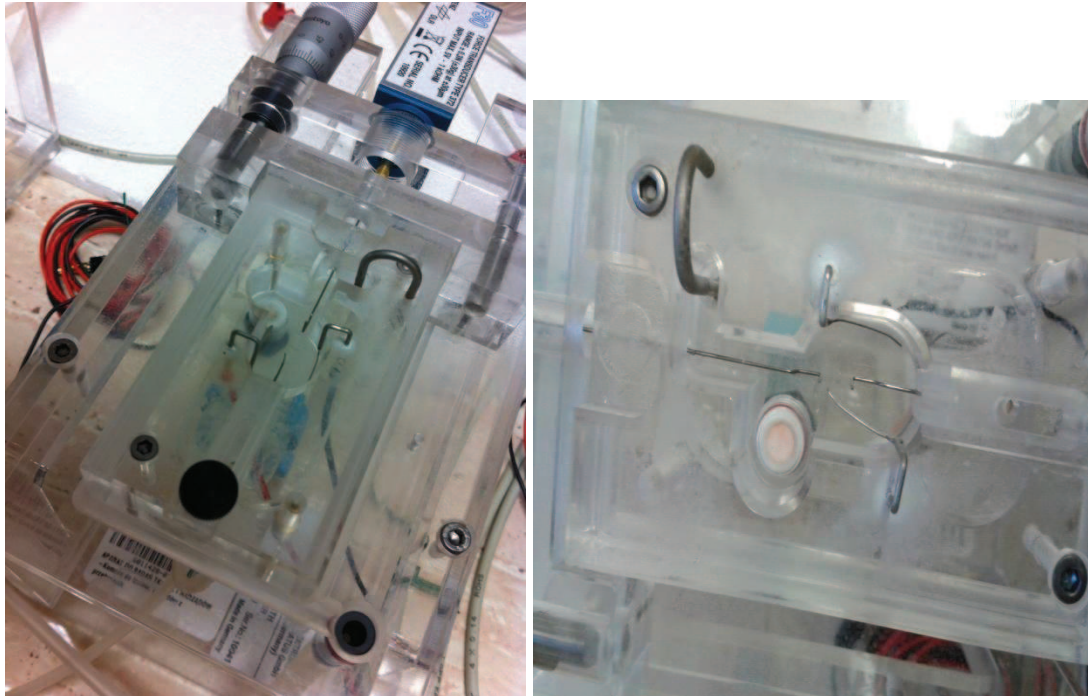
#### **TĘTNICA PŁUCNA**

Zastosowano tę samą procedurę, co w przypadku pierścieni aorty. Tętnica płucna lewa i prawa zostały ostrożnie wyizolowane, a następnie przygotowano odcinki o szerokości  $1,8 \pm 0,02$  mm i długości 3 mm. Napięcie spoczynkowe dopasowano odpowiednio do średnicy naczynia.

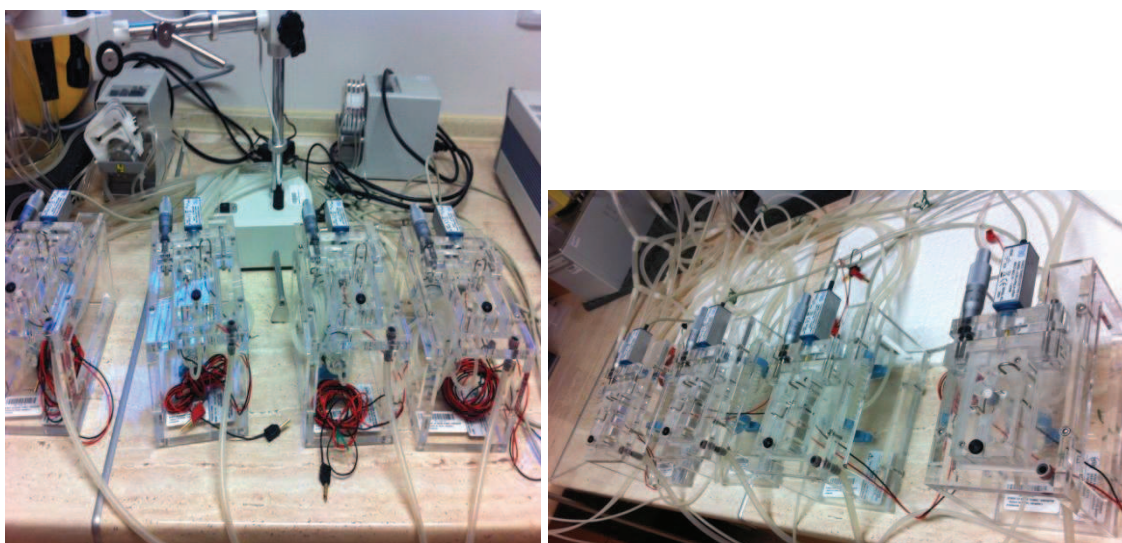
#### **ODCINKI II RZĘDU TĘTNICY KREZKOWEJ GÓRNEJ**

Fragmenty naczyń po wyizolowaniu zostały umieszczone w buforze Krebsa-Henseleita o składzie podanym powyżej z tym, że stężenie glukozy zmniejszono do 5,5 mM [104, 165]. Przy pomocy mikroskopu oczyszczone pierścienie zostały

przewieszane przez światło naczynia. Napięcie spoczynkowe również dostosowano do średnicy naczynia.



Ryc. 11. Komora inkubacyjna (Mayflower Tissue Bath of Hugo Sachs Elektronik, Germany) o objętości 5 ml do badania izolowanych naczyń.



Ryc. 12. Zestaw do badań izolowanych naczyń z mikroskopem użyty w pracy badawczej.

## b) Protokół doświadczenia

Analizowane fragmenty naczyń, przed przystąpieniem do doświadczenia, były poddawane każdorazowo stabilizacji przez 60 minut w buforze Krebsa-Henseleita. Proces ten eliminuje naprężenia towarzyszące spontanicznej pracy izolowanych naczyń. Eksperyment wykonano w dwóch etapach.

### Wybór odpowiednich stężeń substancji referencyjnych

W pierwszym etapie wyznaczono optymalne napięcie spoczynkowe pierścieni naczyń, pobranych od zwierząt doświadczalnych. Naprężenie spoczynkowe jest odpowiednio dopasowane w zależności od wewnętrznej średnicy naczynia krwionośnego, co zapewnia, że reakcje na agonistów i/lub antagonistów będą najbardziej wyraźne. W tym celu zastosowano różne stężenia roztworów referencyjnych. Fenylefryna (0,1 nM–100  $\mu$ M), KCl (5–75 mM), 5-HT (0,1 nM–100  $\mu$ M) ketanseryna oraz acetylocholina (1 nM–100  $\mu$ M). Otrzymane wyniki pozwoliły oszacować stężenia roztworów referencyjnych, przy których skurcz naczyń będzie najbardziej wyraźny, zaś w przypadku ketanseryny oraz acetylocholiny relaksacja naczyń będzie całkowita.

### Wyznaczenie efektu submaksymalnego dla fenylefryny, serotoniny oraz chlorku potasu

Pierścienie naczyń najpierw poddano działaniu roztworu fenylefryny w dawce 1  $\mu$ M (aorta i tętnica płucna) oraz 10  $\mu$ M (odcinki II rzędu tętnicy krezkowej górnej) osiągając efekt submaksymalny. Kiedy osiągnięto stan równowagi, tkanki przemywano w buforze Krebsa-Henseleita, w celu otrzymania odpowiedzi na to samo stężenie fenylefryny z zachowaniem powtarzalności pomiarów. W ten sposób wykonano 7 pomiarów w 8 godzinnym przedziale czasowym. Taką samą procedurę przeprowadzono w przypadku 60 mM roztworu KCl oraz 10  $\mu$ M roztworu 5-HT.

### Dawki kumulacyjne acetylocholíny i ketanseryny

Pierścienie naczyń poddane wcześniej działaniu fenylefryny, następnie wystawiano na działanie wzrastających dawek acetylocholíny w stężeniach od 1 nM do 100  $\mu$ M, a następnie analizowano reakcje naczyń. Pozwoliło to na wyznaczenie krzywych zależności dawka-odpowieź dla wzrastających stężeń acetylocholíny i wybór odpowiedniego stężenia acetylocholíny.

Taką samą procedurę zastosowano w przypadku ketanseryny na działanie 5-HT.

### Wyznaczenie odpowiedniego napięcia spoczynkowego

W celu ustalenia, czy efekt działania fenylefryny w prowadzonych badaniach *in vivo* wiąże się z zastosowanym napięciem spoczynkowym, porównano efekt działania różnych stężeń fenylefryny na przebieg napięcia, w zależności od ustawionego obciążenia wyjściowego izolowanych fragmentów aorty (zakres 1,0–3,5 cN). Ponieważ w stanie stacjonarnym odpowiedź naczyń była zmienna w zależności od wybranych fragmentów, dokonano wyboru obciążenia, przy którym naczynia utworzyły stabilne *plateau*. Przy zastosowanym napięciu spoczynkowym i odpowiednim stężeniu fenylefryny, reakcja naczyń utrzymywała się na stałym poziomie przez ponad 30 minut, co pozwoliło na przeprowadzenie doświadczenia.

W drugim etapie badano aktywność miogenną naczyń wobec wzrastających stężeń analizowanych związków.

### Przebieg pomiarów

Każdorazowo przed doświadczeniem naczynia poddawano 60 minutowej stabilizacji, w 5 ml komorach tkankowych, w zmodyfikowanym buforze Krebsa-Henseleita, w celu pokonania stresu mechanicznego i osiągnięcia, ustalonego wcześniej napięcia spoczynkowego [59]. Roztwór przez cały czas trwania doświadczenia był napowietrzany mieszaniną karbogenu o składzie 95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> oraz utrzymywany w temperaturze 37 °C, co zapewniało pH na poziomie około 7,4 [59]. Bufor Krebsa-Henseleita był zmieniany średnio co 15 minut i zastępowany świeżym roztworem, w celu wyeliminowania powstających ewentualnie metabolitów, które mogłyby wpływać na pracę analizowanego naczynia.

- i. analizowane pierścienie poddawano działaniu wzrastającym stężeniom badanych substancji (tabela 6) przez 5 minut poszczególne stężenie. Następnie analizowano odpowiedź naczyń na podanie fenylefryny, 5-HT oraz KCl.
- ii. stabilizacja naczynia oraz podanie fenylefryny, 5-HT lub KCl. Kolejno podawano wzrastające dawki badanych związków. Tylko wówczas, gdy osiągnięto efekt *plateau* po wcześniejszej dawce (około 4 minuty), podawano kolejne wyższe stężenie. Następnie ustalano reakcje na acetylocholiny. Pozwoliło to na dobór odpowiedniego stężenia, które następnie analizowano indywidualnie.

Reakcja na analizowane związki jest wyrażona jako (i) procent wywołanego skurczu – w stosunku do substancji referencyjnej, (ii) jako siła skurczu (cN) oraz (iii) jako parametr  $pIC_{50}$  ( $-\log IC_{50}$ ) w celu określenia aktywności inhibitorów. Obliczenia przeprowadzono w programie MS Office, GraphPad Prism 6 oraz bezpośrednio w programie HSE-ACAD. Obserwowane zmiany zapisywano w cyklach 10 minutowych.

### Śródbłonek

Szczególne ostrożność została zachowana, aby nie uszkodzić śródbłonka przy preparowaniu i zawieszaniu naczyń w komorach. W doświadczeniach z fenylefryną oraz KCl śródbłonek był usuwany mechanicznie przez delikatne pocieranie powierzchni błony wewnętrznej naczynia przewodem pokrytym bawełną. Obecność sprawnego śródbłonka oceniano we wszystkich preparatach, określając zdolność acetylocholiny (10  $\mu$ M) do obniżenia napięcia, przy wcześniejszym zadziałaniu na naczynia roztworem fenylefryny (1  $\mu$ M bądź 10  $\mu$ M). Jeżeli rozkurcz naczyń po podaniu acetylocholiny był na poziomie powyżej 90%, uznano takie naczynie jako nienaruszone, a śródbłonek za zachowany. Śródbłonek uznano za usunięty, gdy odpowiedź naczyń po podaniu acetylocholiny była zredukowana poniżej 10% poziomu wyjściowego. Obecność sprawnego śródbłonka potwierdziły także badania histologiczne.

### 3.2.2. Barwienia histologiczne fragmentów naczyń

Barwienia wykonano w celu określenia ewentualnego działania nieswoistego – toksycznego analizowanych związków na fragmenty naczyń. Pierścienie naczyń po usunięciu z łaźni tkankowych, utrwalano w 10% roztworze buforowanej formaliny, a następnie zatopiono je w parafinie. Tak zestalone tkanki pocięto na skrawki o grubości 5  $\mu\text{m}$  za pomocą mikrotomu. W ten sposób otrzymano od 4 do 8 skrawków z każdej próbki. Skrawki wybarwiono za pomocą barwników hematoksylina i eozyna (H&E) i przeprowadzono analizę histologiczną. Pierścienie pobrane od szczurów natychmiast po eutanazji służyły jako kontrola. Zdjęcia preparatów histologicznych wykonano za pomocą mikroskopu optycznego Olympus BX41, podłączonego do komputera, zaopatrzonego z wysokiej rozdzielczości ekran, na którym analizowano i przetwarzano zdjęcia. Analiza histomorfometryczna została wykonana przy użyciu programu do obróbki zdjęć Image-Pro Plus 4 (Media Cybernetics).

### 3.3. Badane związki

#### a) Odczynniki

Do wszystkich doświadczeń i oznaczeń użyto substancji i odczynników ze źródeł, które zapewniały najwyższy stopień czystości. Były to:

- L-tryptofan – (Sigma-Aldrich Chemie, Fluka, USA)
- L-kynurenina – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland)
- Kwas kynureninowy – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, UK)
- 3-hydroksykynurenina – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Izrael)
- Kwas 3-hydroksyantranilowy – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, USA)
- Kwas antranilowy – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, India)
- Kwas ksanturenowy – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- Kwas chinolinowy – kwas pirydino -2,3-dikarboksylowy (Merc, Germany)
- Kwas pikolinowy – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, UK)
- Kwas nikotynowy – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland)
- Acetylocholina – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland)
- Chlorowodorek fenylefryny – (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, UK)
- Chlorowodorek serotoniny – (Sigma-Aldrich, USA)
- Ketanseryna, winian – (Sigma-Aldrich, China)
- Woda oczyszczona – Milipore
- Składniki buforu Krebsa-Henseleita – (Poch, Gliwice, Poland)
- HCl, NaOH, DMSO, etanol – (Chempur, Piekary Śląskie, Poland)

#### b) Dobór stężeń

Zakres użytych w doświadczeniu stężeń został dobrany zgodnie z danymi dostępnymi w literaturze.

#### c) Przygotowanie rozcieńczeń

Wszystkie stężone roztwory wykonano w wodzie oczyszczonej i przechowywano przez maksymalnie 2 dni. Fenylefryna oraz AA zostały rozpuszczone w 0,1 N HCl [20], a pH doprowadzano do wartości 7,35, stosując 0,05 N NaOH. L-kyn, KYNA, QUIN oraz XA zostały rozpuszczone w 0,5% DMSO, natomiast 2-PA w 0,25% etanolu (v/v). Pozostałe związki rozpuszczono w wodzie oczyszczonej. Wszystkie tak

przygotowane roztwory przechowywano w temperaturze minus 20 °C, przez maksymalnie 7 dni oraz chroniono przed światłem.

Bezpośrednio przed doświadczeniem dokonywano odpowiednich rozcieńczeń w buforze Krebsa-Henseleita.

W doświadczeniach, w których skurcz naczyń był wywoływany przy użyciu KCl (60 mM), NaCl z buforu Krebsa-Henseleita był zastąpiony przez izomolowe (izoosmotyczne) stężenie KCl [47, 86] (tabela 6).



### 3.4. Analiza statystyczna

Wyniki wyrażono w postaci średnich arytmetycznych i średnich standardowych błędów pomiarów ( $\pm$  SEM), z co najmniej 6 niezależnych powtórzeń. Analiza statystyczna danych była dokonana za pomocą programu GraphPad Prism wersja 6,0 (Graph Pad Software Inc.). Do analizy statystycznej uzyskanych wyników stosowano test ANOVA (analiza wariancji), uzupełniony testem post-hoc (test Newmana i Keulsa). Jeżeli dane nie spełniały założeń dla zastosowania testu t-Studenta, zastosowano test U Manna-Whitneya. Parametr  $pIC_{50}$  opracowano na podstawie programu Pharmacological Calculation System Pharm/PCS v 4.0.

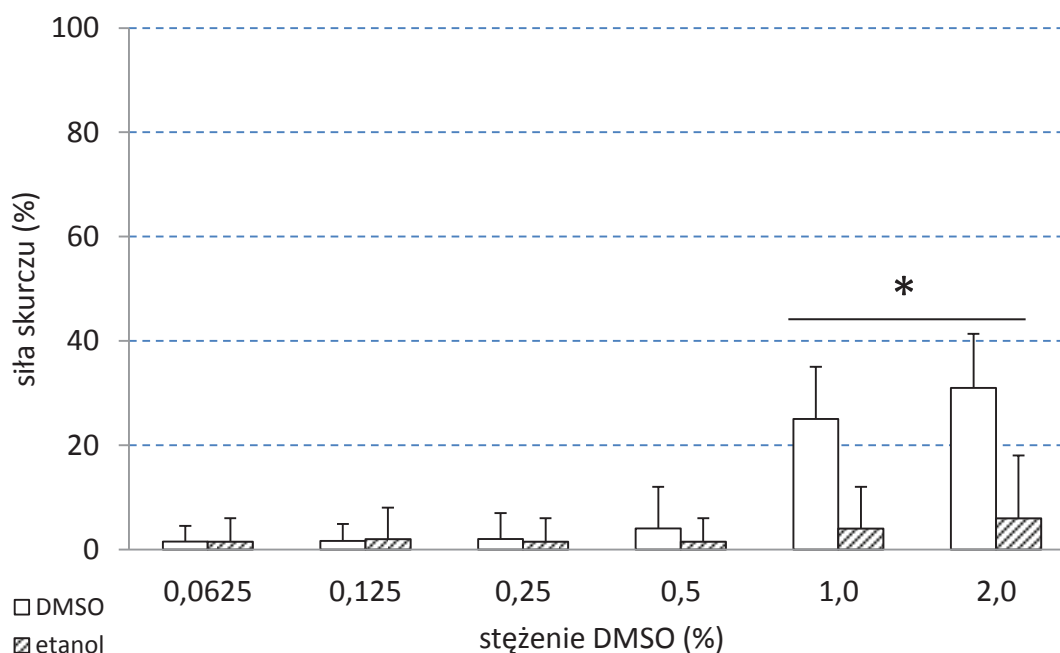
We wszystkich porównaniach różnice przy  $p < 0,05$  uznano za statystycznie istotne.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Dobór odpowiednich stężeń substancji referencyjnych oraz dobór właściwego obciążenia spoczynkowego

#### 0,5% DMSO oraz 0,25% v/v etanol

Stężenia użytych w doświadczeniach rozpuszczalników – zarówno DMSO i etanol (odpowiednio poniżej 0,5% oraz 0,25% v/v) nie wywierały własnego działania na naczynia (ryc. 13). W zastosowanych stężeniach, nie stwierdzono w działaniu DMSO czy etanolu statystycznie znamiennej różnicy w badanych grupach (A, aorta; TP, tętnica płucna; TK, odcinki II rzędu tętnicy kręzkowej górnej; n = 6).



Ryc. 13. Efekt działania DMSO i etanolu na naczynia tętnicze szczura.

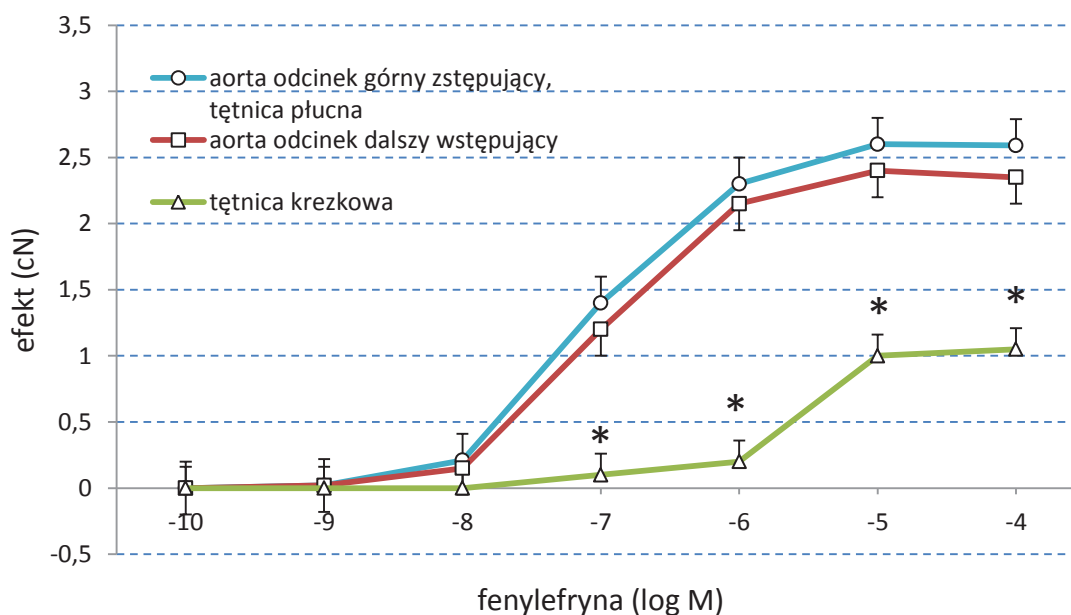
Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,01$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do wartości w grupie bez DMSO i etanolu (test t-Studenta)

Dodanie buforu Krebsa-Henseleita do łaźni tkankowych nie powodowało zmian w napięciu wyjściowym naczyń czy w skurczu tonicznym, wywołanym roztworem fenylefryny czy 5-HT, zarówno przy zachowanym śródbłonku (ś+) jak i usuniętym (ś-).

## Fenylefryna

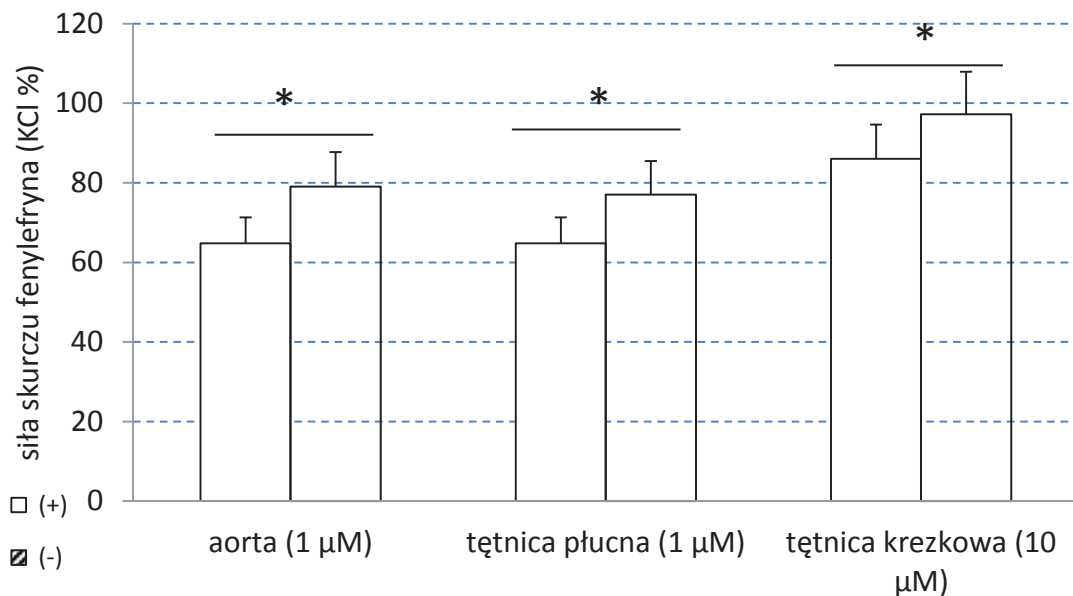
Podanie roztworu fenylefryny do komór inkubacyjnych w grupie kontrolnej w zakresie stężeń od 0,1 nM do 100  $\mu$ M, spowodowało obkurczenie izolowanych segmentów pierścieni naczyń w zależności od użytego stężenia, zarówno przy zachowanym jak i pozbawionym śródbłonka naczyniu (ryc. 14). W przypadku gdy mechanicznie usunięto warstwę śródbłonka, siła skurczu naczyń wzrosła w sposób statystycznie znamiennej (ryc. 15). Analizując otrzymane wyniki, wybrano stężenie fenylefryny o wartości 1  $\mu$ M. Przy tak dobranym stężeniu pierścienie aorty oraz tętnicy płucnej utworzyły stabilne *plateau*, które utrzymywało się przez ponad 30 minut, co pozwoliło na przeprowadzenie doświadczenia ( $pEC_{50} = 7,01 \pm 0,07$ ). Natomiast pierścienie II rzędu tętnicy krezkowej górnej utworzyły stabilne *plateau*, poddane działaniu fenylefryny o wartości 10  $\mu$ M ( $pEC_{50} = 5,89 \pm 0,18$ ) (ryc. 14).



Ryc. 14. Efekt działania wzrastających stężeń fenylefryny na naczynia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonka.

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów.

\* $p < 0,001$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy pierścieni aorty i tętnicy płucnej (test t-Studenta)



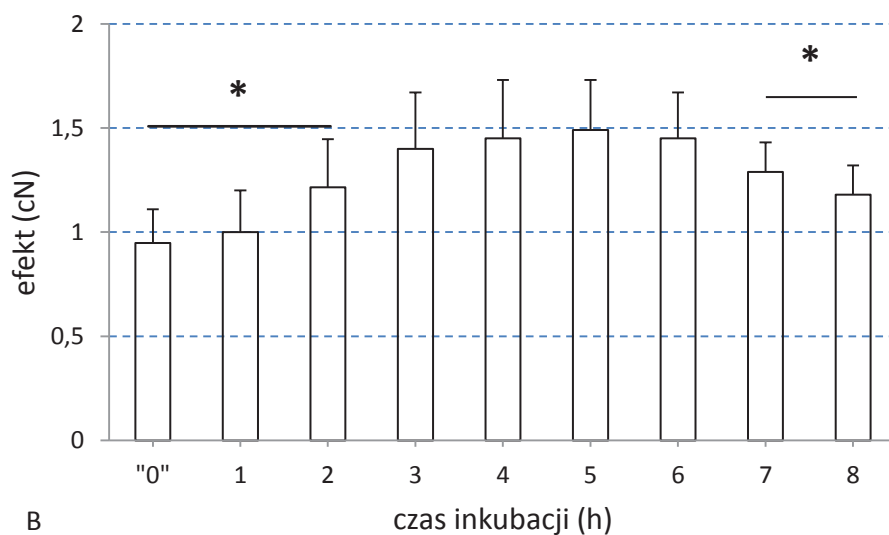
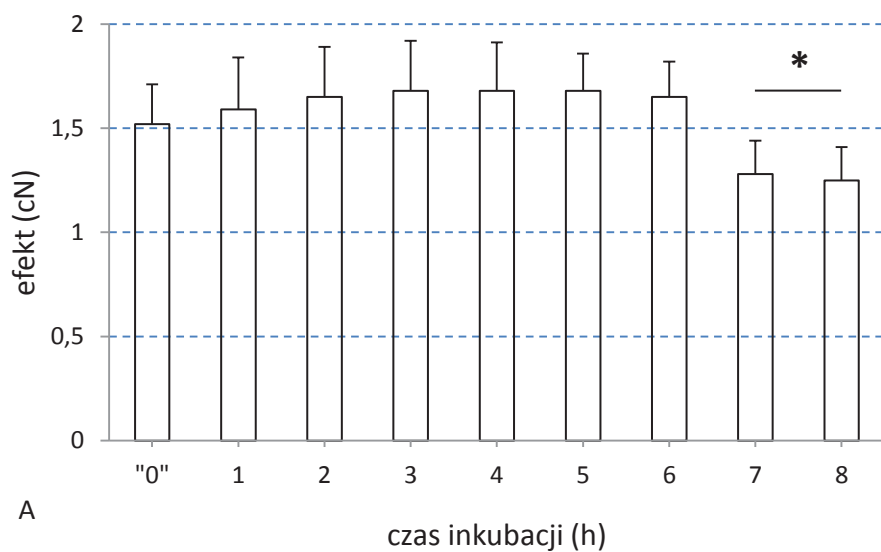
Ryc. 15. Efekt działania fenylefryny na naczynia tętnicze szczura; (+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,05$  Wynik statystycznie znamiennej w grupie w zależności od obecności śródbłonek (test t-Studenta)

Fenylefryna (1  $\mu$ M) wywołała skurcz fragmentów naczyń szczura w sposób zależny od odcinka. W pierwszej grupie (aorta część zstępująca, tętnica płucna, tętnica krezkowa) naczynia utrzymywały swoją stabilność już od samego początku prowadzenia doświadczenia. Skurcz wywołany roztworem fenylefryny utrzymywał się na poziomie  $1,7 \pm 0,04$  cN przez 6 godzin trwania eksperymentu. W 6 godzinie doszło do osłabienia reakcji naczyń na roztwór fenylefryny ( $1,25 \pm 0,02$  cN) w porównaniu do wartości początkowych ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ) (ryc. 16A).

Stabilność naczynia (aorta część wstępująca) została osiągnięta w 3 godzinie trwania doświadczenia i utrzymywała się na stałym poziomie ( $1,45 \pm 0,03$  cN) przez kolejne cztery godziny (ryc. 16B). Po tym czasie doszło do spadku siły skurczu wywołanego roztworem fenylefryny ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ).



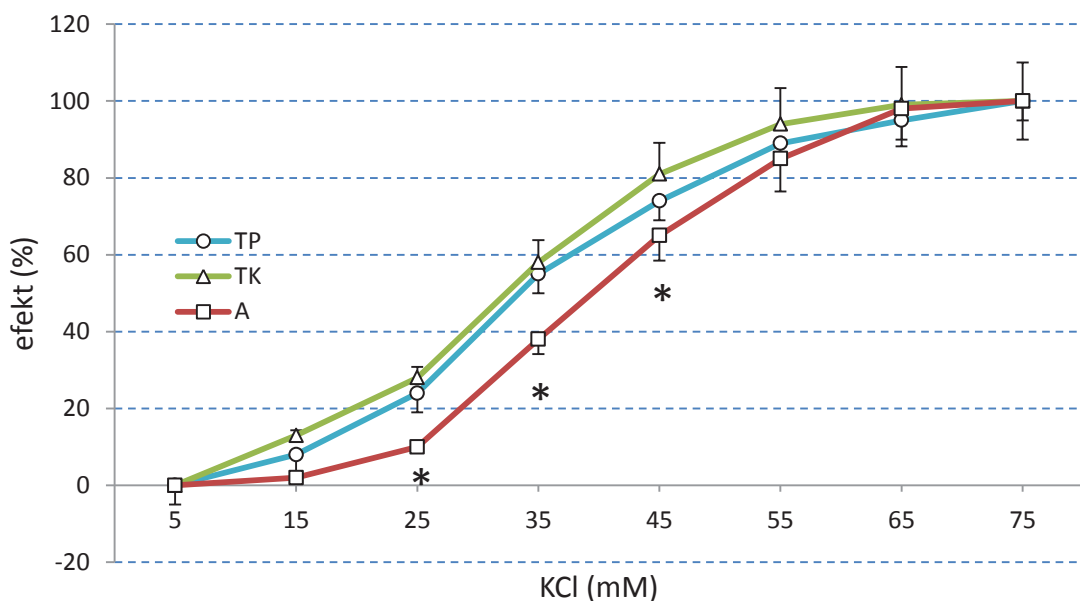
Ryc. 16. Efekt działania fenylefryny na aortę zstępującą, tętnicę płucną, tętnicę krezkową (A) oraz na aortę wstępującą szczura (B).

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,01$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do grupy w 3-6 godzinie (test t-Studenta)

## KCl

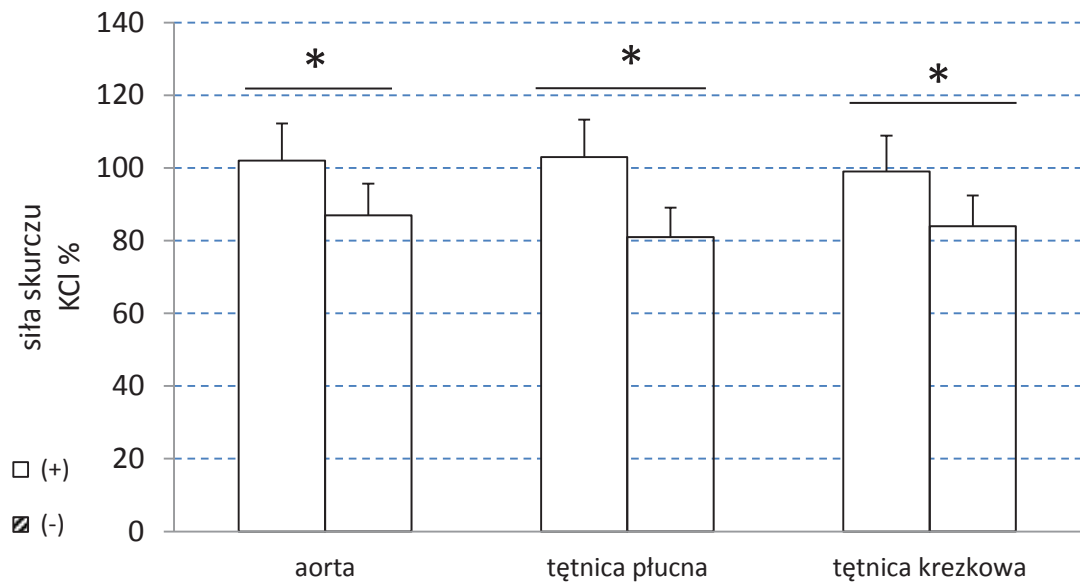
Podanie KCl do komór inkubacyjnych w grupie kontrolnej, w zakresie stężeń od 5 mM do 75 mM, spowodowało obkurczenie izolowanych segmentów pierścieni naczyń, w zależności od użytego stężenia, zarówno przy zachowanym jak i pozbawionym śródbłonka naczyniu. Analizując otrzymane wyniki, dla wszystkich naczyń wybrano stężenie KCl o wartości 60 mM (ryc. 17). Obecność sprawnego śródbłonka potęgowała siłę skurczu wywołaną roztworem KCl we wszystkich badanych grupach ( $p < 0,01$ ) (ryc. 18). W stężeniu powyżej 55 mM, nie zaobserwowano statystycznie znamienych różnic w reaktywności poszczególnych naczyń aorty, tętnicy płucnej oraz tętnicy krezkowej na działanie KCl (tabela 7).



Ryc. 17. Efekt działania KCl (5-75 mM) na naczyńia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonka, TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa; A, aorta

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,01$  Wynik statystycznie znamieny w porównaniu do wartości w grupie zawierającej pierścienie aorty i tętnicy płucnej (test t-Studenta)



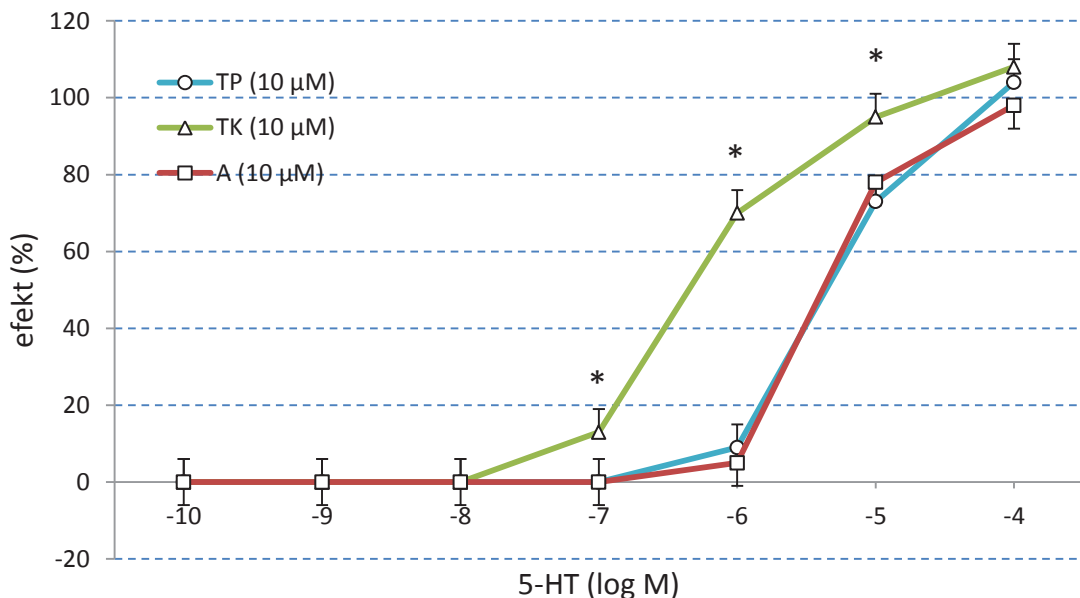
Ryc. 18. Efekt działania KCl (60 mM) na naczynia tętnicze szczura; (+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,01$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej (test t-Studenta)

## 5-HT

Analizując otrzymane wyniki wybrano stężenie 5-HT o wartości 10  $\mu\text{M}$ . Przy tak dobranym stężeniu pierścienie aorty, tętnicy płucnej oraz II rzędu tętnicy kręzkowej utworzyły stabilne *plateau*, które utrzymywało się przez ponad 30 minut, co pozwoliło na przeprowadzenie doświadczenia (ryc. 19). Wrażliwość pierścieni odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej na działanie 5-HT była 10 razy wyższa ( $EC_{50} = 0,49 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ) w porównaniu do pierścieni aorty ( $EC_{50} = 4,79 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ) i tętnicy płucnej ( $EC_{50} = 5,28 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) (tabela 7).



Ryc. 19. Efekt działania 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ) na naczyńia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonka

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,001$  Wynik statystycznie znamieny w porównaniu do wartości w grupie zawierającej pierścienie aorty i tętnicy płucnej (test t-Studenta)



### *Napięcie spoczynkowe*

W przypadku pierścieni aorty, napięcie spoczynkowe wykazywało najlepszą funkcjonalność przy wartości 2 cN. W przypadku tętnicy płucnej napięcie ustalono na poziomie 1 cN, a dla tętnicy krezkowej wynosiło 3 mN.

### *Acetylocholina*

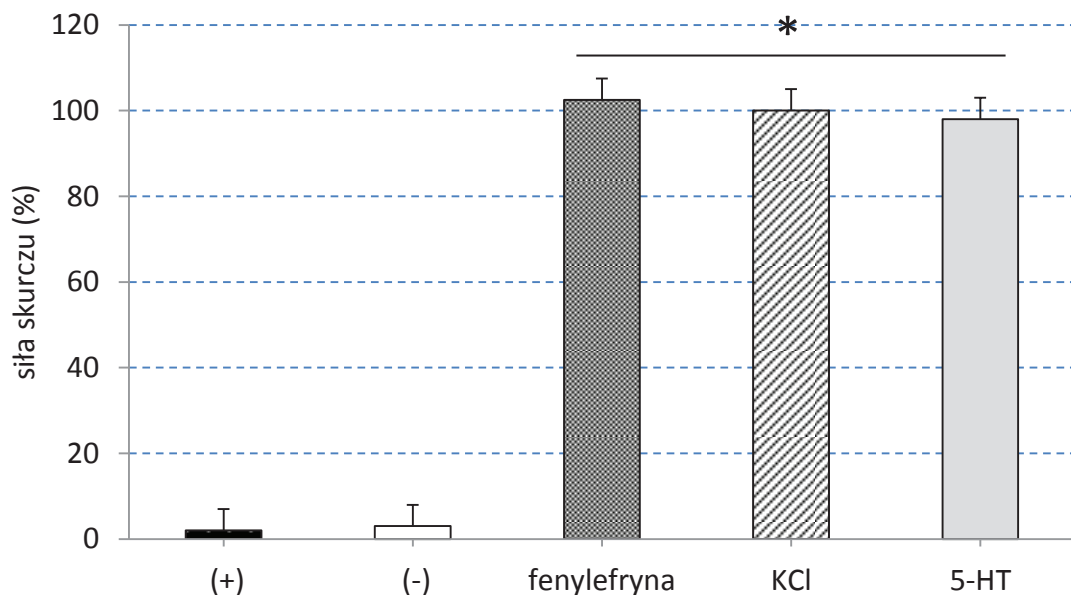
Acetylocholina w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  wywołała całkowitą relaksację analizowanych pierścieni aorty jak również tętnicy płucnej oraz krezkowej. Rozkurcz przy tej dawce osiągnął wartość powyżej 90% siły skurczu.

### *Ketanseryna*

Selektywny antagonistą receptora 5-HT<sub>2A</sub> ketanseryna, w stężeniu 0,1  $\mu\text{M}$  hamowała całkowicie odpowiedź skurczową wywołaną 5-HT.

## 4.2. Wpływ badanych związków na napięcie spoczynkowe izolowanych naczyń tętnicznych

Przeprowadzono serię badań w celu wyboru spośród analizowanych związków substancji o aktywnym działaniu na naczynia tętnicze szczura. Podczas analizowania otrzymanych wyników nie stwierdzono pojawienia się zmian w napięciu ściany naczyń. Efekt działania Trp oraz pozostałych związków na naczynia był porównywalny i nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic w sile i efektywności działania, zarówno przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku (ryc. 20).



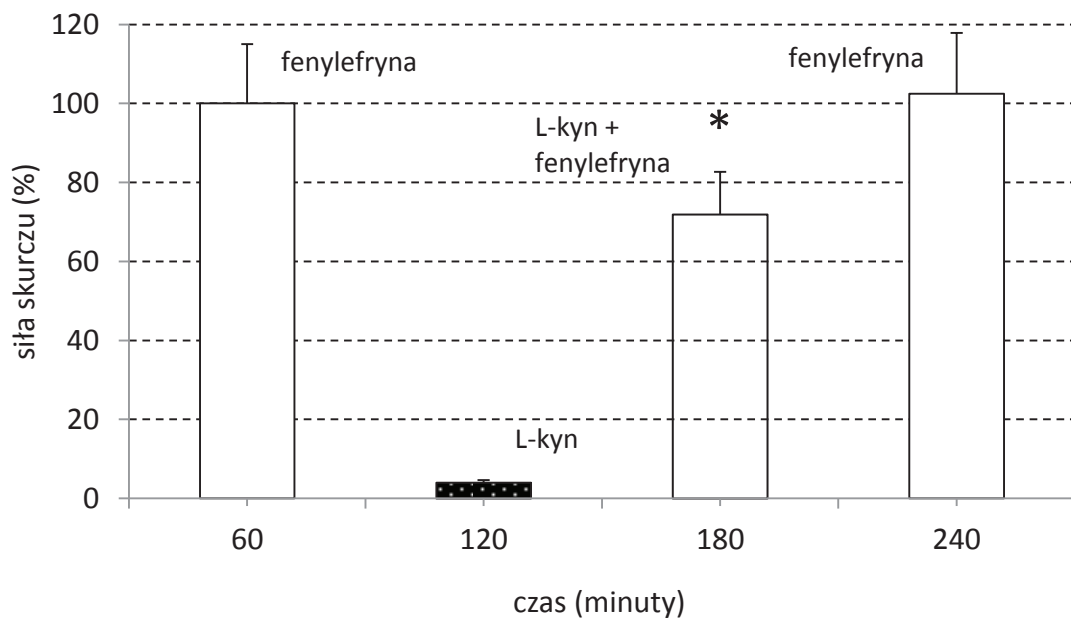
Ryc. 20. Efekt działania Trp, L-kyn, KYNA, 3-OH-L-KYN, 3-OH-AA, AA, XA, QUIN, 2-PA, NA oraz fenylefryny, KCl (60 mM) i 5-HT (10  $\mu$ M) na naczynia tętnicze szczura.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,001$  Wynik statystycznie znamienny w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej (test t-Studenta)

Zaobserwowano natomiast, że podanie fenylefryny do komórek inkubacyjnych w obecności analizowanych związków, wywołało jedynie w przypadku L-kyn statystycznie znamienne spadki w sile skurczu, w porównaniu do działania samej fenylefryny  $p < 0,005$ ,  $n = 6$  (ryc. 21). Efekt działania był zależny od stężenia i uwidaczniał się powyżej  $100 \mu\text{M}$ . Przy stężeniu  $300 \mu\text{M}$  skurcz naczyń wynosił zaledwie 72% wartości początkowej. Po przepłukaniu naczynia i ponownym podaniu samej fenylefryny w tym samym stężeniu, otrzymano skurcz o sile na poziomie wartości wyjściowej ( $102 \pm 5\%$ ). Takie same wyniki otrzymano w przypadku badanych pierścieni naczyń aorty, tętnicy płucnej oraz odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej.



Ryc. 21. Efekt podania fenylefryny, L-kyn ( $300 \mu\text{M}$ ) oraz jednoczesnego podania L-kyn i fenylefryny na naczynia tętnicze szczura, w czasie trwania doświadczenia. Każde podanie poprzedzone jest płukaniem i stabilizacją naczynia.

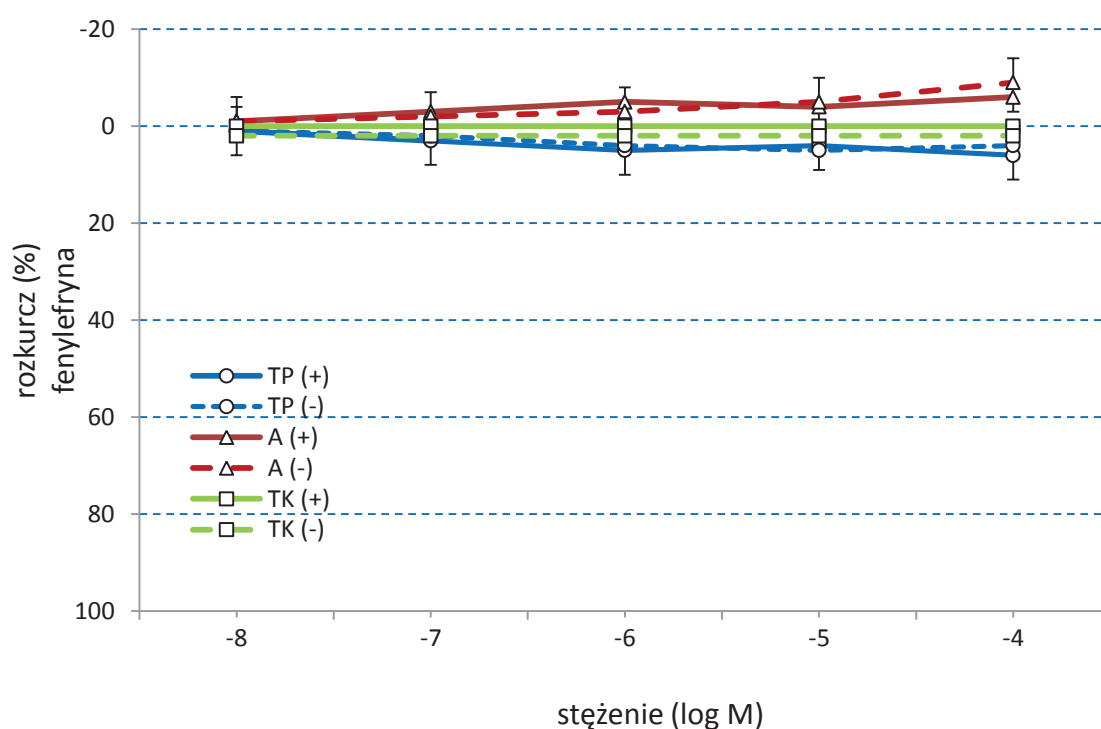
Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,005$  Wynik statystycznie znamienne w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej (test t-Studenta)

### 4.3. Wpływ badanych związków na reaktywność naczyń tętnicznych w obecności fenylefryny, serotoniny oraz KCl

#### *Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętniczne szczura*

Tryptofan, w zastosowanym zakresie stężeń (10 nM–100  $\mu$ M), nie wpływał na aktywność obkurczonych pierścieni naczyń tętnicznych szczura. Nie stwierdzono też statystycznie znamiennych różnic w grupach, w których śródbłonek był zachowany (ś+) oraz został usunięty (ś-) (ryc. 22, ryc. 23, ryc. 24).

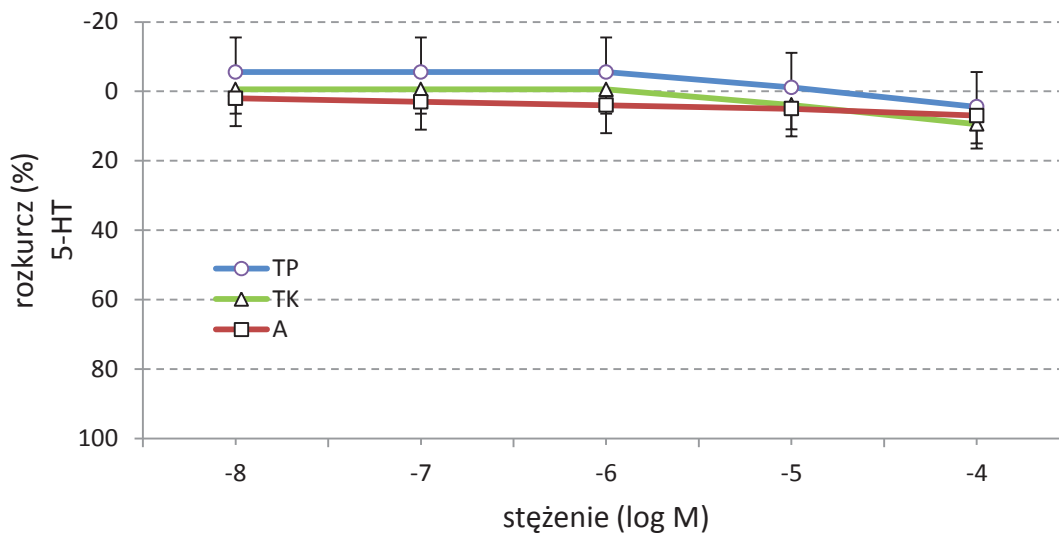


Ryc. 22. Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętniczne szczura (fenylefryna). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

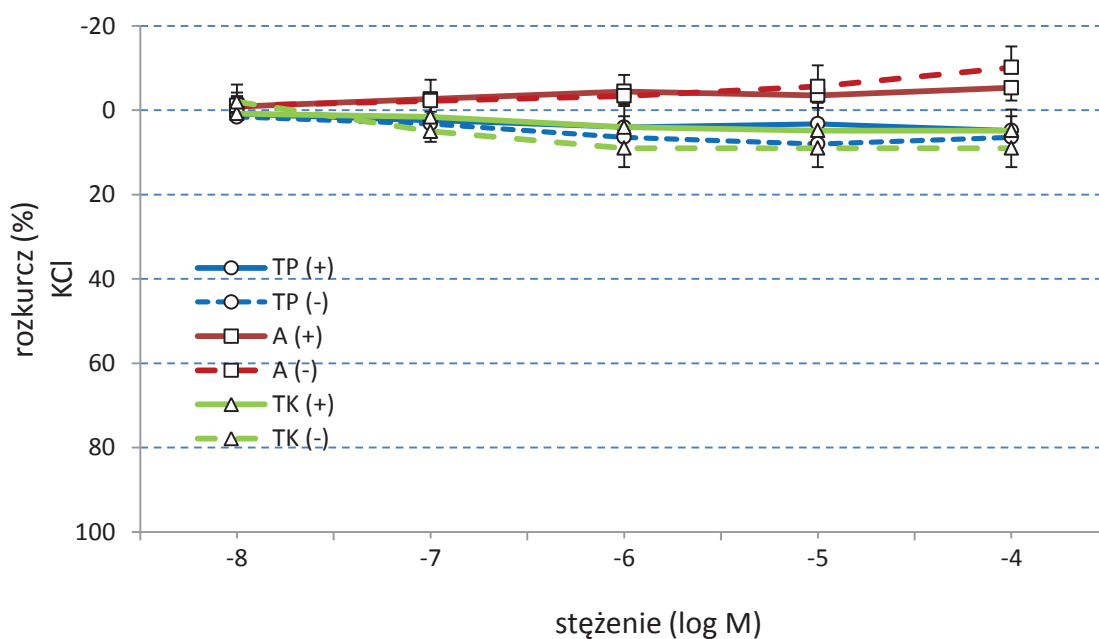
Wyniki statystycznie nieznamienne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 23. Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10  $\mu$ M 5-HT). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)



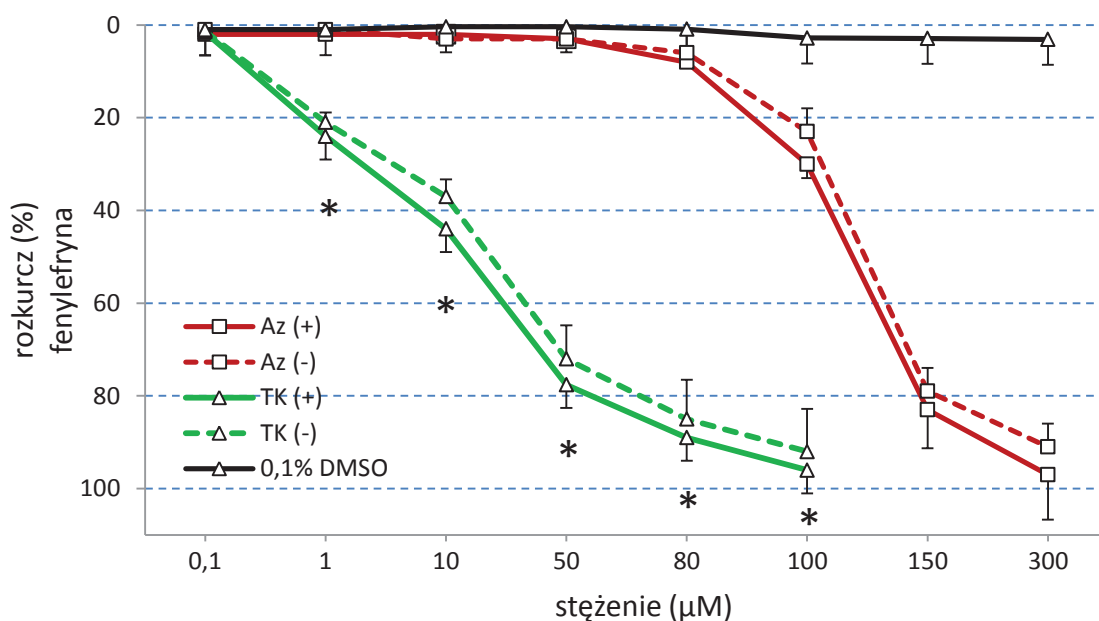
Ryc. 24. Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

### *Efekt działania L-kynureniny na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Ryc. 25 i ryc. 26 przedstawiają krzywe zależności dawka – odpowiedź dla wzrastających stężeń L-kynureniny (0,1–300  $\mu\text{M}$ ) w badanej grupie. L-kyn rozkurczała w sposób zależny od dawki, obkurczone wcześniej fenylefryną (1  $\mu\text{M}$ ) naczynia aorty, zarówno w grupie zawierającej izolowane fragmenty, pochodzące z części zstępującej (ryc. 25) jak i z części wstępującej (ryc. 26). L-kyn, w stężeniach powyżej 150  $\mu\text{M}$ , silniej rozkurczała izolowane fragmenty aorty część zstępująca ( $\acute{s}$ +)  $\text{pIC}_{50} = 3,91 \pm 0,04$ , ( $\acute{s}$ -)  $\text{pIC}_{50} = 3,85 \pm 0,06$  w porównaniu do części wstępującej aorty ( $\acute{s}$ +)  $\text{pIC}_{50} = 3,89 \pm 0,01$  oraz ( $\acute{s}$ -)  $\text{pIC}_{50} = 3,79 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Nie stwierdzono w działaniu L-kyn statystycznie znamiennej różnicy w sile działania między fragmentami aorty, w których usunięto śródbłonek. L-kyn poniżej 1  $\mu\text{M}$  nie wywierała działania na naczynia.



Ryc. 25. Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).

TK, tętnica kregkowa II rzędu; Az, aorta część zstępująca.

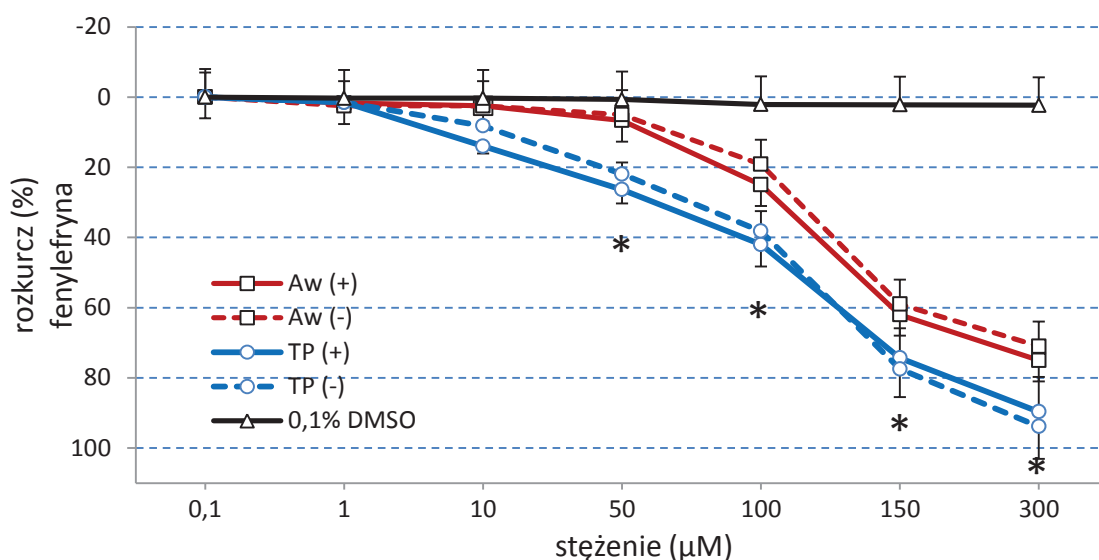
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,001$  Wyniki statystycznie znamienne w porównaniu do grupy pierścieni aorty (jednoczynnikowa ANOVA, test Newmana i Keulsa)

W przypadku izolowanych pierścieni tętnicy płucnej, uzyskano wyniki o wartościach zbliżonych (ś+)  $pIC_{50} = 3,97 \pm 0,02$  oraz (ś-)  $pIC_{50} = 3,95 \pm 0,02$  ( $n = 6$ ) do wartości uzyskanych w grupie pierścieni aorty wstępującej.

Natomiast w grupie fragmentów naczyń pochodzących z odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej, zauważono statystycznie wyższą siłę działania (ś+)  $pIC_{50} = 5,06 \pm 0,06$  oraz (ś-)  $pIC_{50} = 4,88 \pm 0,06$  w porównaniu do pozostałych analizowanych pierścieni naczyń ( $p < 0,001$ ,  $n = 6$ ) (ryc. 25).



Ryc. 26. Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).

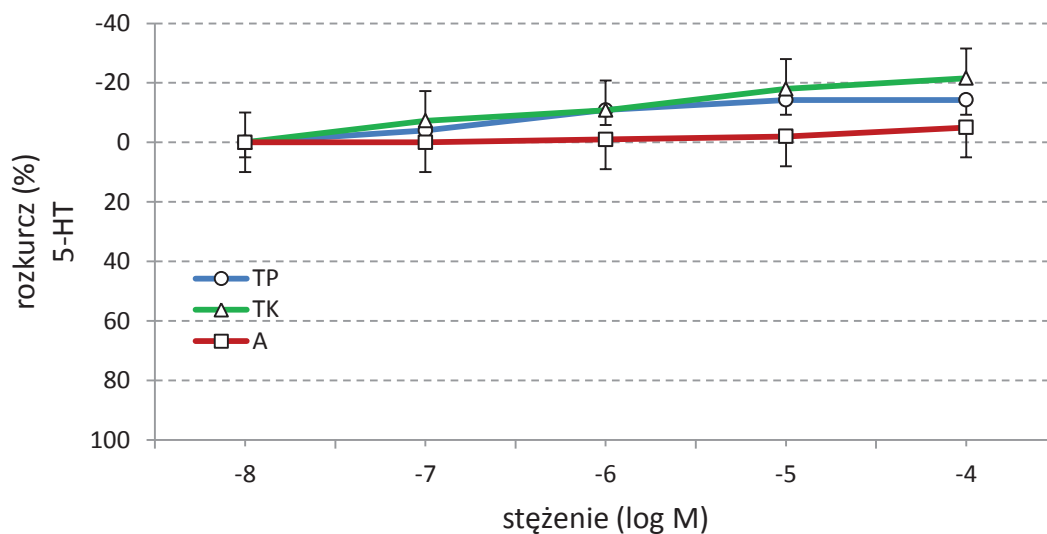
TP, tętnica płucna; Aw, aorta część wstępująca.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

\* $p < 0,05$  Wyniki statystycznie znamienne w grupie (jednoczynnikowa ANOVA, test Newmana i Keulsa)

W kolejnym eksperymencie, L-kyn, w zastosowanym zakresie stężeń (10 nM–100 μM), nie wpływała na aktywność obkurczonych przez 5-HT pierścieni naczyń tętnicznych szczura. Nie stwierdzono też statystycznie znamienych różnic w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica kręzkowa II rzędu, aorta) ( $n = 6$ ) (ryc. 27).



Ryc. 27. Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (5-HT).

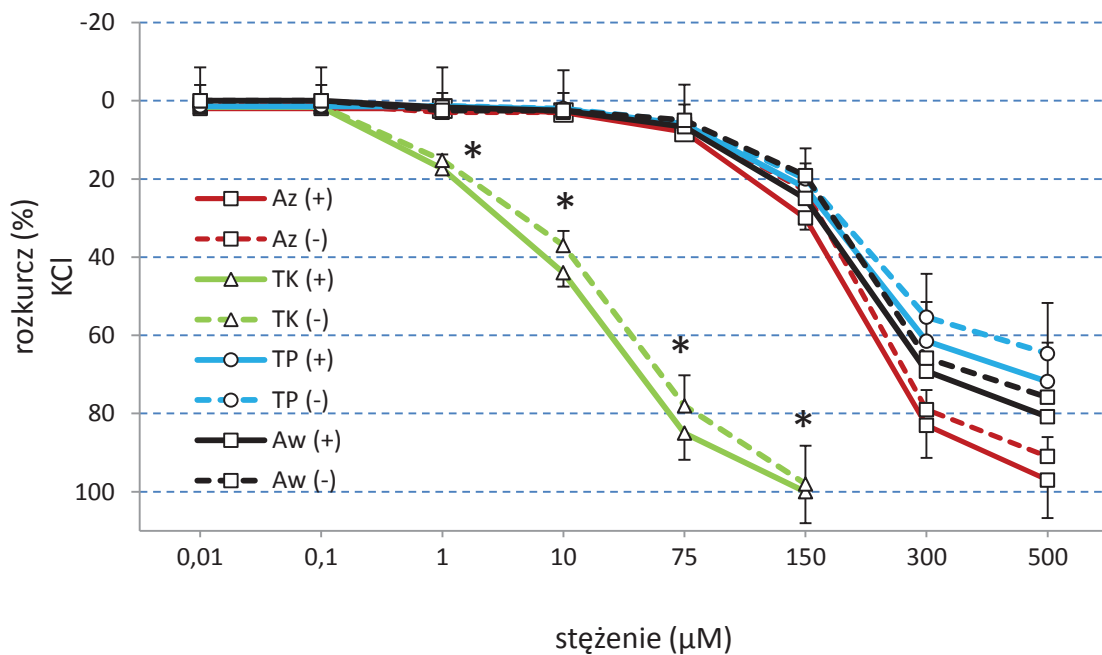
TP, tętnica płucna; TK, tętnica kręzkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)

W kolejnej badanej grupie, L-kyn, w sposób zależny od dawki, wywoływała rozkurcz naczyń tętniczych szczura poddanych wcześniejszemu działaniu 60 mM KCl (ryc. 28). Relaksacja najsilniej uwidaczniała się w przypadku izolowanych pierścieni tętnicy kręzkowej (ś+)  $pIC_{50} = 4,90 \pm 0,05$  oraz (ś-)  $4,72 \pm 0,05$ . L-kyn, w grupie fragmentów pochodzących z części zstępującej aorty (ś+)  $pIC_{50} = 3,80 \pm 0,03$  i (ś-)  $pIC_{50} = 3,67 \pm 0,02$  oraz wstępującej (ś+)  $pIC_{50} = 3,68 \pm 0,01$  i (ś-)  $pIC_{50} = 3,62 \pm 0,03$ , wykazuje statystycznie słabszą siłę działania, w porównaniu do grupy zawierającej izolowane pierścienie tętnicy kręzkowej ( $p < 0,001$ ,  $n = 6$ ). Efekt działania L-kyn na izolowane odcinki tętnicy płucnej jest najslabszy (ś+)  $pIC_{50} = 3,71 \pm 0,06$  i (ś-)  $3,64 \pm 0,03$  i statystycznie nie różni się od wyników otrzymanych w grupie pierścieni aorty ( $n = 6$ ).





Ryc. 28. Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; Az, aorta część zstępująca; Aw, aorta część wstępująca.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

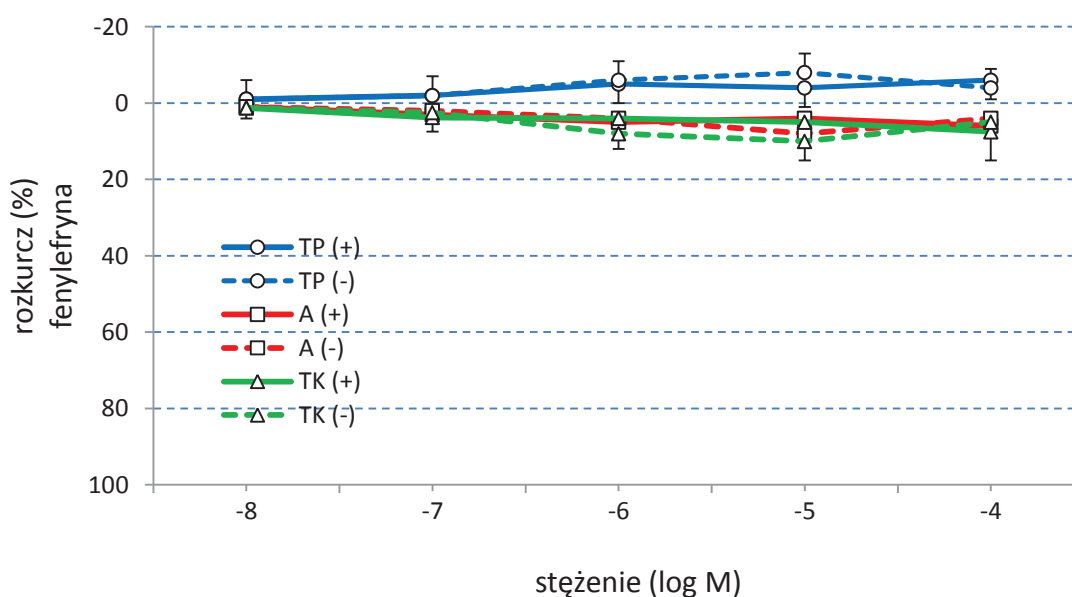
Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

\* $p < 0,001$  Wyniki statystycznie znamienne w porównaniu do grupy pierścieni aorty oraz tętnicy płucnej (jednoczynnikowa ANOVA, test Newmana-Keulsa)

### *Efekt działania kwasu kynureninowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Kwas kynureninowy, w zastosowanym zakresie stężeń od 10 nM do 100  $\mu$ M, nie wpływał na reaktywność naczyń tętniczych szczura obkurczonych roztworem fenylefryny, 5-HT oraz KCl, co przedstawiono na ryc. 29, ryc. 30, ryc. 31. Nie stwierdzono też statystycznie znamiennych różnic w badanych grupach (śródbłonek zachowany i śródbłonek usunięty).



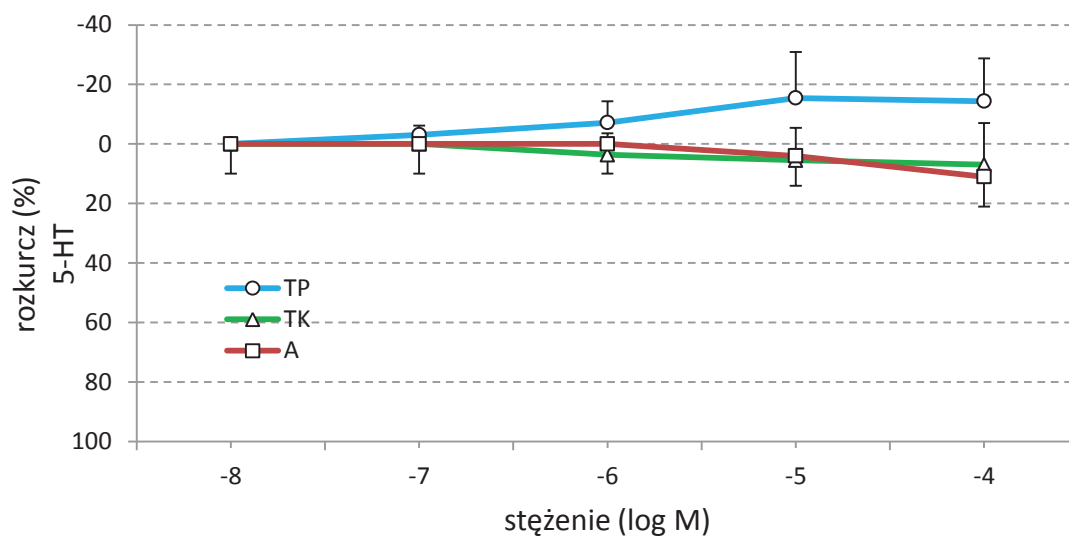
Ryc. 29. Efekt działania KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).

TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

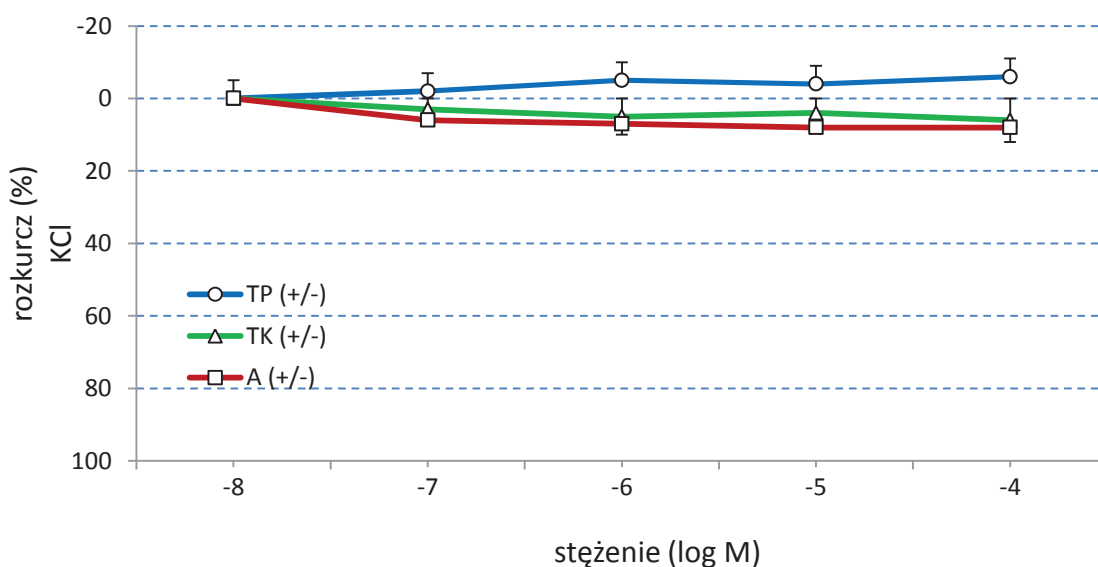
Wyniki statystycznie nieznamienne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 30. Efekt działania KYNA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10  $\mu$ M 5-HT). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 31. Efekt działania KYNA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

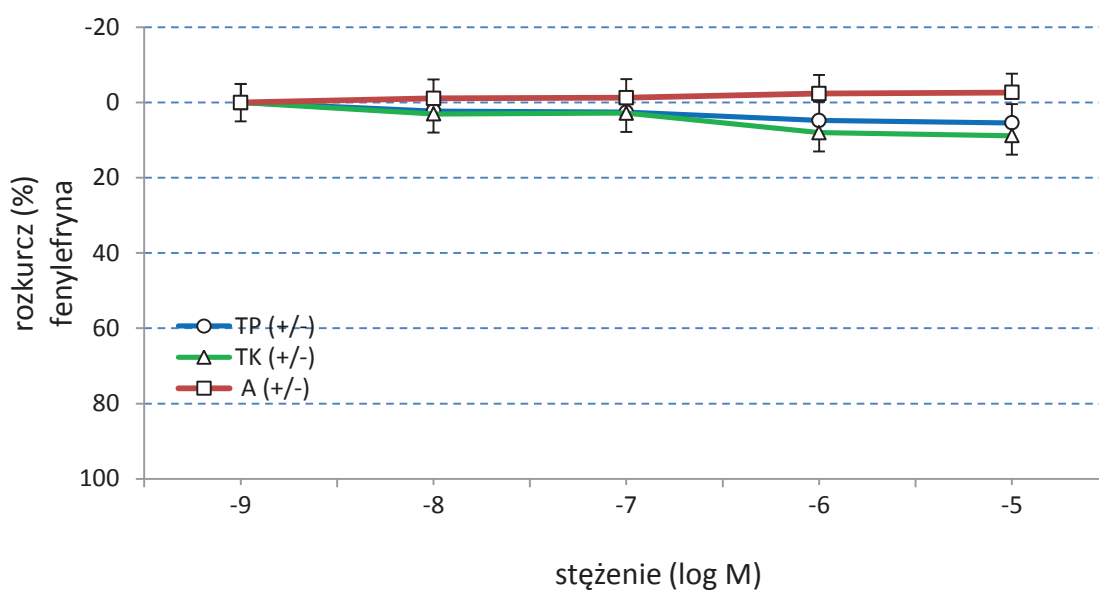
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

### *Efekt działania 3-hydroksy-L-kynureniny na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

3-OH-L-KYN, w zastosowanym przedziale stężeń od 1 nM do 10  $\mu$ M, nie wywierał wpływu na naczynia tętnicze szczura poddane wcześniejszemu działaniu fenylefryny (ryc. 32). Nie stwierdzono też statystycznie znamiennych różnic w badanych grupach, przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku.

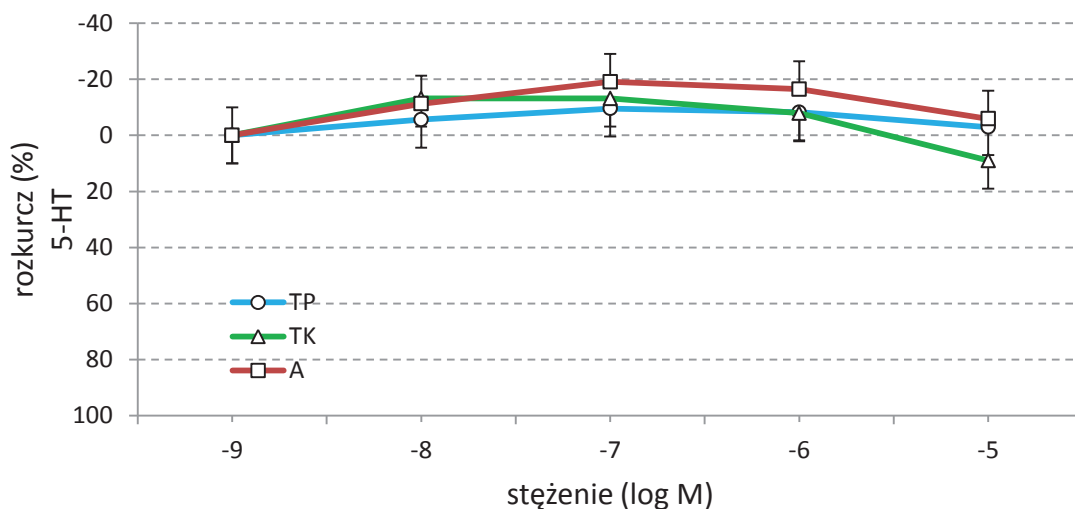


Ryc. 32. Efekt działania 3-OH-L-KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta. (+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamienne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

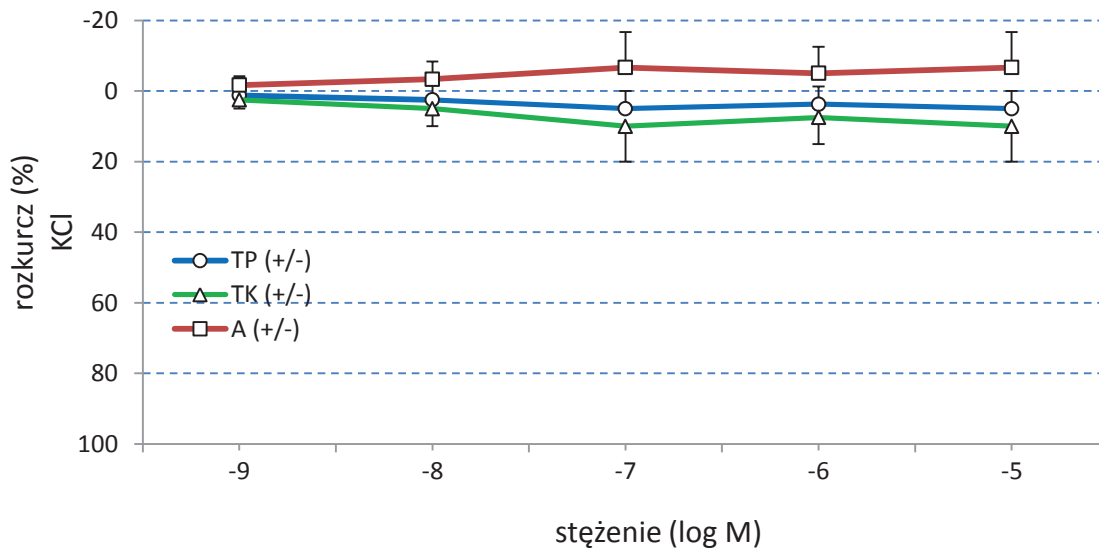
W kolejnym eksperymencie badano wpływ 3-OH-L-KYN na naczynia tętnicze szczura poddane działaniu 5-HT oraz KCl. Nie stwierdzono wpływu badanego związku na reaktywność analizowanych naczyń tętniczych. Otrzymane wyniki przedstawia ryc. 33 oraz ryc. 34



Ryc. 33. Efekt działania 3-OH-L-KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (5-HT). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 34. Efekt działania 3-OH-L-KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

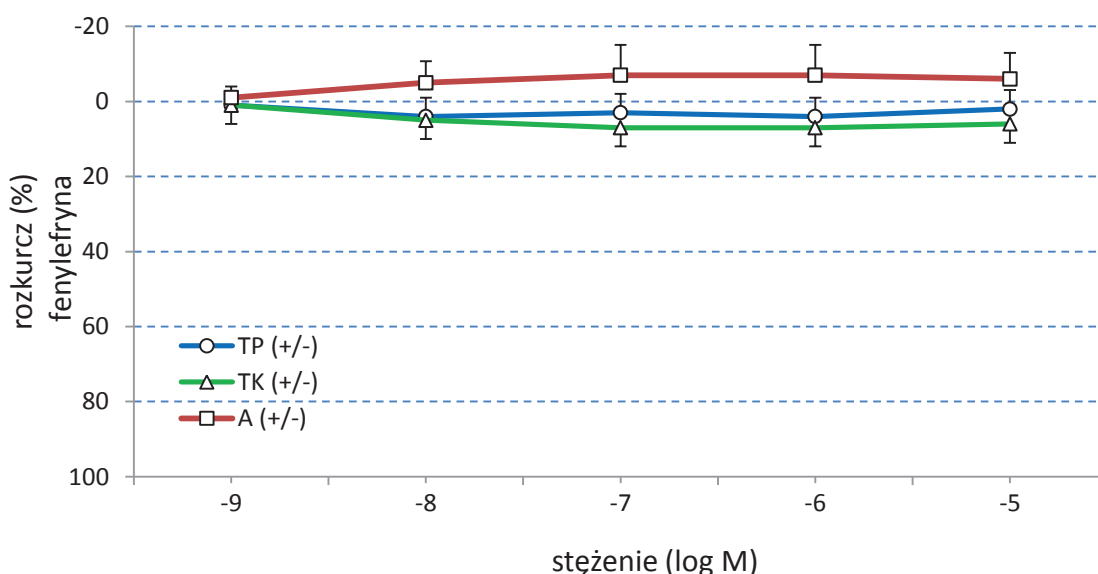
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

### *Efekt działania kwasu 3-hydroksyantranilowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Kwas 3-hydroksyantranilowy, w stężeniach poniżej 10  $\mu\text{M}$ , nie wpływał na aktywność obkurczonych roztworem fenylefryny fragmentów izolowanych naczyń tętnicznych. Nie stwierdzono też statystycznie znamiennych różnic w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica kręzkowa II rzędu, aorta), przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku (ryc. 35).



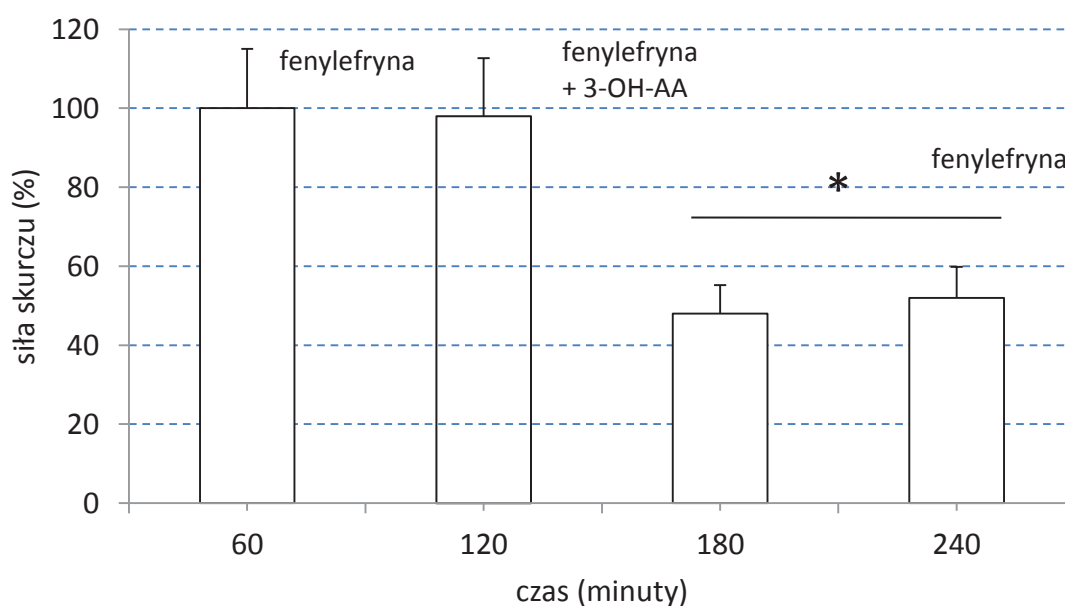
Ryc. 35. Efekt działania 3-OH-AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna). TP, tętnica płucna; TK, tętnica kręzkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamienne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

Zauważono natomiast, że reaktywność naczyń malała po użyciu 3-OH-AA w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  i wyższym, osiągając siłę skurczu zaledwie 50% po ponownym podaniu fenylefryny, w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). W stężeniu powyżej 100  $\mu\text{M}$  naczynia tętnicze szczura wymagały wymiany na nowe, w celu osiągnięcia wyjściowej reaktywności (ryc. 36).

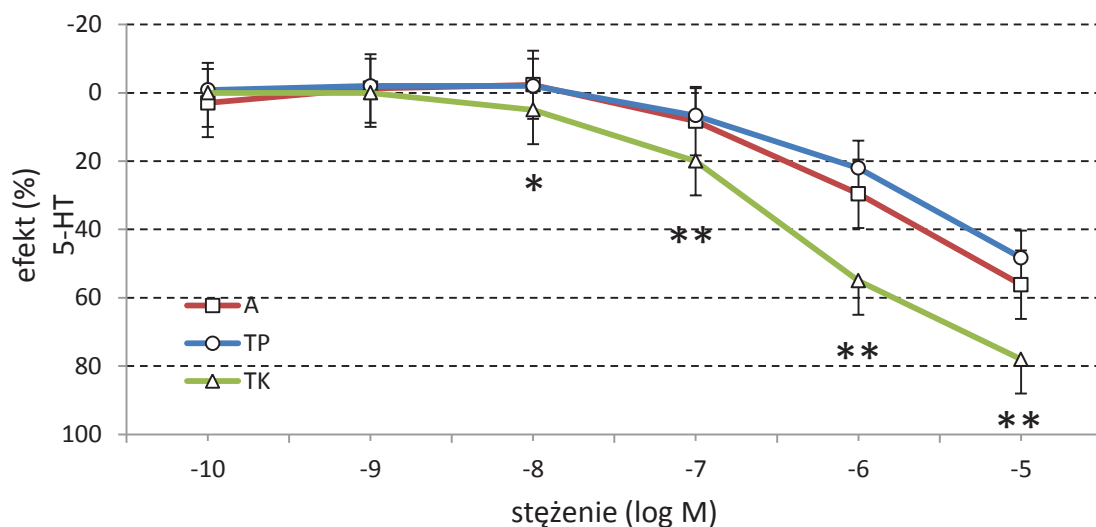


Ryc. 36. Efekt działania fenylefryny oraz 3-OH-AA (10  $\mu$ M) na naczynia tętnicze szczura w kolejnych minutach trwania doświadczenia.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

\* $p < 0,05$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do wartości w grupie poddanej działaniu fenylefryny na początku eksperymentu (jednoczynnikowa ANOVA, test Newmana i Keulsa)

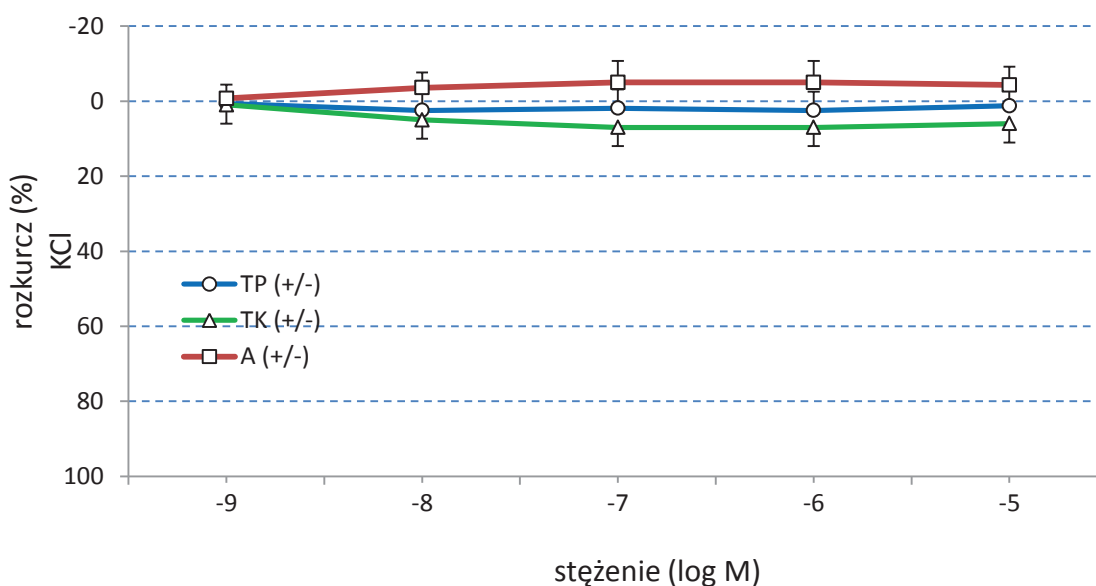
W kolejnym eksperymencie badano wpływ 3-OH-AA na naczynia tętnicze szczura poddane działaniu 5-HT. Krzywe zależności dawka – odpowiedź dla wzrastających stężeń 3-OH-AA przedstawia ryc. 37. 3-OH-AA, w sposób zależny od stężenia (0,1 nM–10  $\mu$ M), wpływał na reaktywność izolowanych naczyń. 3-OH-AA, w stężeniach powyżej 10 nM, silniej rozkurczał izolowane fragmenty tętnicy krezkowej ( $\acute{s}$ +)  $pIC_{50} = 6,17 \pm 0,01$ , w porównaniu do aorty ( $\acute{s}$ +)  $pIC_{50} = 5,26 \pm 0,03$  i tętnicy płucnej ( $\acute{s}$ +)  $pIC_{50} = 4,94 \pm 0,06$  ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ).



Ryc. 37. Efekt działania 3-OH-AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10  $\mu$ M 5-HT). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  Wyniki statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej (jednoczynnikowa ANOVA, test Newman i Keulsa)



Ryc. 38. Efekt działania 3-OH-AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznaczalne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

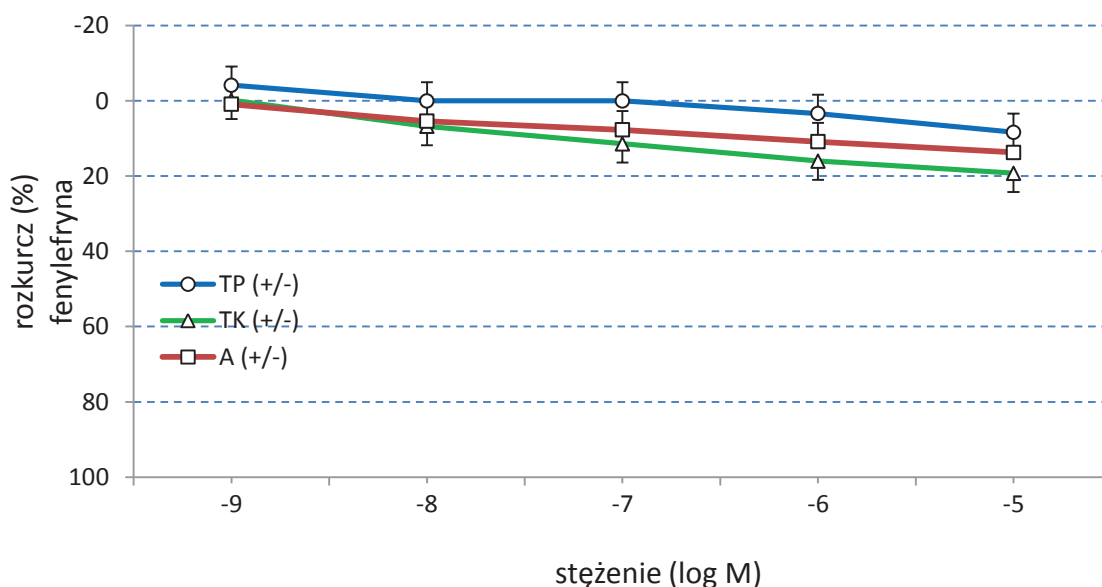


W kolejnym eksperymencie, 3-OH-AA, w zastosowanym zakresie stężeń od 1 nM do 10  $\mu$ M, nie wpływał na aktywność fragmentów naczyń tętnicznych poddanych wcześniejszemu działaniu KCl (60 mM). Nie stwierdzono też statystycznie znamiennej różnicy w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica krępkowa II rzędu, aorta), przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku (ryc. 38).

### *Efekt działania kwasu antranilowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Kwas antranilowy, w stężeniach poniżej 10  $\mu\text{M}$ , nie wpływał na obkurczone naczynia tętnicze szczura (ryc. 39, ryc. 40, ryc. 41). Nie stwierdzono też statystycznie znamiennej różnicy w badanych grupach, przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku.

Natomiast w stężeniach powyżej 1  $\mu\text{M}$  dochodziło do znaczącego wzrostu amplitudy drgań naczyń, osiągającej wartość szczytową przy stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . Po przemyciu naczynia w buforze Krebsa-Henseleita linia podstawowa wracała do wartości początkowej. Pozostałe analizowane związki nie powodowały opisanego działania.

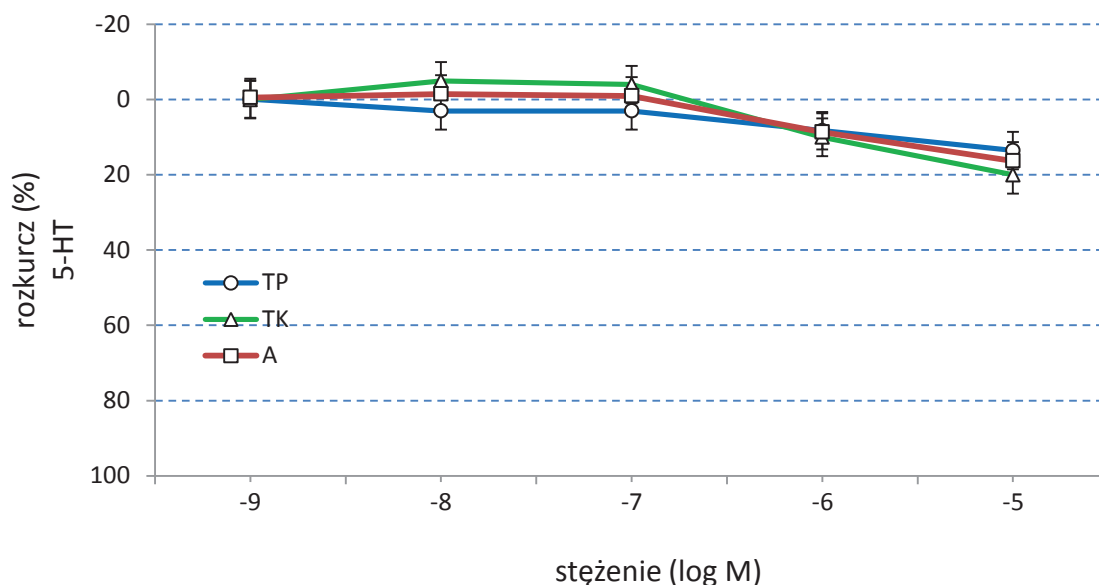


Ryc. 39. Efekt działania AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

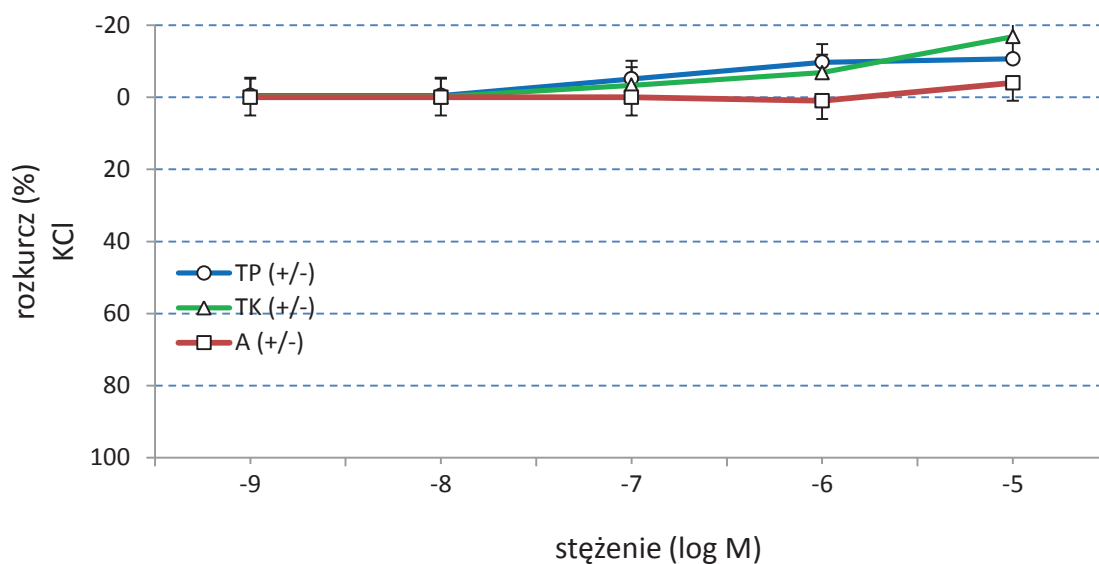
Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 40. Efekt działania AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (5-HT). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 41. Efekt działania AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl).

TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

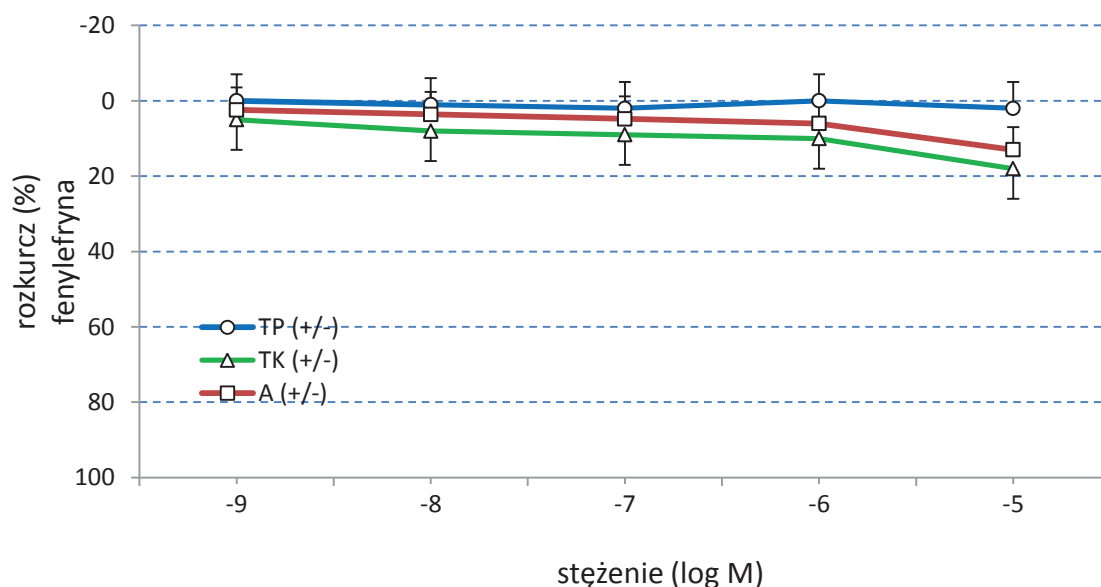
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

### *Efekt działania kwasu ksanturenowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Kwas ksanturenowy, w zastosowanym zakresie stężeń (1 nM–10  $\mu$ M), nie wpływał na reaktywność obkurczonych roztworem fenylefryny naczyń krwionośnych szczura. Nie stwierdzono też statystycznie znamienych różnic w badanych grupach naczyń przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku (ryc. 42).



Ryc. 42. Efekt działania XA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).

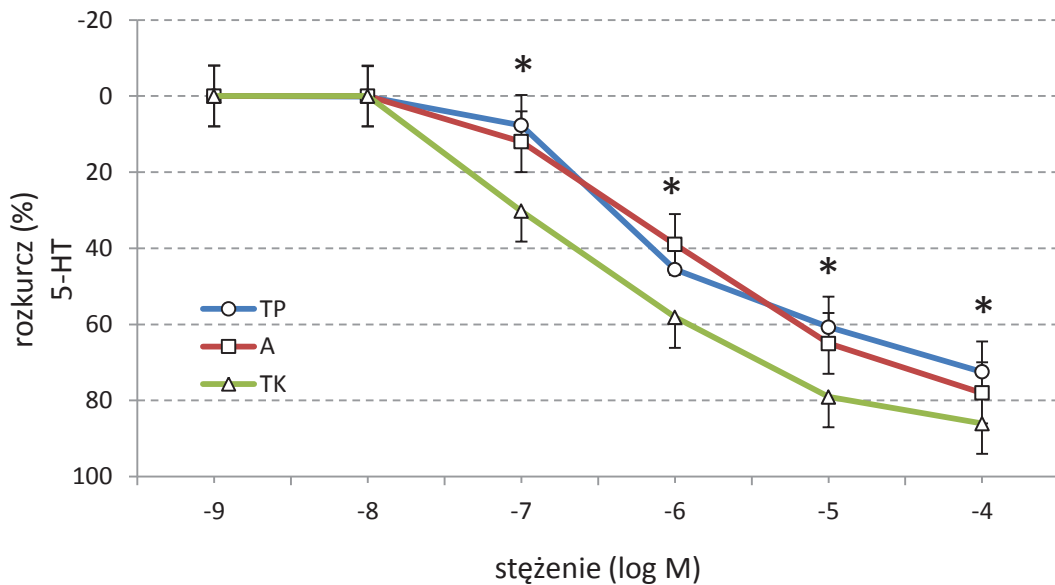
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamienne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

Natomiast w kolejnym eksperymencie, XA, w stężeniach powyżej 100 nM w sposób zależny od dawki, rozkurczał naczynia tętnicze szczura poddane wcześniejszemu działaniu 5-HT (10  $\mu$ M). Relaksacja naczyń najsilniej uwidaczniała się w przypadku izolowanych pierścieni tętnicy krezkowej  $pIC_{50} = 6,31 \pm 0,09$  (ryc. 43). W grupie izolowanych fragmentów naczyń pochodzących z części wstępującej aorty  $pIC_{50} = 5,48 \pm 0,09$  oraz zstępującej aorty  $pIC_{50} = 5,41 \pm 0,06$ , XA wykazywał statystycznie słabszą siłę działania, w porównaniu do grupy zawierającej izolowane pierścienie tętnicy krezkowej ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). Nie zaobserwowano statystycznie znamienych

różnic między częścią wstępującą jak i zstępującą aorty. Efekt działania XA na izolowane odcinki tętnicy płucnej ( $pIC_{50} = 5,57 \pm 0,19$ ) statystycznie nie różnił się od wartości otrzymanych w grupie pierścieni aorty ( $n = 6$ ).



Ryc. 43. Efekt działania XA na obkurczone naczynia tętnicze szczura ( $10 \mu\text{M}$  5-HT).

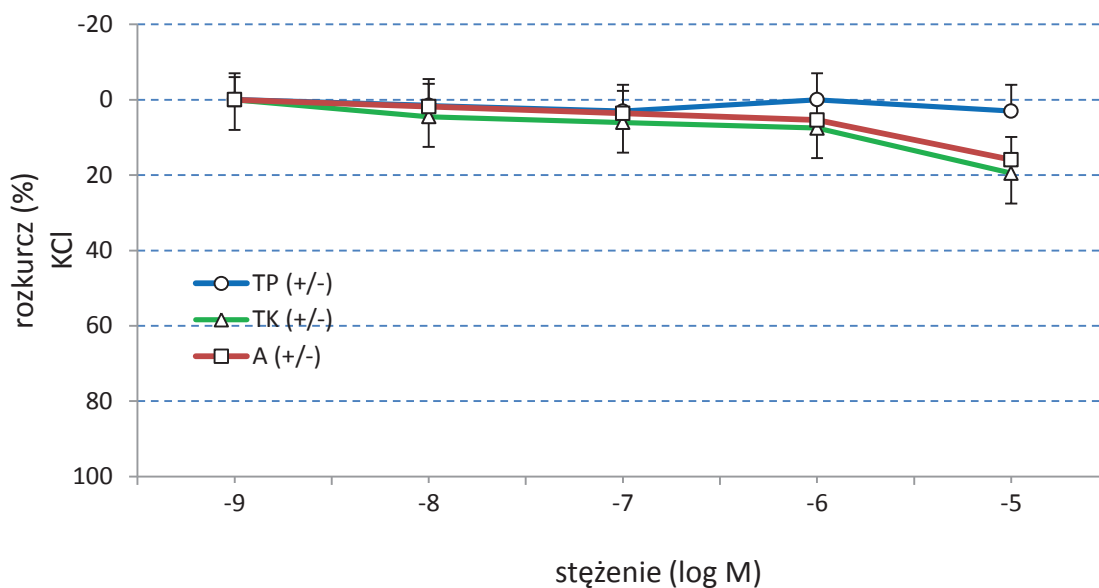
TP, tętnica płucna; A, aorta; TK, tętnica krezkowa II rzędu.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,01$  Wyniki statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej

(jednoczynnikowa ANOVA, test Newman i Keulsa)

Kolejnym badanym parametrem, był wpływ XA na reaktywność fragmentów naczyń tętnicznych obkurczonych roztworem KCl ( $60 \text{ mM}$ ). Nie stwierdzono, w zastosowanym zakresie stężeń ( $1 \text{ nM}$ – $10 \mu\text{M}$ ), statystycznie znamiennej różnicy w działaniu XA w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica krezkowa II rzędu, aorta), przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku (ryc. 44).



Ryc. 44. Efekt działania XA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

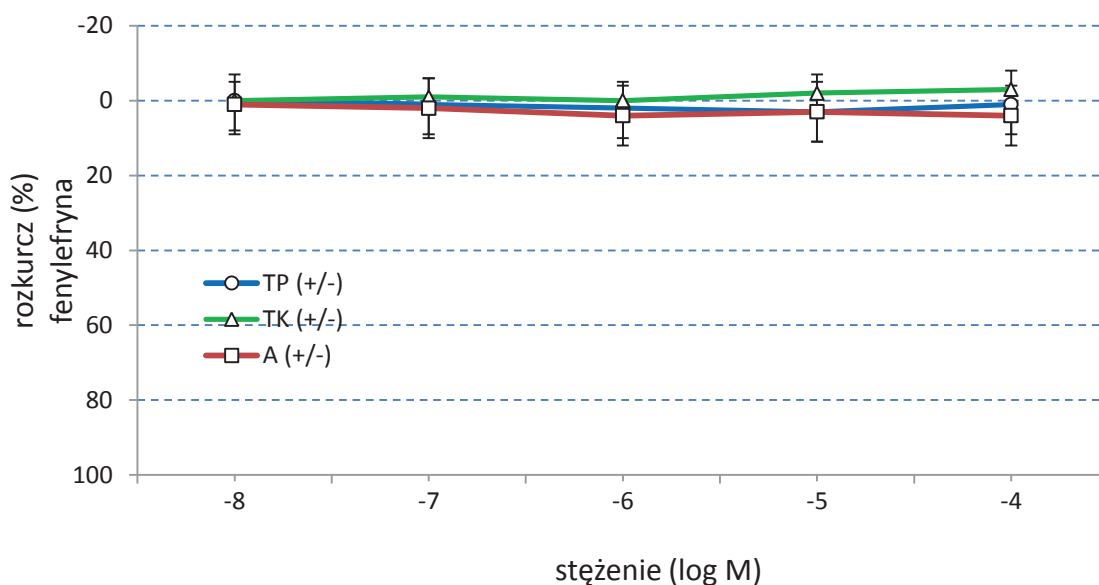
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

### *Efekt działania kwasu chinolinowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Kwas chinolinowy, w zastosowanym zakresie stężeń (10 nM–100  $\mu$ M), nie wpływał na aktywność obkurczonych naczyń tętniczych szczura. Nie stwierdzono też statystycznie znamiennej różnicy w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica krezkowa II rzędu oraz aorta), przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku. Otrzymane wyniki przedstawiono na ryc. 45, ryc. 46, ryc. 47.



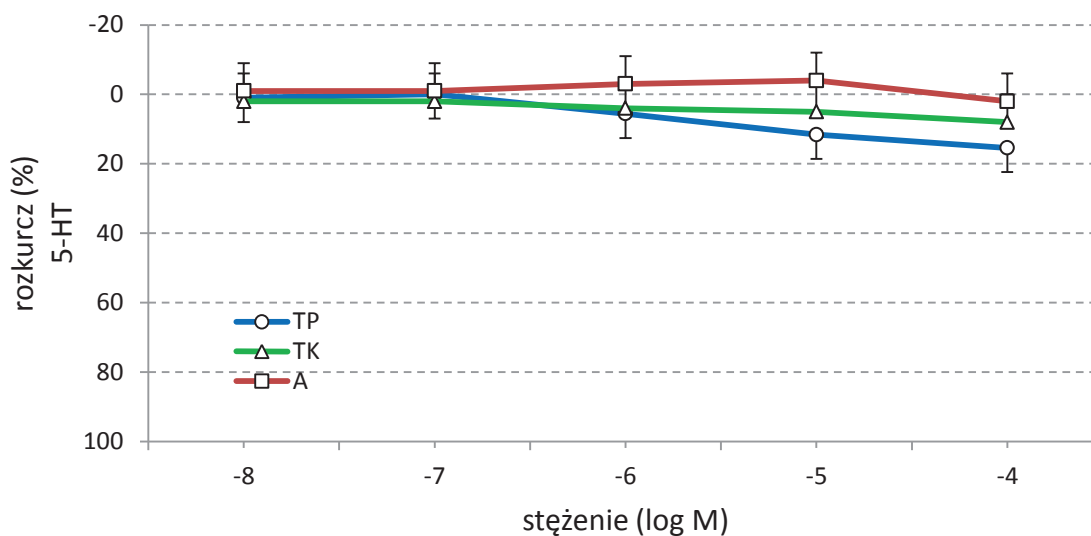
Ryc. 45. Efekt działania QUIN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).

TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznaczne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

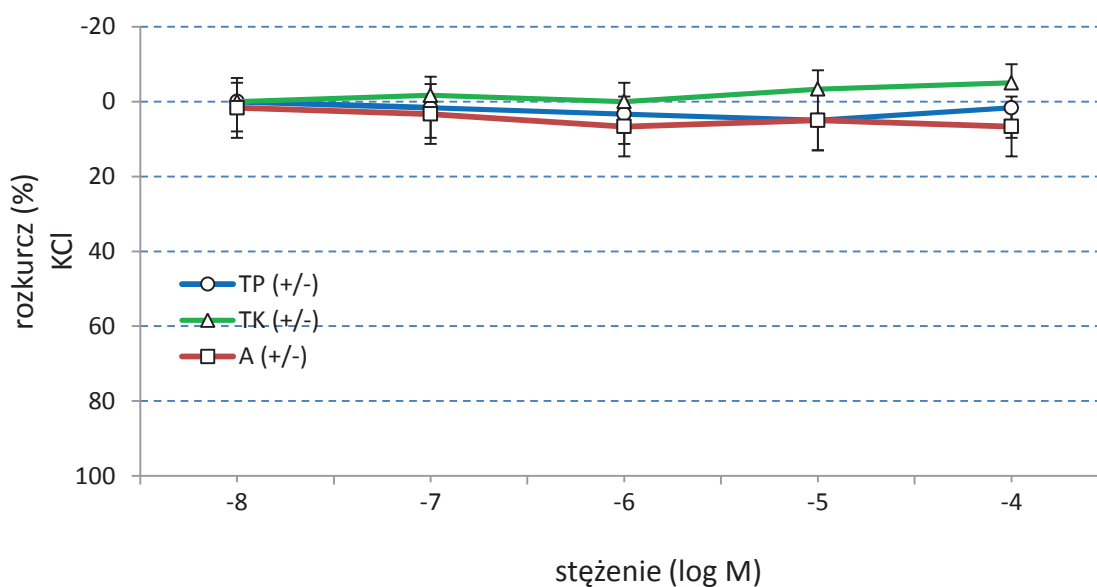


Ryc. 46. Efekt działania QUIN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10  $\mu$ M 5-HT).

TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie znamienne w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 47. Efekt działania QUIN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl).

TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

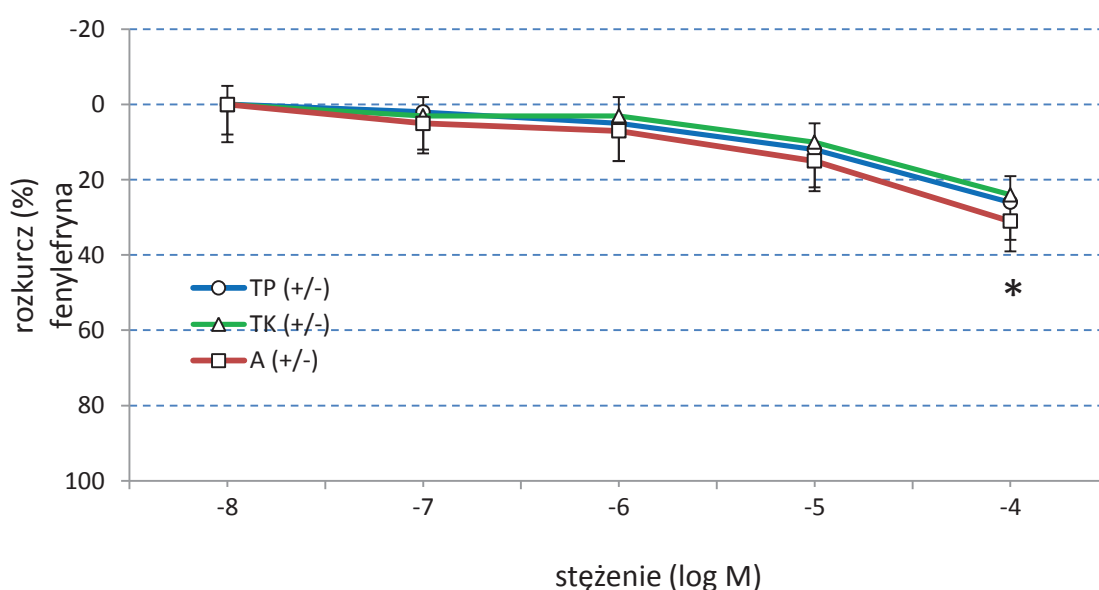
Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamienne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)



### *Efekt działania kwasu pikolinowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

Kwas pikolinowy, w sposób zależny od dawki, wpływał na izolowane odcinki naczyń tętniczych szczura, niezależnie od obecności sprawnego śródbłonka. 2-PA, w stężeniu powyżej 100  $\mu\text{M}$ , znamienne statystycznie silniej rozkurczał naczynia tętnicze szczura poddane wcześniejszemu działaniu fenylefryny, w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) (ryc. 48). Natomiast nie stwierdzono w działaniu 2-PA statystycznie znamiennych różnic w działaniu na poszczególne odcinki tętnic (tętnica płucna, tętnica krezkowa II rzędu oraz aorta).



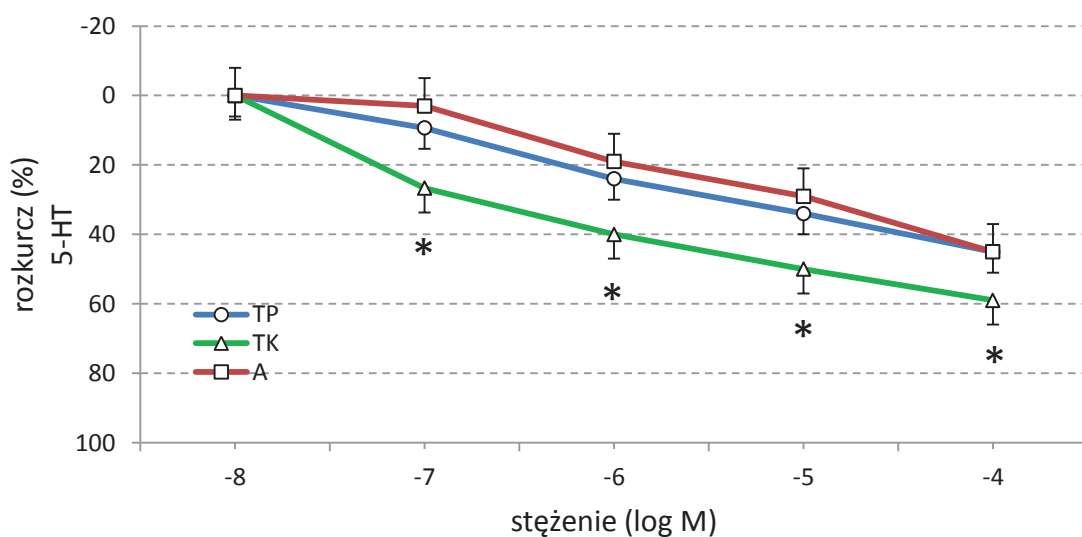
Ryc. 48. Efekt działania 2-PA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 8 eksperymentów

\* $p < 0,05$  Wynik statystycznie znamienny w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej (test t-Studenta)

W kolejnym doświadczeniu, badano wpływ 2-PA na naczynia tętnicze poddane wcześniejszemu działaniu 5-HT. Ryc. 49 przedstawia krzywe zależności dawka–odpowiedź dla wzrastających stężeń badanego związku. 2-PA, w sposób zależny od stężenia (10 nM–100 μM), wpływał na reaktywność izolowanych naczyń tętniczych szczura. 2-PA, w stężeniach 100 nM i powyżej, silniej rozkurczał izolowane fragmenty pochodzące z odcinków II rzędu tętnicy krezkowej (ś+)  $pIC_{50} = 5,13 \pm 0,08$ , w porównaniu do izolowanej aorty wstępującej (ś+)  $pIC_{50} = 3,85 \pm 0,09$ , jak i zstępującej (ś+)  $pIC_{50} = 3,79 \pm 0,01$  oraz tętnicy płucnej (ś+)  $pIC_{50} = 3,86 \pm 0,13$  ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ).

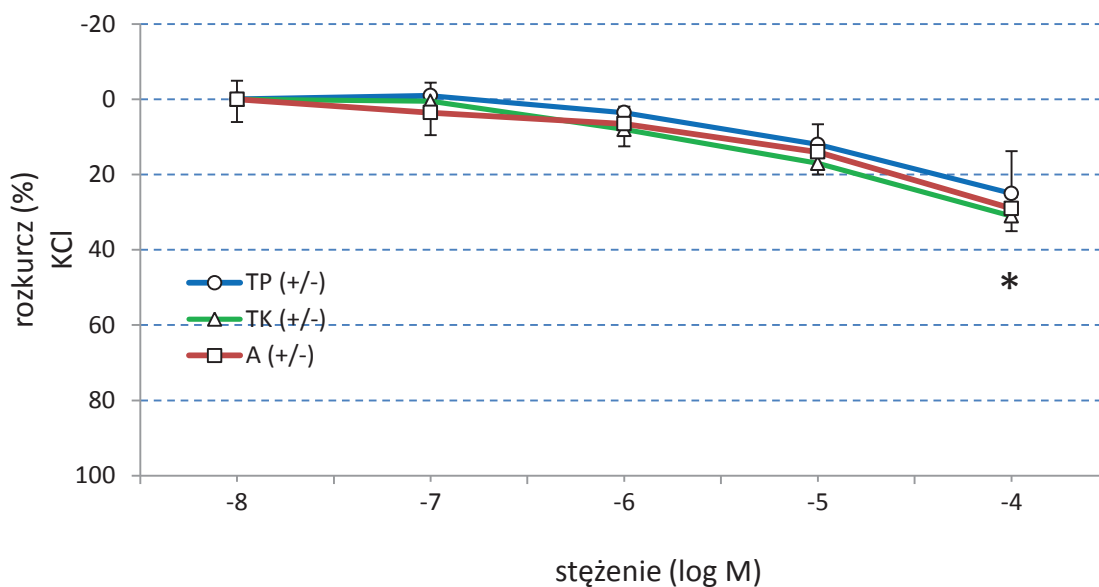


Ryc. 49. Efekt działania 2-PA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 μM 5-HT). TP, tętnica płucna; TK, tętnica krezkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie ± SEM z 6 eksperymentów

\* $p < 0,01$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do wartości w grupie naczyń aorty i tętnicy płucnej (jednoczynnikowa ANOVA, test Newman i Keulsa)

Następnie analizowano wpływ 2-PA na naczynia tętnicze szczura obkurczone roztworem KCl (60 mM). Zaobserwowano, że 2-PA w stężeniu powyżej 100 μM, znamienne statystycznie silniej rozkurczał analizowane pierścienie naczyń, w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). Natomiast nie stwierdzono w działaniu 2-PA statystycznie znamiennej różnic w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica krezkowa II rzędu oraz aorta) (ryc. 50). Mechaniczne usunięcie śródbłonna nie wywierało wpływu na opisany efekt (tabela 7).



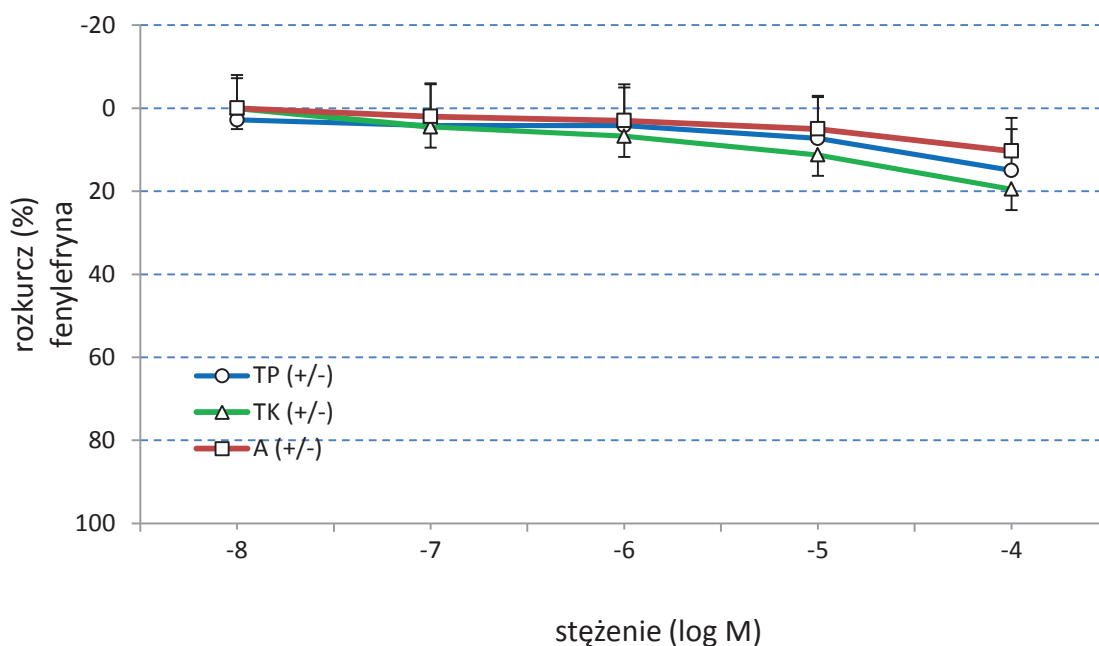
Ryc. 50. Efekt działania 2-PA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl). TP, tętnica płucna; TK, tętnica kręzkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 8 eksperymentów

\* $p < 0,05$  Wynik statystycznie znamiennej w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej (test t-Studenta)

### *Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura*

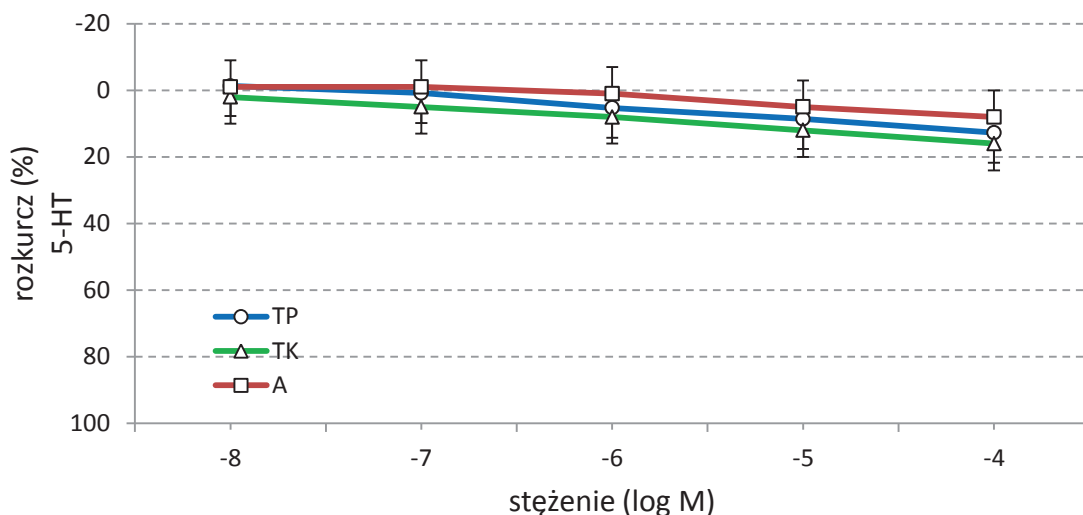
Kwas nikotynowy, w zakresie stężeń od 10 nM do 100  $\mu$ M, nie wpływał na aktywność naczyń tętniczych szczura obkurczonych wcześniej roztworem fenylefryny, 5-HT czy KCl (ryc. 51, ryc. 52, ryc. 53). Nie stwierdzono też statystycznie znamiennych różnic w badanych grupach (tętnica płucna, tętnica kręzkowa II rzędu, aorta), przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku.



Ryc. 51. Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura. TP, tętnica płucna; TK, tętnica kręzkowa II rzędu; A, aorta. (+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznamiennie w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

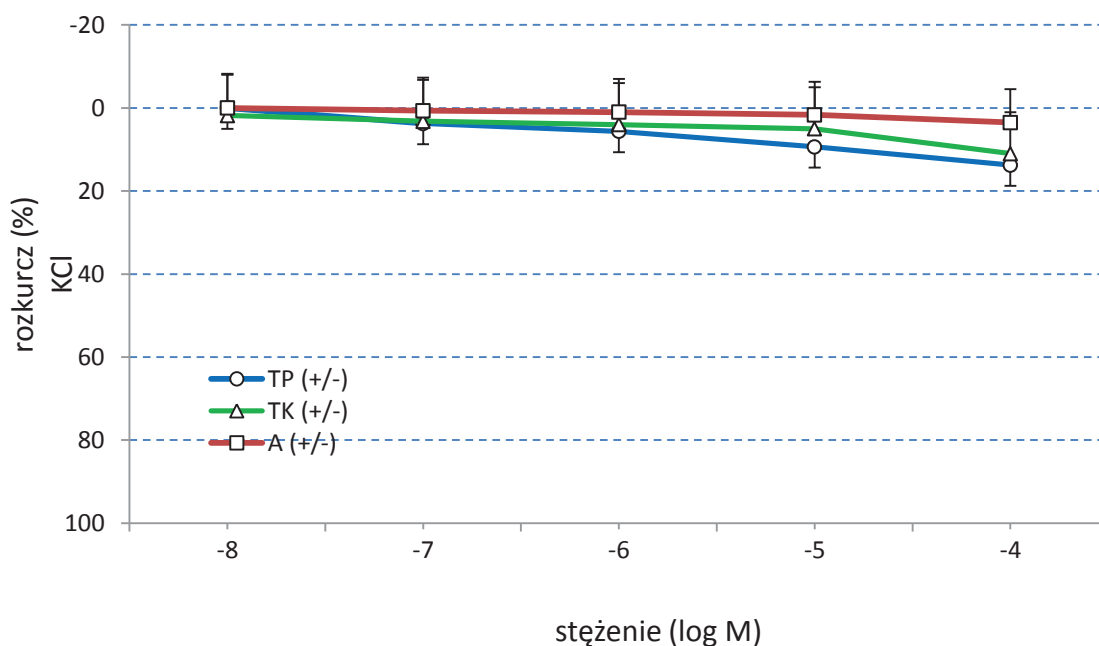


Ryc. 52. Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura.

TP, tętnica płucna; TK, tętnica kręzkowa II rzędu; A, aorta.

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznaczalne w badanej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya)



Ryc. 53. Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura.

TP, tętnica płucna; TK, tętnica kręzkowa II rzędu; A, aorta.

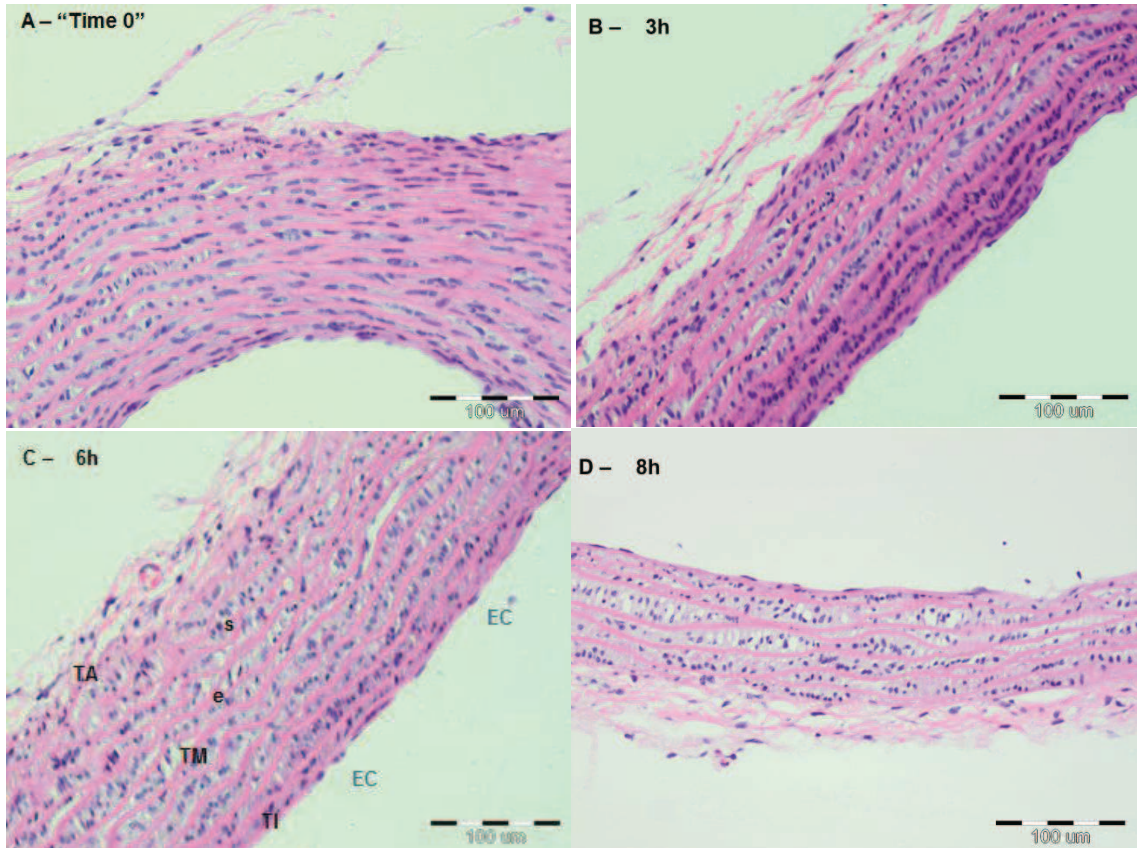
(+) śródbłonek zachowany, (-) śródbłonek usunięty

Wartości przedstawione są jako średnie  $\pm$  SEM z 6-8 eksperymentów

Wyniki statystycznie nieznaczalne w badanej grupie z zachowanym śródbłonkiem w porównaniu do grupy, w której usunięto śródbłonek (test U Manna-Whitneya)

#### 4.4. Ocena preparatów histologicznych

##### Badania morfologiczne



Ryc. 54. Skrawki histologiczne barwione H&E reprezentujące fragmenty aorty wstępującej (x20) w czasie „0”, w 3, 6 i 8 godzinie inkubacji (odcinki podłużne). Komórki śródbłonna (IC), warstwa wewnętrzna – tunica intima (Ti), elastyczne lamele (E), jądra komórek mięśni gładkich (s), warstwa środkowa – tunica media (TM) i przydanka – adventitia (TA).

Nie zaobserwowano zmian morfologicznych w strukturze naczyń tętniczych w trakcie trwania 6 godzinowego eksperymentu. W tym czasie warstwa wewnętrzna wciąż składała się z ciągłych warstw komórek śródbłonna. Warstwa środkowa posiadała liczne normalnie wyglądające warstwy laminy, o kształcie falistym i ułożeniu koncentrycznym. Między lamelami w szczelinach widoczne są niezmiennione komórki mięśni gładkich. Nie stwierdzono też znamienych zmian w grubości tej warstwy. Przydanka została rozpoznana przez normalnie wyglądające elementy tkanki włóknistej.

Zaczynając od siódmej godzinny inkubacji, tylko kilka pierścieni aorty ujawniło pewne zmiany morfologiczne w swojej strukturze. Obserwowane zmiany były ograniczone do warstwy środkowej, gdzie doszło do nieznacznej degeneracji w jej obrębie. Struktura uległa rozluźnieniu, pojawiły się koncentryczne przestrzenie, gdzie mogło dojść do martwicy komórek mięśni gładkich (ryc. 54).

Nie stwierdzono różnic w preparatach histologicznych pomiędzy odcinkami aorty zstępującej a wstępującej, a także między odcinkami tętnicy płucnej i tętnicy krezkowej w trakcie 6 godzinnej inkubacji.

## 5. DYSKUSJA

Komórki śródbłonka naczyniowego syntetyzują związki o działaniu rozszerzającym naczynia, takie jak: NO, prostacykliny, nadtlenek wodoru, tlenek węgla oraz kwas epoksyeikozatrienowy. Z kolei do substancji o działaniu kurczącym naczynia, powstających również w komórkach śródbłonka zaliczamy tromboksan A<sub>2</sub>, prostaglandynę H<sub>2</sub> oraz endotelinę typu 1. Związki te działają miejscowo i odgrywają istotną rolę w utrzymaniu prawidłowego napięcia naczyń i kontroli ciśnienia tętniczego.

Najnowsze badania wskazują, iż podanie tryptofanu w obecności sprawnego śródbłonka w warunkach *in vivo*, prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych za pośrednictwem aktywacji szlaków cyklicznej adenylanowej i wzrostu cAMP oraz rozpuszczalnej cyklicznej guanylanowej [50, 161, 175]. Kolejne badania potwierdzają, że opisane rozszerzenie naczyń, spowodowane jest przemianom tryptofanu do L-kynureniny zachodzącym przy udzialeIDO w komórkach śródbłonka naczyń. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wskazują, że L-kynurenina bezpośrednio rozszerza izolowane naczynia krwionośne poddane wcześniejszemu działaniu fenylefryny, jak również działaniu KCl, co potwierdza, że może być kolejnym związkiem aktywnym naczyniowo produkowanym przez komórki śródbłonka [175].

L-kynurenina, podana w dawkach kumulacyjnych do komór inkubacyjnych, wywołała w sposób znamieny relaksację obkurczonych roztworem fenylefryny naczyń tętnicznych szczura, w przeciwieństwie do tych fragmentów naczyń, których nie poddawano wcześniejszemu działaniu fenylefryny. Stężenie L-kynureniny, przy którym doszło do rozszerzenia naczyń, było około 100 razy wyższe (aorta i tętnica płucna) oraz 10 razy wyższe (tętnica krępkowa II rzędu) w porównaniu do fizjologicznego (tabela 6), natomiast korespondowało ze stężeniem, osiągniętym *in vivo* w naczyniach mózgowych zakazonych myszy czy *ex vivo* w tętnicach wieńcowych poddanych wcześniejszemu działaniu IFN- $\gamma$  u świni [175]. Stężenie, które wywołało działanie relaksacyjne na naczynia, było znacznie wyższe od opisanego przez Lapin i Umanskaia [79], natomiast korespondowało z opisanym w badaniach prowadzonych przez Wang i wsp. [175]. Obecność śródbłonka nie wpływała w sposób znamieny na stopień obniżenia napięcia naczyń, co wskazuje na bezpośredni wpływ L-kynureniny na komórki mięśni gładkich naczyń i związany z tym opisany w niniejszej pracy efekt rozkurczowy.



L-kynurenina wywołała również relaksację naczyń, poddanych wcześniejszemu działaniu KCl. Działanie relaksacyjne L-kynureniny na naczynia obserwowano przy stosunkowo wysokich stężeniach.  $IC_{50}$  wynosiło 12  $\mu M$  w przypadku odcinków II rzędu tętnicy krezkowej i statystycznie różniło się od wyników otrzymanych w grupie pierścieni aorty wstępującej (208  $\mu M$ ), aorty zstępującej (158  $\mu M$ ) czy tętnicy płucnej (195  $\mu M$ ). Otrzymane wyniki wskazują na wyższą wrażliwość naczyń oporowych, odpowiedzialnych za spadek ciśnienia, np. w czasie trwania wstrząsu septycznego, w porównaniu do naczyń przewodzących [23, 177]. Obserwacje te są zgodne z badaniami prowadzonymi przez Wang i wsp., w których L-kynurenina w stężeniach powyżej 300  $\mu M$  wywołała relaksację obkurczonych tętnic wieńcowych świń [175]. Efekt działania był porównywalny do opisanego w przypadku roztworu fenylefryny, co pozwala stwierdzić, że L-kynurenina może powodować relaksację naczyń poprzez blokowanie napięciowo zależnych kanałów  $Ca^{2+}$  ( $Ca_v1.2$ ) typu L, występujących w mięśniach gładkich naczyń [130].

Jedną z obserwacji, której nie można łatwo wytłumaczyć stwierdzeniem, że L-kynurenina rozszerza naczynia krwionośne poprzez hamowanie kanałów  $Ca^{2+}$  typu L obecnych w komórkach mięśni gładkich naczyń, jest różnica w czułości pomiędzy naczyniami oporowymi a przewodzącymi [67, 177]. Rozbieżności te mogą wynikać z odrębnej budowy anatomicznej warstwy mięśniowej naczyń, pomiędzy tętnicami sprężystymi (aorta, tętnica płucna) a mięśniowymi (tętnica krezkowa II rzędu), gdzie w przypadku tętnicy krezkowej warstwa mięśniowa jest w wyższym stopniu rozwinięta [1]. Możliwe jest także, że kanały  $Ca^{2+}$  typu L obecne w małych naczyniach krwionośnych (oporowych) różnią się od kanałów obecnych w naczyniach przewodzących (aorta) pod względem struktury jak i gęstości [22, 67]. Dalsze badania nad receptorami mogłyby wyjaśnić ten fenomen.

Jednak bardziej prawdopodobne wydaje się, że opisane różnice wywodzą się ze sposobu dostarczania związku chemicznego do receptora lub jego biodegradacji w różnych typach naczyń [67]. Działanie hamujące L-kynureniny było znacznie niższe i utrzymywało się na stałym poziomie, zarówno w przypadku pierścieni naczyń aorty jak i tętnicy płucnej, z zachowanym śródbłonkiem jak i usuniętym ( $IC_{50} = 158-208 \mu M$ ). Z kolei wpływ L-kynureniny na tętnicę krezkową był szybki i przemijający ( $IC_{50} = 12 \mu M$ ), co może sugerować że związek ten ulega szybszemu rozkładowi po wejściu do komórek mięśni gładkich naczyń typu przewodzącego, w porównaniu do małych naczyń oporowych.

Dalsze badania są konieczne w celu porównania i oceny relaksacji naczyń krwionośnych typu oporowego, w stosunku do naczyń przewodzących w odpowiedzi na działanie L-kynureniny.

Kwas pikolinowy wywiera wyraźny wpływ hamujący na naczynia tętnicze obkurczone roztworem serotoniny i tylko w niewielkim stopniu antagonizuje działanie fenylefryny, jak również KCl oraz wywołane ich działaniem zwężenie tętnic. Jest to częściowo zgodne z wynikami badań otrzymanymi przez Lapin i Umanskaia, w których to wykazano, że kwas pikolinowy zarówno znacznie potęgował wpływ serotoniny na mięśnie gładkie naczyń, jak również wykazywał działanie antagonistyczne [79]. Opisane w przedstawionej rozprawie doktorskiej działanie kwasu pikolinowego, nie zależało od czynników pochodzenia śródbłonkowego. Mechaniczne usunięcie śródbłonka nie miało wpływu na relaksację pierścieni naczyń obkurczonych fenylefryną czy KCl, przez co wnioskujemy, że kwas pikolinowy może również wywierać bezpośredni wpływ na komórki mięśni gładkich naczyń. W prowadzonych badaniach potwierdzono za pomocą ketanseryny (0,1  $\mu\text{M}$ ), że receptory 5-HT<sub>2A</sub> są funkcjonalne w analizowanych naczyniach tętniczych szczura [33]. Ketanseryna, podana do komór inkubacyjnych, całkowicie zniósła działanie wywołane przez serotoninę. Opisane obserwacje są zgodne z badaniami prowadzonymi przez Sung i wsp.[155]. Wcześniejsze badania dowodzą, że w wyniku aktywacji receptorów 5-HT<sub>2A</sub> oraz receptorów adrenergicznych dochodzi do wzrostu stężenia  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$  w komórkach mięśni gładkich naczyń w wyniku otwarcia kanałów  $\text{Ca}_v^{2+}$  [28, 74, 79, 155, 173]. Doświadczenie z KCl potwierdza powyższą hipotezę. Opisane wyniki wskazują, że kwas pikolinowy może hamować napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza komórki, poprzez hamowanie zależnych od napięcia kanałów  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a tym samym zmniejsza napięcie wywołane czynnikiem powodującym stres, czemu towarzyszy rozszerzenie naczyń. Kwas pikolinowy silniej rozkurczał izolowane fragmenty naczyń poddane działaniu serotoniny z odcinków II rzędu tętnicy krezkowej ( $\text{IC}_{50} = 7,41 \mu\text{M}$ ) w porównaniu do izolowanej aorty ( $\text{IC}_{50} = 151 \mu\text{M}$ ) i tętnicy płucnej ( $\text{IC}_{50} = 138 \mu\text{M}$ ). Należy podkreślić, że opisane stężenia kwasu pikolinowego, wywołujące rozkurcz mięśni gładkich naczyń, praktycznie nigdy nie występują w organizmie człowieka (tabela 6).

W przypadku naczyń poddanych wcześniejszemu działaniu KCl i fenylefryny, relaksacja mięśni gładkich, wywołana przez kwas pikolinowy, uwidaczniała się w

stężeniu powyżej 100  $\mu\text{M}$ . Nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic między poszczególnymi fragmentami naczyń w badanej grupie.

Opisane różnice między reaktywnością poszczególnych odcinków naczyń, poddanych działaniu serotoniny, mogą wynikać ze zdolności kwasu pikolinowego do hamowania mobilizacji jonów  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{wew}}$  z poszczególnych fragmentów naczyń. Na podstawie wyżej przedstawionych wyników wydaje się, że kwas pikolinowy może być nie tylko selektywnym inhibitorem receptora 5-HT<sub>2A</sub>, ale może również działać poprzez receptor alfa 1 adrenergiczny.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że kwas ksanturenowy oraz kwas 3-hydroksyantranilowy działają w sposób selektywny rozkurczająco na naczynia tętnicze, poddane wyłącznie wcześniejszemu działaniu serotoniny. Działanie hamujące kwasu ksanturenowego było znacznie niższe, zarówno w przypadku pierścieni naczyń aorty ( $\text{IC}_{50} = 3,9 \mu\text{M}$ ) jak i tętnicy płucnej ( $\text{IC}_{50} = 2,7 \mu\text{M}$ ), natomiast wpływ na tętnicę krezkową był znacząco szybszy, a stężenie efektywne korespondowało ze stężeniem fizjologicznym ( $\text{IC}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$ ). Podobne różnice, jak opisane powyżej, stwierdzono również w efektach działania kwasu 3-hydroksyantranilowego. Wpływ na odcinki II rzędu tętnicy krezkowej był znacząco szybszy ( $\text{IC}_{50} = 0,7 \mu\text{M}$ ) w porównaniu do dziania na aortę ( $\text{IC}_{50} = 5,6 \mu\text{M}$ ) i tętnicę płucną ( $\text{IC}_{50} = 11,5 \mu\text{M}$ ). Reasumując, skurcz naczyń tętniczych szczura, wywołany serotoniną, odbywa się za pośrednictwem aktywacji receptora 5-HT<sub>2A</sub>, a opisane działanie relaksacyjne badanych związków polega na blokowaniu tego receptora. Wykazano, że ketanseryna – antagonist receptorów 5HT<sub>2</sub> całkowicie znosi działanie serotoniny, zarówno w obecności jak też i bez wyżej wymienionych związków. Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, iż kwas 3-hydroksyantranilowy oraz kwas ksanturenowy mogą wywierać swoje działanie poprzez kanały  $\text{Ca}^{2+}$  typu L, poprzez szlak kinazy tyrozynowej Src lub co jest bardziej prawdopodobne, wywołana relaksacja naczyń może odbywać się za pośrednictwem aktywacji kanałów  $\text{K}_v$ , występujących w mięśniach gładkich naczyń [7, 155].

Przeprowadzone badania potwierdzają brak wpływu tryptofanu, kwasu kynureninowego, 3-hydroksy-L-kynureniny, kwasu chinolinowego oraz niacyny na izolowane naczynia krwionośne, zarówno przy zachowanym jak i usuniętym śródbłonku, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez Wang i wsp. [175]. Natomiast Toda w swoich badaniach, wskazuje na analogię w działaniu 5-hydroksykynureniny oraz serotoniny na izolowane naczynia tętnicze królika [168].

Porównując wyniki obydwu badań, możemy stwierdzić, iż nieznaczna modyfikacja struktury 3-hydroksy-L-kynureniny, może w tym przypadku przyczynić się do aktywacji receptora 5-HT.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że aktywacja farmakologiczna receptorów adrenergicznych oraz serotonergicznych wywiera różny wpływ na kurczliwość mięśni gładkich naczyń tętniczych [1, 67]. Wrażliwość pierścieni odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej na działanie serotoniny jest 10 razy wyższa w porównaniu do pierścieni aorty i tętnicy płucnej, co jest to zgodne z wynikami otrzymanymi przez Adegunloye i Sofola [1].

Działanie fenylefryny na naczynia było także zróżnicowane. Fenylefryna silniej obkurcza mięśnie gładkie naczyń aorty i tętnicy płucnej, w porównaniu do odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej. Nie zaobserwowano różnic we wrażliwości poszczególnych analizowanych naczyń na działanie KCl. W przypadku izolowanych odcinków aorty (część zstępująca), tętnicy płucnej oraz odcinków tętnicy kręzkowej, doświadczenie można rozpocząć po ustabilizowaniu naczynia już po 60 minutach. Natomiast w przypadku izolowanych pierścieni aorty wstępującej potrzebna jest dłuższa stabilizacja. Wcześniejsze rozpoczęcie doświadczenia może dawać, w tym przypadku zafałszowane wyniki. Naczynia zachowywały funkcjonalność przez 6 godzin, co umożliwiło przeprowadzenie badań w czasie długotrwałej inkubacji. Przypuszczalnie, w 6 godzinie trwania doświadczenia, słabsza odpowiedź naczyń na działanie fenylefryny może być spowodowana działaniem NO, jak również wynikać z uszkodzenia komórek mięśni gładkich.

Otrzymane wyniki wskazują, że wybrane metabolity tryptofanu przyczyniają się do obniżenia napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych, co jest zależne zarówno od rodzaju użytego agonisty receptora naczyniowego jak i pochodzenia naczynia. Uzyskane wyniki wymagają dalszych wnikliwych badań, oceniających wpływ aktywnych naczyniowo metabolitów tryptofanu na naczynia tętnicze o różnej średnicy i pochodzeniu.

Kontrola napięcia naczyń krwionośnych jest kluczem do zachowania właściwej homeostazy naczyniowej. W niniejszej pracy pokazano, że metabolizm tryptofanu poprzez szlak kynureninowy oraz udział IDO1, indukowanej w komórkach śródbłonna tętnic może przyczyniać się do relaksacji naczyń krwionośnych i kontroli ciśnienia tętniczego krwi. Wzmoczona aktywacja szlaku kynureninowego została opisana w wielu badaniach [15, 17, 32, 57, 62, 68, 103, 121, 135, 141, 175, 183]. Bakteriemia oraz sepsa

stanowią poważny problemem zdrowotny, mogący prowadzić do licznych zgonów [119]. Związany z tym wzrost cytokin prozapalnych i cytotoksycznych, w tym IFN- $\gamma$ , prowadzi do niekontrolowanej produkcji cząsteczek efektorowych, takich jak reaktywne formy tlenu i azotu, które mogą przyczynić się do rozwoju stanów patologicznych [133]. Tlenek azotu jest jedną z takich cząsteczek efektorowych. Synteza dużych ilości NO, poprzez iNOS, jest zaangażowana w spadek ciśnienia, który towarzyszy posocznicy [44]. Powyższy stan patologiczny kontrastuje z prawidłową homeostazą naczyń, w której to małe ilości NO są wytwarzane przez śródbłonek [63]. IFN jak również LPS uczestniczą w indukcji iNOS w komórkach naczyń, co generuje nadmierne wytwarzanie NO i powoduje gwałtowne rozszerzenia naczyń z silnym niedociśnieniem [75]. Leczenie inhibitorami syntazy NO poprawia parametry hemodynamiczne, w badaniach prowadzonych na zwierzęcym modelu endotoksemii [99]. Myszy, pozbawione iNOS, są w znacznym stopniu, jednak nie całkowicie, chronione przed indukowanym przez LPS spadkiem ciśnienia [95]. Zwiększone wytwarzanie NO również wykazano w przypadku posocznicy u ludzi [112]. W tym przypadku, zahamowanie enzymu syntazy NO może również zapobiegać rozwojowi wstrząsu septycznego i czasowo poprawiać parametry hemodynamiczne, w tym wzrost średniego ciśnienia tętniczego [8]. Niestety, hamowanie syntazy NO nie poprawia 28 dniowej przeżywalności i nie przynosi długofalowych korzyści zdrowotnych [71]. Co więcej, w randomizowanych badaniach nad bezpieczeństwem zdrowotnym terapii inhibitorami syntazy NO, zauważono wzrost śmiertelności w grupie pacjentów we wstrząsie septycznym [85]. Terapia, ukierunkowana na cele inne niż iNOS, również nie doprowadziła do poprawy wyników leczenia [133]. Powyższe wnioski, wraz z badaniami prowadzonymi w przedstawionej rozprawie doktorskiej wskazują, że dodatkowe czynniki mogą być zaangażowane w regulację napięcia naczyniowego, np. podczas trwania ostrego stanu zapalnego. W tym względzie należy zauważyć, że metabolizm argininy do NO jest funkcjonalnie powiązany z opisaną w przedstawionej pracy przemianą tryptofanu wzdłuż szlaku kynureninowego, inicjowaną przez IDO1. Oba szlaki przemian, argininy oraz tryptofanu są zaangażowane w działanie przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, w neuropatologii oraz w regulacji immunologicznej organizmu [166]. Podobnie do iNOS, IDO1 nie ulega w normalnych warunkach ekspresji w komórkach i wymaga indukcji przez czynniki prozapalne, takie jak IFN lub TNF [60, 178]. Pomimo znacznego podobieństwa enzymów iNOS i IDO1, bezpośrednia rola regulacyjna metabolitów szlaku kynureninowego w odniesieniu do

naczyń nie jest znana. Znaczenie, podczas trwania ogólnoustrojowego stanu zapalnego, mają komórki śródbłonna naczyń, które są głównym miejscem aktywacji IDO1 w warunkach *in vivo* [9]. Dlatego też, w niektórych doświadczeniach prowadzonych w rozprawie doktorskiej, komórki śródbłonna usuwano mechanicznie. Ponadto, aktywność IDO1 w warunkach *in vitro* jest indukowana w różnym stopniu, w różnych komórkach [118, 139]. Z tego powodu, w przedstawionej pracy badano potencjalny wpływ metabolitów tryptofanu, na różne typy naczyń krwionośnych (przewodzące oraz oporowe), w warunkach podwyższonego napięcia ściany naczyń. Podsumowując, otrzymane wyniki dają nowy wgląd w kontrolę regulacji ciśnienia tętniczego. Przedstawiona praca wskazuje na potencjalnie nową strategię terapeutyczną w regulacji napięcia naczyniowego przy nadciśnieniu, poprzez ingerencję w aktywność tkankowej IDO1, bądź stężenie zarówno tryptofanu jak i niektórych kynurenin. Wydaje się, że metabolizm tryptofanu poprzez szlak kynureninowy może mieć kluczowe znaczenie w ogólnoustrojowym zapaleniu, szczególnie w warunkach, w których aktywność biologiczna NO jest upośledzona. Jest wielce prawdopodobne, iż inhibitory IDO1 oraz analogi kynurenin mogą w przyszłości stanowić potencjalnie nowy cel badań.

Pomimo coraz większych zasobów wiedzy o regulacji pracy naczyń, dalsze badania w tej dziedzinie są konieczne. Wyjaśnienie wszystkich mechanizmów wpływu elementów szlaku kynureninowego na funkcję i pracę naczyń, z pewnością, przyczyni się do lepszego poznania roli, jaką pełni szlak kynureninowy poza OUN, zwłaszcza w terapii chorób układu naczyniowego.

## 6. WNIOSKI

1. Metabolity tryptofanu szlaku kynureninowego w zastosowanym przedziale stężeń, nie wywierają istotnego wpływu na napięcie spoczynkowe mięśni gładkich naczyń przy zachowanym śródbłonku, jak również w przypadku kiedy śródbłonek usunięto mechanicznie.
2. L-kynurenina rozkurcza mięśnie gładkie naczyń, poddane działaniu wyłącznie roztworu fenylefryny oraz KCl. Efekt ten uwidacznia się silniej w przypadku odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej. L-kynurenina nie wpływa istotnie na rozkurcz naczyń poddanych działaniu serotoniny.
3. Kwas pikolinowy rozkurcza mięśnie gładkie naczyń poddane wcześniejszemu działaniu serotoniny. Efekt ten uwidacznia się silniej w przypadku odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej. Ponadto, kwas pikolinowy wyłącznie w wysokich stężeniach powoduje rozszerzenie naczyń poddanych działaniu fenylefryny oraz KCl, niezależnie od obecności sprawnego śródbłonka.
4. Kwas ksanturenowy oraz kwas 3-hydroksyantranilowy rozkurczają izolowane naczynia tętnicze szczura poddane działaniu wyłącznie serotoniny. Opisane działanie kwasu ksanturenowego koresponduje ze stężeniem fizjologicznym. Efekt działania uwidacznia się silniej w przypadku odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej. Pozostałe związki nie są aktywne naczyniowo.
5. Zaobserwowano znaczące różnice w zachowaniu poszczególnych pierścieni naczyń na działanie substancji referencyjnych, jak i analizowanych związków. Pierścienie aorty oraz tętnicy płucnej są bardziej wrażliwe na działanie fenylefryny w porównaniu do odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej. Z kolei wrażliwość odcinków II rzędu tętnicy kręzkowej górnej na działanie serotoniny jest 10 razy wyższa, w porównaniu do aorty i tętnicy płucnej. Nie zaobserwowano różnic we wrażliwości analizowanych naczyń tętniczych z poszczególnych grup na działanie  $K^+$ . Odcinki II rzędu tętnicy kręzkowej są bardziej wrażliwe na działanie analizowanych kynurenin.

6. Aktywacja farmakologiczna receptorów alfa 1 adrenergicznych wywiera różny wpływ na kurczliwość mięśni gładkich naczyń tętniczych. W przypadku aorty (część zstępująca), tętnicy płucnej oraz odcinków tętnicy kręzkowej doświadczenie można rozpocząć po ustabilizowaniu naczynia po 60 minutach. Natomiast w przypadku aorty wstępującej potrzebna jest dłuższa stabilizacja. Wcześniejsze rozpoczęcie doświadczenia może dawać, w tym przypadku, zafałszowane wyniki.  
Naczynia zachowują funkcjonalność w obu przypadkach przez 6 godzin, co umożliwia przeprowadzenie badania w czasie długotrwałej inkubacji.



## 7. TABELE

Tabela 1. Podział receptorów 5-HT z uwzględnieniem wpływu na naczynia [4, 28, 43, 74, 87, 90, 92, 155, 169, 173].

Receptor	5-HT <sub>2A</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	5-HT <sub>1B</sub>	5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>1D</sub>
Białko regulatorowe	Gq/G11	Gq/G11	Gi/Go	Gs	Gs	Gi/Go	Gi/Go
Rodzaj aktywacji	kanały Ca <sup>2+</sup> typu L, kinazy tyrozynowe (PLC γ), K <sub>v</sub> (-)	PLC beta PI(4,5)P2	(-) cyklaza adenylationowa PKA	(+) cyklaza adenylationowa	(+) cyklaza adenylationowa	(-) cyklaza adenylationowa	(-) cyklaza adenylationowa
Wtórny przekaźnik	IP3 (Ca <sup>2+</sup> ) DAG (PKC)(+)	IP3 (Ca <sup>2+</sup> ) DAG (PKC)(+)	Spadek cAMP	Wzrost cAMP	Wzrost cAMP (ś)	Spadek cAMP (ś) [Ca <sup>2+</sup> ] (m)	Spadek cAMP (ś) (OUN)
NO	iNOS(-)		(ś) eNOS(+)				
Aorta	+ Silny skurez (m) K <sub>v</sub> 1.2; K <sub>v</sub> 1.5 Kinazy tyrozynowe c-Src	+ Rozkurcz naczyń (ś)	+ Skurez (m) i rozkurcz naczyń (ś)	Rozkurcz naczyń (m)	(ś)	(ns)	(ns)
Tętnica płucna	+ Silny skurez (m) K <sub>v</sub> 1.5	+ Rozkurcz naczyń (ś)	+ Skurez (m) i rozkurcz naczyń (ś)	Rozkurcz naczyń (m)	(ś)	(ns)	(ns)
Tętnica krezkowa II rzędu	+ K <sub>v</sub> 1.2; K <sub>v</sub> 1.5	+ Skurez naczyń (m)	(?)	(?)	(?)	(?)	(?)

(m) – mięśnie gładkie naczyń, (ś) – śródbłonek, (?) – brak danych, (+) – aktywacja, (-) – hamowanie, (ns) – nie stwierdzono obecności

Tabela 2. Kompozycja podjednostek i funkcja różnych typów kanałów  $Ca^{2+}$  sterowanych potencjałem [21].

	Podjednostka alfa 1	Związek blokujący	Główna funkcja fizjologiczna
L	Ca <sub>v</sub> 1.1	Po pochodne dihydropirydyny	Wzbudzenie oraz skurcz w obrębie mięśni szkieletowych, regulacja procesów transkrypcji
	Ca <sub>v</sub> 1.2		Wzbudzenie oraz skurcz w obrębie m. sercowego i mięśni gładkich, wydzielanie hormonalne, przewodnictwo $Ca^{2+}$ w układzie nerwowym (w komórkach i dendrytach), regulacja aktywności enzymatycznej, regulacja procesów transkrypcji
	Ca <sub>v</sub> 1.3		Wydzielania hormonalne, przewodnictwo sercowe, przewodnictwo nerwowe, prawidłowe słyszenie
	Ca <sub>v</sub> 1.4		Wpływ na widzenie
N	Ca <sub>v</sub> 2.1	konotoksyna (ślimak <i>Conus geographus</i> )	Uwalnianie neuroprzebieżników, Przewodnictwo $Ca^{2+}$ w dendrytach
	Ca <sub>v</sub> 2.2	Agatoksyna (pająk <i>Agelenopsis aperta</i> )	Uwalnianie neuroprzebieżników, Przewodnictwo $Ca^{2+}$ w dendrytach
R	Ca <sub>v</sub> 2.3	syntetyczna wersja toksyny ptasznika ( <i>Hysteroocrates gigas</i> )	Uwalnianie neuroprzebieżników, Przewodnictwo $Ca^{2+}$ w dendrytach
T	Ca <sub>v</sub> 3.1-3	brak	Odpowiedzialny za napady nieświadomości

Tabela 3. Lokalizacja i typy kanałów potasowych obecnych w naczyniach krwionośnych [10, 40, 48, 109, 152].

	$K_v$		$(K_{Ca})$		$K_{ATP}$		$K_{IR}$	
	Bramkowane potencjałem		Aktywowane jonami wapnia		Wrażliwe na ATP		Wewnątrzprzostonnicze kanały potasowe	
Lokalizacja	mięśnie gładkie naczyń łożyska wieńcowego, nerkowego, tętnicy płucnej królika i psa, w tętnicy mózgowej szeszura, w ludzkiej tętnicy krezkowej		mięśnie gładkie dużych naczyń krwionośnych, mięsień sercowy, komórki śródbłonka, gruczoły ślinowe, łożysko i płuca		komórki beta trzustki, mięsień sercowy, mięśnie gładkie naczyń, mięśnie szkieletowe, OUN i nerki		w miocytach naczyń, komórki śródbłonka kardiomiocyty, neurony, trzustka, nerki	
Czynniki pobudzające kanał	depolaryzacja, kinaza białkowa A, spadek pH		wzrost $[Ca^{2+}]_{wev}$		spadek ATP, wzrost ADP, kinaza białkowa A, kinaza białkowa G, diazoksyd, pinacidil		hiperpolaryzacja, wzrost $[K^+]_{zew}$ , PI(4,5)P2, NO	
Fizjologiczne czynniki hamujące aktywność kanału	hiperpolaryzacja, kinaza białkowa C, wzrost $[Ca^{2+}]_{wev}$ , kinaza Rho		spadek $[Ca^{2+}]_{wev}$		wzrost ATP, spadek ADP, kinaza białkowa C, wzrost $[Ca^{2+}]_{wev}$		depolaryzacja, spadek $[K^+]_{zew}$	
Syntetyczne blokery BKCa	4-aminopirydyna, korreolid, agitoksyna 2		iberiotoksyna, charybdotoksyna, penitrem A, paksylina, tetraetyloamonium		glibenklamid		BaCl <sub>2</sub>	

Tabela 4. Skład modyfikowanego buforu Krebsa-Henseleita (stężenie w mM).

NaCl	118,4
KCl	4,7
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
MgSO <sub>4</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
CaCl <sub>2</sub>	2,5
Glukoza	11,1
CaNa <sub>2</sub> EDTA	0,026

Tabela 5. Skład 60 mM roztworu KCl (stężenie w mM).

NaCl	63,1
KCl	60,0
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
MgSO <sub>4</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
CaCl <sub>2</sub>	2,5
Glukoza	11,1
CaNa <sub>2</sub> EDTA	0,026

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne analizowanych związków [56, 58, 89, 115, 121, 125, 176].

Substancja badana	Trp	L-kyn	KYNA	3-OH-L-KYN	3-OH-AA	AA	XA	QUIN	2-PA	NA
Masa cząsteczkowa [g/mol]	204,23	208,21	189,17	224,21	153,13	137,14	205,17	167,12	123,11	123,11
Rozpuszczalność 25 °C [g/mL]	0,0114	0,05	0,001418	0,00333	0,0105	0,00572	0,020517	11,0	0,887 [45]	0,015
Rozpuszczalnik	woda	DMSO woda	DMSO	woda	woda	etanol woda	DMSO	DMSO	woda	woda
Toksyczność	---	---	---	N R 1 μM	N	---	---	N R	---	---
Stężenie fizjologiczne (krew; μM)	58,13 [103, 113]	1,52 [25, 113, 122]	0,025 [39, 45, 55, 122]	0,050 [122]	0,013 [123]	0,030 [122]	0,7 [97]	0,15 [122, 146]	0,3 [146]	3,0 [127]
Zakres użytych stężeń	10 nM–100 μM	10 nM–500 μM	10 nM–100 μM	1 nM–10 μM	1 nM–32 μM	1 nM–10 μM	1 nM–10 μM	10 nM–100 μM	10 nM–100 μM	10 nM–100 μM

N – neurotoksyczny, R – wolne rodniki



Tabela 8. Wpływ rozkurczającego działania badanych związków na naczynia tętnicze szczura, w których usunięto komórki śródbłonnka.

Rodzaj naczynia		pIC <sub>50</sub> (-logIC <sub>50</sub> )										
Śródbłonek usunięty (-)		Agonista (pEC <sub>50</sub> )	Trp	L-kyn	KYNA	3-OH-L-KYN	3-OH-AA	AA	XA	QUIN	2-PA	NA
Aorta wstępująca	Fenylefryna	7,24 ± 0,12	-	3,79 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	3,17 ± 0,02	-
	5-HT	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
	KCl	1,37 ± 0,04	-	3,62 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	3,08 ± 0,01	-
Aorta zstępująca	Fenylefryna	7,38 ± 0,09	-	3,85 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	3,07 ± 0,03	-
	5-HT	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
	KCl	1,37 ± 0,05	-	3,67 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	3,17 ± 0,02	-
Tętnica płucna	Fenylefryna	7,37 ± 0,08	-	3,95 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	2,94 ± 0,04	-
	5-HT	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
	KCl	1,42 ± 0,06	-	3,64 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	3,29 ± 0,02	-
Tętnica krezkowa	Fenylefryna	6,01 ± 0,05	-	4,88 ± 0,06**	-	-	-	-	-	-	2,88 ± 0,02	-
	5-HT	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
	KCl	1,45 ± 0,09	-	4,72 ± 0,05**	-	-	-	-	-	-	3,01 ± 0,03	-

(-) – brak efektu, no – nie określono wpływu

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 5-6 zwierząt w grupie. Różnica statystycznie znamienne w grupie badanych związków (test t-Studenta):

\*\*p < 0,001

## 8. PIŚMIENICTWO

1. Adegunloye B., Sofola O.: Rat aorta and mesenteric artery respond differently to serotonin. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1997; 8: 255-267.
2. Aguilar F., Crebelli R., Dusemund B. i wsp.: Scientific Opinion on the evaluation of the safety in use of Yohimbe. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy; *EFSA Journal* 2013;11: 3302 [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)
3. Aitken J.B., Austin C.J.D., Hunt N.H., Ball H.J., Lay P.A.: The Fe-heme structure of metindoleamine 2,3-dioxygenase-2 determined by X-ray absorption fine structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450: 25-29.
4. Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A.: *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 5th Edition. *Br J Pharmacol.* 2011; 164: 1-324.
5. Amaral M., Levy C., Heyes D.J. i wsp.: Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition. *Nature.* 2013; 496: 382-385.
6. Amori L., Guidetti P., Pellicciari R., Kajii Y., Schwarcz R.: On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *J Neurochem.* 2009; 109: 316-325.
7. Bae Y.M., Kim A., Kim J. i wsp.: Serotonin depolarizes the membrane potential in rat mesenteric artery myocytes by decreasing voltage-gated K<sup>+</sup> currents. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 347: 468-476.
8. Bakker J., Grover R., McLuckie A. i wsp.: Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med.* 2004; 32: 1-12.
9. Ball H.J., McParland B., Driussi C., Hunt N.H.: Isolating vessels from the mouse brain for gene expression analysis using laser capture microdissection. *Brain Res Protoc.* 2002; 9: 206-213.



10. Baran H., Cairns N., Lubec B., Lubec G.: Increased kynurenic acid levels and decreased brain kynurenine aminotransferase in patients with Down syndrome. *Life Sci.* 1996; 58: 1891-1899.
11. Baranowska M., Kozłowska H., Korbut A., Malinowska B.: Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007; 61: 596-605.
12. Behan W.M.H., Stone T.W.: Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 1435-1442.
13. Bellocchi D., Macchiarulo A., Carotti A., Pellicciari R.: Quantum mechanics /molecular mechanics (QM/MM) modeling of the irreversible transamination of L-kynurenine to kynurenic acid: the round dance of kynurenine aminotransferase II. *Biochim Biophys Acta* 2009; 12: 1802-1812.
14. Bers D.M.: Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002; 415: 198-205.
15. Braidy N., Guillemin G.J., Mansour H., Chan-Ling T., Grant R.: Changes in kynurenine pathway metabolism in the brain, liver and kidney of aged female Wistar rats. *FEBS J.* 2011; 278: 4425-4434.
16. Breton J., Avanzi N., Magagnin S. i wsp.: Functional characterization and mechanism of action of recombinant human kynurenine 3-hydroxylase. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 1092-1099.
17. Buczek P., Cylwik D., Stokowska W.: Metabolism of tryptophan via the kynurenine pathway in saliva. *Postepy Hig Med Dosw.* 2005; 59: 283-289.
18. Cacanyiova S., Dovinova I., Kristek F.: The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64: 241-247.
19. Calderone V., Trabucco M., Menin V., Negro A., Zanotti G.: Cloning of human 3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase in *Escherichia coli*: characterisation of the purified enzyme and its in vitro inhibition by Zn<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1596: 283-292.
20. Campbell B.M., Charych E., Lee A.W., Möller T.: Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci.* 2014; 6: 8-12.
21. Catterall W.A.: Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3:a003947

22. Catterall W.A.: Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16: 521-555.
23. Changsirivathanathamrong D., Wang Y., Rajbhandari D. i wsp.: Tryptophan metabolism to kynurenine is a potential novel contributor to hypotension in human sepsis. *Crit Care Med.* 2011; 39: 2678-2683.
24. Chauvel V., Schoenen J., Multon S.: Influence of ovarian hormones on cortical spreading depression and its suppression by L-kynurenine in rat. 2013; 8: e82279. doi: 10.1371/journal.pone.0082279.
25. Chiarugi A., Carpenedo R., Moroni F.: Kynurenine disposition in blood and brain of mice: effects of selective inhibitors of kynurenine hydroxylase and of kynureninase. *J Neurochem.* 1996; 67: 692-698.
26. Chou Y., Lin C., Wang S. i wsp.: Aggression in bipolar II disorder and its relation to the serotonin transporter. *J Affect Disord.* 2013; 147: 59-63.
27. Ciorba M.A.: Kynurenine pathway metabolites: relevant to vitamin B-6 deficiency and beyond. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98: 863-864.
28. Cogolludo A., Moreno L., Lodi F. i wsp.: Serotonin inhibits voltage-gated K<sub>p</sub> currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors, caveolin-1, and Kv1.5 channel internalization. *Circ Res.* 2006; 98: 931–938.
29. Colín-González A.L., Luna-López A., Königsberg M., Ali S.F., Pedraza-Chaverri J., Santamaría A.: Early modulation of the transcription factor Nrf2 in rodent striatal slices by quinolinic acid, a toxic metabolite of the kynurenine pathway. *Neuroscience.* 2014; 260: 130-139.
30. Connor T.J., Starr N., O’Sullivan J.B., Harkin A.: Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-. *Neurosci Lett.* 2008; 441: 29-34.
31. Crozier-Reabe K.R., Phillips R.S., Moran G.R.: Kynurenine 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens*: substrate-like inhibitors both stimulate flavin reduction and stabilize the flavin-peroxo intermediate yet result in the production of hydrogen peroxide. *Biochemistry.* 2008; 47: 12420-12433.

32. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W.: From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9: 46-56.
33. Dawson P., Opacka-Juffry J., Moffatt J.D., Daniju Y., Dutta N., Ramsey J., Davidson C.: The effects of benzofury (5-APB) on the dopamine transporter and 5-HT<sub>2</sub>-dependent vasoconstriction in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 48: 57-63.
34. Dobrovolsky V.N., Bowyer J.F., Pabarcus M.K. i wsp.: Effect of arylformamidase (kynurenine formamidase) gene inactivation in mice on enzymatic activity, kynurenine pathway metabolites and phenotype. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1724: 163-172.
35. El-Sewedy S.M., Abdel-Tawab G.A., El-Zoghby S.M., Zeitoun R., Mostafa M.H.: Studies with tryptophan metabolites in vitro. Effect of zinc, manganese, copper and cobalt ions on kynurenine hydrolase and kynurenine aminotransferase in normal mouse liver. *Biochem Pharmacol.* 1974; 23: 2557-2565.
36. Esposito E., Cuzzocrea S.: Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8: 228–242.
37. Foster A.C., Zinkand W.C., Schwarcz R.: Quinolinic acid phosphoribosyltransferase in rat brain. *J Neurochem.* 1985; 44: 446-454.
38. Frieden E., Westmark G.W., Schor J.M.: Inhibition of tryptophan pyrrolase by serotonin, epinephrine and tryptophan analogs. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 92: 176-182.
39. Fukushima T., Mitsuhashi S., Tomiya M., Iyo M., Hashimoto K., Toyo'oka T.: Determination of kynurenic acid in human serum and its correlation with the concentration of certain amino acids. *Clin Chim Acta.* 2007; 377: 174-178.
40. Fürst O., Mondou B., D'Avanzo N.: Phosphoinositide regulation of inward rectifier potassium (Kir) channels. *Front Physiol.* 2014; 4: 404.
41. Gamoh S., Hisa H., Yamamoto R.: 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36: 1410-1415.
42. Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q.V., Bennett S.C., Muchowski P. J.: A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a

- therapeutic target for Huntington's disease. *Nature Genetics*. 2005; 37: 526-531.
43. Glusa E., Pertz H.H.: Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors. *Br J Pharmacol*. 2000; 130: 692-698.
  44. Gómez-Jiménez J., Salgado A., Mourelle M. i wsp.: L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med*. 1995; 23: 253-258.
  45. Grant R.S., Coggan S.E., Smythe G.A.: The Physiological Action of Picolinic Acid in the Human Brain. *Int J Tryptophan Res*. 2009; 2: 71-79.
  46. Grimaldi B.L.: The central role of magnesium deficiency in Tourette's syndrome: causal relationships between magnesium deficiency, altered biochemical pathways and symptoms relating to Tourette's syndrome and several reported comorbid conditions. *Med Hypotheses*. 2002; 58: 47-60.
  47. Guan Y., Chen R., Wang P., Qin Y., Su D., Miao C.: Hypertonic and isotonic potassium solutions have different effects on vessel contractility resulting in differences in optimal resting tension in rat aorta. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28: 643-650.
  48. Guéguinou M., Chantôme A., Fromont G., Bougnoux P., Vandier C., Potier-Cartereau M.: KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1843: 2322-2333.
  49. Guidetti P., Luthi-Carter R.E., Augood S.J., Schwarcz R.: Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 2004; 17: 455-461.
  50. Guo S., Vecsei L., Ashina M.: The L-kynurenine signalling pathway in trigeminal pain processing: a potential therapeutic target in migraine? *Cephalalgia*. 2011; 31: 1029-1038.
  51. Han Q., Beerntsen B.T., Li J.: The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *J Insect Physiol*. 2007; 53: 254-263.
  52. Han Q., Li J., Li J.: pH dependence, substrate specificity and inhibition of human kynurenine aminotransferase I. *Eur J Biochem*. 2004; 271: 4804-4814.

53. Hansen A.M., Ball H.J., Mitchell A.J. i wsp.: Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 1309-1319.
54. Hardeland R., Cardinali D.P., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R.: Melatonin and brain inflammaging. *Prog Neurobiol.* 2015 doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.02.001
55. Hartai Z., Juhasz A., Rimanoczy A. i wsp: Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2007; 50: 308-313.
56. Herve' C., Beyne P., Jamault H., Delacoux E.: Determination of tryptophan and its kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and fluorimetric detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 675:157-161.
57. Heyes M.P., Saito K., Crowley J.S. i wsp.: Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992; 115: 1249-1273.
58. Heyes M.P., Saito K., Devinsky O., Nadi N.S.: Kynurenine pathway metabolites in cerebrospinal fluid and serum in complex partial seizures. *Epilepsia* 1994; 35: 251-257.
59. Hopfner R.L., Hasnadka R.V., Wilson T.W., McNeill J.R., Gopalakrishnan V.: Insulin increases endothelin-1-evoked intracellular free calcium responses by increased ET(A) receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. *Diabetes.* 1998; 47: 937-944.
60. Hu B., Hissong B.D., Carlin J.M.: Interleukin-1 enhances indoleamine 2,3-dioxygenase activity by increasing specific mRNA expression in human mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 1995; 15: 617-624.
61. Hussain A.M., Mitra A.D.: Effect of ageing on tryptophan hydroxylase in rat brain: Implications on serotonin level. *Drug Metab Dispo.* 2000; 28: 1038-1042.
62. Huttunen R., Aittoniemi J.: New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. *J Infect.* 2011; 63: 407-419.
63. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C.: Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 34: 879-886.

64. Ikeda M., Tsuji S., Nakamura S., Ichiyama A., Nishizuka Y., Hayaishi O.: Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J Biol Chem.* 1965; 240: 1395-1401.
65. Ishidoh K., Kamemura N., Imagawa T., Oda M., Sakurai J., Katunuma N.: Quinolinate phosphoribosyl transferase, a key enzyme in de novo NAD(+) synthesis, suppresses spontaneous cell death by inhibiting overproduction of active-caspase-3. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803: 527-533.
66. Iwai K., Taguchi H.: Crystallization and properties of quinolinate phosphoribosyltransferase from hog liver. *Methods Enzymol.* 1980; 66: 96-101.
67. Jadhav A., Liang W., Balsevich J. i wsp.: L-Tryptophan ethyl ester dilates small mesenteric arteries by inhibition of voltage-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2012; 166: 232-242.
68. Jung I.D., Lee M.G., Chang J.H. i wsp.: Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *J Immunol.* 2009; 182: 3146-3154.
69. Kalil R.S., Wang J.H., de Boer I.H. i wsp.: Effect of extended-release niacin on cardiovascular events and kidney function in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. *Kidney Int.* 2015 doi: 10.1038/ki.2014.383
70. Kaumann A.J., Levy F.O.: 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2006; 111: 674-706.
71. Kirkebøen K.A., Strand O.A.: The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999; 43: 275-288.
72. Kocki T., Luchowski P., Luchowska E. i wsp.: L-Cysteine sulphinate, endogenous sulphur-containing amino acid, inhibits rat brain kynurenic acid production via selective interference with kynurenine aminotransferase II. *Neurosci Lett.* 2003; 346: 97-100.
73. Kovács A., Hársing L.G. Jr, Szénási G.: Vasoconstrictor 5-HT receptors in the smooth muscle of the rat middle cerebral artery. *Eur J Pharmacol.* 2012; 689: 160-164.

74. Kozhevnikova L.M., Moskovtsev A.A., Mesitov M.V.: The Effects of Inhibitors of Rho- and tyrosine c-Src-kinases on serotonin-induced constrictions of the aorta and mesenteric artery in rats. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2014; 5: 500-509.
75. Kröncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V.: Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113: 147-156.
76. Kubicova L., Hadacek F., Chobot V.: Quinolinic acid: neurotoxin or oxidative stress modulator? *Int J Mol Sci.* 2013; 25: 21328-21338.
77. Lancellotti S., Novarese L., De Cristofaro R.: Biochemical properties of indoleamine 2,3-dioxygenase: from structure to optimized design of inhibitors. *Curr Med Chem.* 2011; 15: 2205-2214.
78. Lapin I.P.: Depressor effect of kynurenine and its metabolites in rats. *Life Sci.* 1976; 19: 1479-1483.
79. Lapin I.P., Umanskaia L.G.: Effect of kynurenine and its metabolites on the vascular effects of serotonin, noradrenaline, and acetylcholine. *Biull Eksp Biol Med.* 1980; 89: 704-706.
80. Leklem J.E., Brown R.R., Rose D.P., Linkswiler H., Arend R.A.: Metabolism of tryptophan and niacin in oral contraceptives users receiving controlled intakes of vitamin B6. *Am J Clin Nutr.* 1975; 28: 146-156.
81. Limmroth V., May A., Auerbach P., Wosnitza G., Eppe T., Diener H.C.: Changes in cerebral blood flow velocity after treatment with sumatriptan or placebo and implications for the pathophysiology of migraine. *J Neurol Sci.* 1996; 138: 60-65.
82. Li X., Guo M., Fan J. i wsp.: Crystal structure of 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*: a special subgroup of the type III extradiol dioxygenases. *Protein Sci.* 2006; 15: 761-773.
83. Liu H., Woznica K., Catton G., Crawford A., Botting N., Naismith J.H.: Structural and kinetic characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (hQPRTase) from *Homo sapiens*. *J Mol Biol.* 2007; 373: 755-763.
84. Logters T.T., Laryea M.D., Altricher J. i wsp.: Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. *Shock.* 2009; 32: 29-34.

85. López A., Lorente J.A., Steingrub J. i wsp.: Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004; 32: 21-30.
86. Low A.M., Loke J.C.P., Kwan C.Y., Daniel E.E.: Sensitivity to protein kinase C inhibitors of nicardipine-insensitive component of high K<sup>+</sup> contracture in rat and guinea-pig aorta. *Br J Pharmacol.* 1994; 112: 604-610.
87. Lu R., Alioua A., Kumar Y. i wsp.: c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Physiol.* 2008; 586: 3855-3869.
88. Lugo-Huitrón R., Blanco-Ayala T., Ugalde-Muñiz P. i wsp.: On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33: 538-547.
89. Lugo-Huitrón R., Muñiz P.U., Pineda B., Pedraza-Chaverrí J., Ríos C., Pérez-de la Cruz V.: Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2013, doi: 10.1155/2013/104024.
90. MaassenVan Den Brink A., Centurión D., Villalón C.M.: Crosstalk of vascular 5-HT<sub>1</sub> receptors with other receptors: clinical implications. *Neuropharmacology.* 2008; 55: 986-993.
91. Macchiarulo A., Camaioni E., Nuti R., Pellicciari R.: Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. *Amino Acids.* 2009; 37: 219-229.
92. Machida T., Iizuka K., Hirafuji M.: 5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36: 1416-1419.
93. Machu T.K.: Therapeutics of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists: current uses and future directions. *Pharmacol Ther.* 2011; 130: 338-347.
94. MacKenzie C.R., Heseler K., Müller A., Däubener W.: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab.* 2007; 8: 237-244.
95. MacMicking J.D., Nathan C., Hom G. i wsp.: Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 1995; 81: 641-650.



96. Maes M., Leonard B.E., Myint A.M. i wsp.: The new 5-HT hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35: 702-721.
97. Malina H.Z., Richter C., Mehl M., Hess O.M.: Pathological apoptosis by xanthurenic acid, a tryptophan metabolite: activation of cell caspases but not cytoskeleton breakdown. *BMC Physiology*. 2001; 1:7 doi:10.1186/1472-6793-1-7
98. Martonosi A.N., Pikula S.: The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol*. 2003; 50: 1-30.
99. Meyer J., Traber L.D., Nelson S. i wsp.: Reversal of hyperdynamic response to continuous endotoxin administration by inhibition of NO synthesis. *J Appl Physiol*. 1992; 73: 324-328.
100. Mayo J.C., Sainz R.M., Tan D.X. i wsp.: Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*. 2005; 165: 139-149.
101. Menge U.: Formamidase—microheterogeneity, catalytic properties and inhibitors. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 1979; 360: 185–196.
102. Metz R., Duhadaway J.B., Kamasani U. i wsp.: Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Research*. 2007; 67: 7082-7087.
103. Midttun O., Ulvik A., Ringdal P.E. i wsp.: Low plasma vitamin B-6 status affects metabolism through the kynurenine pathway in cardiovascular patients with systemic inflammation. *J Nutr*. 2011; 141: 611-617.
104. Mishra R.C., Tripathy S., Quest D. i wsp.: L-Serine lowers while glycine increases blood pressure in chronic L-NAME-treated and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2008; 26: 2339-2348.
105. Moriguchi M., Yamamoto T., Soda K.: Inactivation of kynureninase by L-alanine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971; 44: 1416-1419.

106. Moroni F., Cozzi A., Carpendo R. i wsp.: Kynurenine 3-mono-oxygenase inhibitors reduce glutamate concentration in the extracellular spaces of the basal ganglia but not in those of the cortex or hippocampus. *Neuropharmacology*. 2005; 48: 788-795.
107. Moroni F.: Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharmacol*. 1999; 375: 87-100.
108. Nakagawa Y., Ohzeki T.: Genetic regulation of the biosynthesis of steroid hormones. *Nihon Rinsho*. 2008; 66: 16-22.
109. Nelson M.T., Quayle J.M.: Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995; 268: 799-822.
110. Ni W., Geddes T.J., Priestley J.R., Szasz T., Kuhn D.M., Watts S.W.: The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br J Pharmacol*. 2008; 154: 663-674.
111. Nowak D., Kozłowska H., Żurada A., Gielecki J.: The development of the aorta in prenatal human life. *Pol Ann Med*. 2011; 18, 20-30.
112. Ochoa J.B., Udekwu A.O., Billiar T.R. i wsp.: Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg*. 1991; 214: 621-626.
113. Ohashi H., Iizuka H., Yoshihara S. i wsp.: Determination of l-tryptophan and L-kynurenine in human serum by using lc-ms after derivatization with (R)-DBD-PyNCS. *Int J Tryptophan Res*. 2013; 6: 9-14.
114. Okatani Y., Wakatsuki A., Watanabe K., Taniguchi K., Fukaya T.: Weak vasoconstrictor activity of melatonin in human umbilical artery: relation to nitric oxide-scavenging action. *Eur J Pharmacol*. 2001; 417: 125-129.
115. Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H.: 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem*. 1998; 70: 299-307.
116. Okuno E., White R.J., Schwarcz R.: Quinolinic acid phosphoribosyltransferase: purification and partial characterization from human liver and brain. *J Biochem*. 1988; 103: 1054-1059.
117. Opitz C.A., Litzenburger U.M., Sahn F. i wsp.: An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011; 478: 197-203.

118. Owe-Young R., Webster N.L., Mukhtar M. i wsp.: Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain-barrier cells: implications for immune tolerance and neurotoxicity. *J Neurochem.* 2008; 105: 1346-1357.
119. Padberg J.S., Van Meurs M., Kielstein J.T. i wsp.: Indoleamine-2,3-dioxygenase activity in experimental human endotoxemia. *Exp Transl Stroke Med.* 2012; 4: 24.
120. Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Srinivasan V. i wsp.: Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008; 85: 335-353.
121. Pawlak D., Tankiewicz A., Matys T., Buczek W.: Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. *J Physiol Pharmacol.* 2003; 54: 175-189.
122. Pawlak K., Myśliwiec M., Pawlak D.: Kynurenine pathway – a new link between endothelial dysfunction and carotid atherosclerosis in chronic kidney diseases patients. *Adv Med Sci.* 2010; 55: 196-203.
123. Pawlak K., Kowalewska A, Mysliwiec M, Pawlak D.: 3-hydroxyanthranilic acid is independently associated with monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) and macrophage inflammatory protein-1beta (CCL4) in patients with chronic kidney disease. *Clin Biochem.* 2010; 43: 1101-1106.
124. Peake J.M., Della Gatta P., Suzuki K., Nieman D.C.: Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev.* 2015; 21: 8-51.
125. Pearson S.J., Reynolds G.P.: Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett.* 1992; 144: 199-201.
126. Phillips R.S.: Structure and mechanism of kynureninase. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 544: 69-74.
127. Pfuhl P., Kärcher U., Häring N., Baumeister A., Tawab M.A., Schubert-Zsilavecz M.: Simultaneous determination of niacin, niacinamide and nicotinuric acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 36: 1045-1052.
128. Platten M., Wick W., Van den Eynde B.J.: Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Research.* 2012; 72: 5435-5440.

129. Pucci L., Perozzi S., Cimadamore F., Orsomando G., Raffaelli N.: Tissue expression and biochemical characterization of human 2-amino 3-carboxymuconate 6-semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in tryptophan catabolism. *The FEBS Journal*. 2007; 274: 827-840.
130. Ratz P.H., Berg K.M., Urban N.H., Miner A.S.: Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 288: 769-783.
131. Reyes Ocampo J., Lugo Huitrón R., González-Esquivel D. i wsp.: Kynurenines with neuroactive and redox properties: relevance to aging and brain diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 646909. doi: 10.1155/2014/646909.
132. Richard D.M., Dawes M.A., Mathias C.W., Acheson A., Hill-Kapturczak N., Dougherty D.M.: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res*. 2009; 23: 45-60.
133. Riedemann N.C., Guo R.F., Ward P.A.: Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Medicine*. 2003; 9: 517-523.
134. Rios-Avila L., Nijhout H.F., Reed M.C., Sitren H.S., Gregory J.F.: A mathematical model of tryptophan metabolism via the kynurenine pathway provides insights into the effects of vitamin B-6 deficiency, tryptophan loading, and induction of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan metabolites. *J Nutr*. 2013; 143: 1509-1519.
135. Ristagno G., Fries M., Brunelli L. i wsp.: Early kynurenine pathway activation following cardiac arrest in rats, pigs, and humans. *Resuscitation*. 2013; 81: 1604-1610.
136. Saad M.A., Eid N.I., Abd El-Latif H.A., Sayed H.M.: Potential effects of yohimbine and sildenafil on erectile dysfunction in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013; 700: 127-133.
137. Sahm F., Oezen I., Opitz C.A. i wsp.: The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD<sup>+</sup> Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. *Cancer Res*. 2013; 73: 3225-3234.
138. Sainio E., Sainio P.: Comparison of effects of nicotinic acid or tryptophan on tryptophan 2,3-dioxygenase in acute and chronic studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990; 102: 251-258.

139. Sakash J.B., Byrne G.I., Lichtman A., Libby P.: Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydomphila pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 2002; 70: 3959-3961.
140. Samadi P., Gregoire L., Rassoulpour A. i wsp.: Effect of kynurenine 3-hydroxylase inhibition on the dyskinetic and antiparkinsonian responses to levodopa in Parkinsonian monkeys. *Mov Disord.* 2005; 20: 792-802.
141. Savitz J., Drevets W.C., Smith C.M. i wsp.: Putative neuroprotective and neurotoxic kynurenine pathway metabolites are associated with hippocampal and amygdalar volumes in subjects with major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2015; 40: 463-471.
142. Schefold J.C., Zeden J.P., Pschowski R. i wsp.: Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42: 164-171.
143. Scherr M., Schwerthoeffer D., Froboese T., Castrop F., Bäuml J.: Psychiatric effects and side effects of the alpha-2-antagonist yohimbine: a review of literature and case report. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2009; 77: 585-590.
144. Serrano A.E. Jr., Nagayama F.: Inhibition studies of liver arylformamidases of rainbow trout and cattle. *Comp Biochem Physiol B.* 1991; 99: 281-285.
145. Shibata K., Iwai K.: Isolation and properties of crystalline quinolinate phosphoribosyltransferase from hog kidney. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 611: 280-288.
146. Smythe G.A., Poljak A., Bustamante S. i wsp.: ECNI GC-MS analysis of picolinic and quinolinic acids and their amides in human plasma, CSF, and brain tissue. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 527: 705-712.
147. Snoeren E.M.S., Veening J.G., Olivier B., Oosting R.S.: Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: A review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014; 121: 102-114.
148. Solís Herruzo J.A., Solís Muñoz P.: Melatonin and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101: 453-459.
149. Song H., Park H., Yeong-Seok K. i wsp.: L-Kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11: 932-938.

150. Sono M., Roach M.P., Coulter E.D., Dawson J.H.: Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev.* 1996; 96: 2841-2888.
151. Stachowski E.K., Schwarcz R.: Regulation of quinolinic acid neosynthesis in mouse, rat and human brain by iron and iron chelators in vitro. *J Neural Transm.* 2012; 119: 123-131.
152. Standen N.B., Quayle J.M.: K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand.* 1998; 164: 549-557.
153. Sucher R., Kurz K., Weiss G., Margreiter R., Fuchs D., Brandacher G.L.: IDO-mediated tryptophan degradation in the pathogenesis of malignant tumor disease. *Int J Tryptophan Res.* 2010; 3: 113-120.
154. Sulo G., Vollset SE, Nygård O.: Neopterin and kynurenine-tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *Int J Cardiol.* 2013; 168: 1435-1440
155. Sung D.J., Noh H.J., Kim J.G. i wsp.: Serotonin contracts the rat mesenteric artery by inhibiting 4-aminopyridine-sensitive Kv channels via the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and Src tyrosine kinase. *Exp Mol Med.* 2013; 45: e67. doi: 10.1038/emm.2013.116.
156. Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Phosphoinositide-specific phospholipase C in mammalian cells: structure, properties, and function. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008; 62: 47-54.
157. Takeuchi F., Tsubouchi R., Izuta S., Shibata Y.: Kynurenine metabolism and xanthurenic acid formation in vitamin B<sub>6</sub>-deficient rat after tryptophan injection. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1989; 35: 111-122.
158. Tam S.W., Worcel M., Wyllie M.: Yohimbine: a clinical review. *Pharmacol Ther* 2001; 91: 215-243.
159. Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R. i wsp.: Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003; 34: 75-78.
160. Tan P.H., Bharath A.K.: Manipulation of indoleamine 2,3 dioxygenase; a novel therapeutic target for treatment of diseases. *Expert Opin. Therapeutic Targets.* 2009; 13: 987-1012.
161. Tanaka M., Tokuyasu M., Matsui T., Matsumoto K.: Endothelium-independent vasodilation effect of di- and tri-peptides in thoracic aorta of Sprague–Dawley rats. *Life Sci.* 2008; 82: 869-875.

162. Terakata M., Fukuwatari T., Kadota E. i wsp.: The niacin required for optimum growth can be synthesized from L-tryptophan in growing mice lacking tryptophan-2,3-dioxygenase. *J Nutr.* 2013; 143: 1046-1051.
163. Tfelt-Hansen J., Brown E.M.: The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2005; 42: 35-70.
164. Thackray S.J., Mowat C.G., Chapman S.K.: Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36: 1120-1123.
165. Thakali K.M., Kharade S.V., Sonkusare S.K. i wsp.: Intracellular Ca<sup>2+</sup> silences L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mesenteric veins: mechanism of venous smooth muscle resistance to calcium channel blockers. *Circ Res.* 2010; 106: 739-747.
166. Thomas S.R., Stocker R.: Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep.* 1999; 4:199-220.
167. Ting K.K., Brew B.J., Guillemin G.J.: Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 2009; 36: 1-13.
168. Toda N.: Analysis of the effect of 5-hydroxykynurenamine, a serotonin metabolite, on isolated cerebral arteries, aortas and atria. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975; 193: 385-392.
169. Ullmer C., Schmuck K., Kalkman H.O., Lübbert H.: Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.* 1995; 370: 215-221.
170. Ulvik A., Theofylaktopoulou D., Midttun Ø., Nygård O., Eussen S., Ueland P.M.: Substrate product ratios of enzymes in the kynurenine pathway measured in plasma as indicators of functional vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98: 934-940.
171. van de Kamp J.L., Smolen A.: Response of kynurenine pathway enzymes to pregnancy and dietary level of vitamin B-6. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 51: 753-758.
172. van der Heyden M.A., Wijnhoven T.J., Opthof T.: Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 28-39.

173. Villazón M., Padín J.F., Cadavid M.I. i wsp.: Functional characterization of serotonin receptors in rat isolated aorta. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25: 584-90.
174. Von Bubnoff D., Scheler M., Wilms H., Fimmers R., Bieber T.: Identification of IDO-positive and IDO-negative human dendritic cells after activation by various proinflammatory stimuli. *J Immunol.* 2011; 186: 6701-6709.
175. Wang Y., Liu H., McKenzie G. i wsp.: Kynurenine is a novel endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med.* 2010; 16: 279-285.
176. Wang Z., Watanabe S., Kobayashi Y., Tanaka M., Matsui T.: Trp-His, a vasorelaxant di-peptide, can inhibit extracellular Ca<sup>2+</sup> entry to rat vascular smooth muscle cells through blockade of dihydropyridine-like L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Peptides* 2010; 31: 2060-2066.
177. White R.M., Rivera C.O., Davison C.B.: Differential contribution of endothelial function to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 1996; 27: 1245-1253.
178. Wichers M.C., Maes M.: The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004; 29: 11-17.
179. Wilson K., Mole D.J., Binnie M. i wsp.: Bacterial expression of human kynurenine 3-monooxygenase: Solubility, activity, purification. *Protein Expr Purif.* 2014; 95: 96-103.
180. Winstock A.R., Kaar S., Borschmann R.: Dimethyltryptamine (DMT): prevalence, user characteristics and abuse liability in a large global sample. *J Psychopharmacol.* 2014; 28: 49-54.
181. Yamazaki F., Kuroiwa T., Takikawa O., Kido R.: Human indoleamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem J.* 1985; 230: 635-638.
182. Yoshida R., Nukiwa T., Watanabe Y., Fujiwara M., Hirata F., Hayaishi O.: Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Archiv Biochem Biophys.* 1980; 203: 343-351.
183. Zeden J.P., Fusch G., Holtfreter B. i wsp.: Excessive tryptophan catabolism along the kynurenine pathway precedes ongoing sepsis in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care.* 2010; 38: 307-316.



184. Zuccarello M., Lee B., Rapoport R.M.: Hypocapnic constriction in rabbit basilar artery in vitro: triggering by serotonin and dependence on endothelin-1 and alkalosis. *Eur J Pharmacol.* 2000; 407: 191-195.

## WYKAZ TABEL

Tabela 1.	Podział receptorów 5-HT z uwzględnieniem wpływu na naczynia .....	89
Tabela 2.	Kompozycja podjednostek i funkcja różnych typów kanałów $Ca^{2+}$ sterowanych potencjałem .....	90
Tabela 3.	Lokalizacja i typy kanałów potasowych obecnych w naczyniach krwionośnych .....	91
Tabela 4.	Skład modyfikowanego buforu Krebsa-Henseleita (stężenie w mM) ...	92
Tabela 5.	Skład 60 mM roztworu KCl (stężenie w mM) .....	92
Tabela 6.	Właściwości fizykochemiczne analizowanych związków .....	93
Tabela 7.	Wpływ rozkurczającego działania badanych związków na naczynia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonka.....	94
Tabela 8.	Wpływ rozkurczającego działania badanych związków na naczynia tętnicze szczura, w których usunięto komórki śródbłonka.....	95

## WYKAZ RYCIN

Ryc. 1.	Metabolizm tryptofanu na drodze szlaku kynureninowego i serotoninowego.....	13
Ryc. 2.	Przemiana tryptofanu z rozerwaniem pierścienia indolowego poprzez nietrwały związek N-formyl-L-kynureninę (NFKYN) .....	15
Ryc. 3.	Przemiana N-formyl-L-kynureniny w L-kyn i mrówczan .....	17
Ryc. 4.	Przemiana L-kyn do 3-OH-L-KYN.....	18
Ryc. 5.	Hydroлиза L-kyn i 3-OH-KYN do AA i 3-OH-AA .....	19
Ryc. 6.	Przeniesienie grupy aminowej z L-kyn i 3-OH-L-KYN. Produktami reakcji są odpowiednio KYNA i XA .....	20
Ryc. 7.	Przemiana 3-OH-AA z udziałem 3-HAO do semialdehydu, a następnie nieenzymatyczna przemiana do QUIN .....	21
Ryc. 8.	Przemiana QUIN do mononukleotydu kwasu nikotynowego .....	23
Ryc. 9.	Mediatory stanu zapalnego stymulujące ekspresję enzymów szlaku kynureninowego .....	25
Ryc. 10.	Ilustracja przedstawiająca poszczególne odcinki aorty .....	26
Ryc. 11.	Komora inkubacyjna (Mayflower Tissue Bath of Hugo Sachs Elektronik, Germany) o objętości 5 ml do badania izolowanych naczyń .....	34
Ryc. 12.	Zestaw do badań izolowanych naczyń z mikroskopem użyty w pracy badawczej .....	34
Ryc. 13.	Efekt działania DMSO i etanolu na naczynia tętnicze szczura .....	42
Ryc. 14.	Efekt działania wzrastających stężeń fenylefryny na naczynia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonna .....	43
Ryc. 15.	Efekt działania fenylefryny na naczynia tętnicze szczura .....	44

Ryc. 16.	Efekt działania fenylefryny na aortę zstępującą, tętnicę płucną, tętnicę kręzkową (A) oraz na aortę wstępującą szczura (B) .....	45
Ryc. 17.	Efekt działania KCl (5-75 mM) na naczynia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonka .....	46
Ryc. 18.	Efekt działania KCl (60 mM) na naczynia tętnicze szczura .....	47
Ryc. 19.	Efekt działania 5-HT (10 $\mu$ M) na naczynia tętnicze szczura w obecności sprawnego śródbłonka .....	48
Ryc. 20.	Efekt działania Trp, L-kyn, KYNA, 3-OH-L-KYN, 3-OH-AA, AA, XA, QUIN, PA, NA oraz fenylefryny, KCl (60 mM) i 5-HT (10 $\mu$ M) na naczynia tętnicze szczura .....	50
Ryc. 21.	Efekt podania fenylefryny, L-kyn (300 $\mu$ M) oraz jednoczesnego podania L-kyn i fenylefryny na naczynia tętnicze szczura, w czasie trwania doświadczenia. Każde podanie poprzedzone jest płukaniem i stabilizacją naczynia .....	51
Ryc. 22.	Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) .....	52
Ryc. 23.	Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT) .....	53
Ryc. 24.	Efekt działania tryptofanu na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl) .....	53
Ryc. 25.	Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) TK i Az .....	54
Ryc. 26.	Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) TP i Aw .....	55
Ryc. 27.	Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (5-HT).....	56
Ryc. 28.	Efekt działania L-kyn na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl) .....	57
Ryc. 29.	Efekt działania KYNA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) .....	58
Ryc. 30.	Efekt działania KYNA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT) .....	59

Ryc. 31.	Efekt działania KYNA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl) .....	59
Ryc. 32.	Efekt działania 3-OH-L-KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) .....	60
Ryc. 33.	Efekt działania 3-OH-L-KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (5-HT).....	61
Ryc. 34.	Efekt działania 3-OH-L-KYN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl).....	61
Ryc. 35.	Efekt działania 3-OH-AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).....	62
Ryc. 36.	Efekt działania fenylefryny oraz 3-OH-AA (10 $\mu$ M) na naczynia tętnicze szczura w kolejnych minutach trwania doświadczenia.....	63
Ryc. 37.	Efekt działania 3-OH-AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT). .....	64
Ryc. 38.	Efekt działania 3-OH-AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl).....	64
Ryc. 39.	Efekt działania AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).....	66
Ryc. 40.	Efekt działania AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (5-HT).....	67
Ryc. 41.	Efekt działania AA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl) .....	67
Ryc. 42.	Efekt działania XA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) .....	68
Ryc. 43.	Efekt działania XA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT).....	69
Ryc. 44.	Efekt działania XA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl) .....	70
Ryc. 45.	Efekt działania QUIN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).....	71
Ryc. 46.	Efekt działania QUIN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT).....	72
Ryc. 47.	Efekt działania QUIN na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl).....	72

Ryc. 48.	Efekt działania PA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna) .....	73
Ryc. 49.	Efekt działania PA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT).....	74
Ryc. 50.	Efekt działania PA na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl) .....	75
Ryc. 51.	Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura (fenylefryna).....	76
Ryc. 52.	Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura (10 $\mu$ M 5-HT).....	77
Ryc. 53.	Efekt działania kwasu nikotynowego na obkurczone naczynia tętnicze szczura (60 mM KCl).....	77
Ryc. 54.	Skrawki histologiczne barwione H&E reprezentujące fragmenty aorty wstępującej (x20) w czasie „0”, w 3, 6 i 8 godzinie inkubacji (odcinki podłużne).....	78

## **ZAŁĄCZNIKI**

Zgoda właściwej komisji bioetycznej do badań na zwierzętach