

Anna Maria Gendźwiłł

**Reaktywne formy tlenu a hyporeaktywność
izolowanej aorty w obecności LPS.**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Jacek Petruszewicz

Wykonana

w Katedrze i Zakładzie Farmakologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2005

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	3
1.1 CHARAKTERYSTYKA WOLNYCH RODNIKÓW	5
1.1.1 Szlak metaboliczny tlenu	6
1.1.2 RFT w naczyniach; źródła i działanie	8
1.1.3 Rola RFT w sygnalizacji wapniowej	12
1.2 ANTYUTLENIACZE	13
1.2.1 enzymatyczne	13
1.2.2 nieenzymatyczne wymiatacze	15
1.3 ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU WE WSTRZĄSIE SEPTYCZNYM....	19
1.3.1 Zakażenie, zapalenie i niewydolność wielonarządowa a wstrząs	19
1.3.2 LPS - receptor lipopolisacharydowy – sygnalizacja (TLR4)	21
1.3.3 Reakcje śródbłonna na toksyny bakteryjne w posocznicy	26
1.3.4 Mechanizmy doprowadzające do hyporeaktywności naczyń	28
2. CEL PRACY	33
3. MATERIAŁ I METODA	34
4. WYNIKI	39
5. DYSKUSJA	49
6. WNIOSKI	63
7. STRESZCZENIE	64
8. SUMMARY	66
9. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	68
10. PIŚMIENNICTWO	70

1.WSTĘP

Ciężka posocznica jest drugą, co do częstości przyczyną zgonu pacjentów na oddziałach intensywnej terapii po incydentach sercowo-naczyniowych. Śmiertelność wśród pacjentów, u których rozwinął się zespół wielonarządowej niewydolności waha się od 30% do 70%. Kluczowe elementy ewolucji posocznicy obejmują uwalnianie prozapalnych cytokin, rozlany uraz wewnątrznaczyniowy i prokoagulacyjna odpowiedź gospodarza z następującą po niej dysfunkcją narządów.

W latach osiemdziesiątych i wczesnych dziewięćdziesiątych rosnące zrozumienie mechanizmów leżących u podłoża rozwoju posocznicy doprowadziło do testowania różnych leków, których celem było blokowanie poszczególnych etapów w jej patogenezie. Niestety wyniki około osiemdziesięciu badań klinicznych potencjalnych leków, kilka najbardziej obiecujących dotarło nawet do fazy trzeciej, nie przyniosły spodziewanych rezultatów [45].

Jedną z porażek była próba zmniejszenia tworzenia czynnika naczyniorozszerzającego, jakim jest tlenek azotu (NO), poprzez selektywne blokowanie indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS). Przesłanką do tego typu interwencji było stwierdzenie zwiększonej ekspresji iNOS, a co za tym idzie tworzenia NO, w wyniku kontaktu organizmu z endotoksyną bakteryjną [13]. Większość ze szkodliwych efektów uwalniania prozapalnych cytokin we wstrząsie septycznym zostało przypisanych ogromnym ilościom uwalnianego tlenu azotu, a precyzując nadtlenkowi azotu (nadtlenoazotyn) będącego produktem reakcji tlenu azotu (NO) i anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Niekorzystne działanie nadmiernych ilości NO uwidacznia się głównie podczas procesów patologicznych, którym towarzyszy również zwiększone generowanie reaktywnych form tlenu (RFT; *reactive oxygen species* = ROS). Kryteriom tym odpowiada wstrząs septyczny, więc pojawiła się koncepcja interwencji

w proces patologiczny poprzez zmniejszenie dostępności i/lub działania reaktywnych form tlenu [27].

Konsekwencją nabycia przez mikroorganizmy, drogą ewolucji, zdolności do oddychania tlenowego i co jest z tym nierozdzielnie związane tworzenia reaktywnych form tlenu stała się konieczność wykształcenia odpowiednich enzymów antyutleniających w celu zrównoważenia toksycznych efektów wywieranych przez powstające metabolity tlenowe. Niskie poziomy RFT są niezbędne dla prawidłowego przebiegu sygnalizacji międzykomórkowej oraz zapewniają prawidłowe funkcjonowanie komórek. W warunkach fizjologicznych zachowana zostaje równowaga pomiędzy poziomem RFT produkowanych podczas normalnego metabolizmu komórkowego a poziomem endogennych antyoksydantów, których zadaniem jest ochrona tkanek przed urazem oksydacyjnym. Zakłócenie tej równowagi zarówno przez zwiększoną produkcję RFT (np. we wstrząsie septycznym) jak również zmniejszony poziom antyoksydantów, powoduje wywołanie zjawiska określanego mianem stresu oksydacyjnego. Z kolei stres oksydacyjny, odgrywa znaczącą rolę w patogenezie szeregu poważnych schorzeń obejmujących między innymi: choroby układu sercowo-naczyniowego (miażdżyca, nadciśnienie, posocznica, cukrzyca, reperfuzja po niedokrwieniu), zaburzenia neurologiczne (funkcje poznawcze, niedokrwienie mózgu, uraz, rodzinna amyloidowa polineuropatia typu I), zapalne choroby stawów, choroby płuc i przyspieszone starzenie [9, 38].

1.1 Charakterystyka wolnych rodników

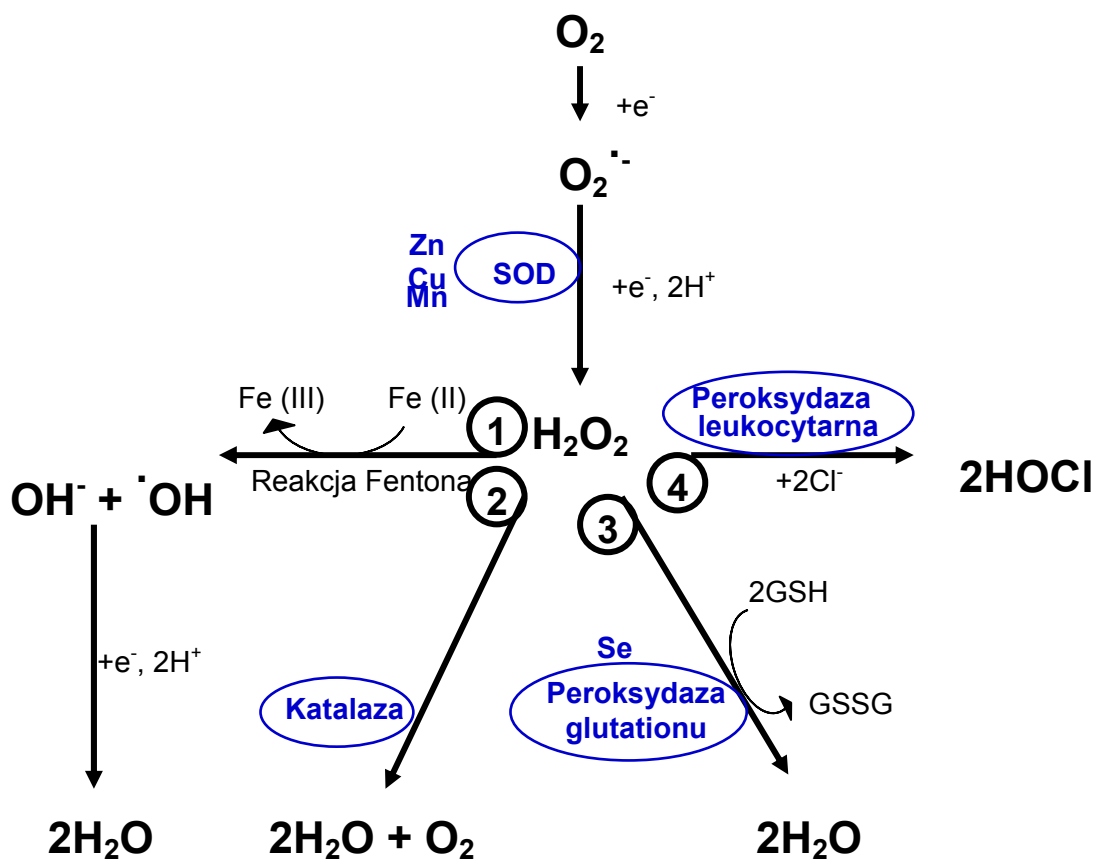
Atom lub cząsteczka mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznej powłoce jest nazywany wolnym rodnikiem. Określenie „wolny” oznacza, że atom lub cząsteczka są zdolne do samodzielnego istnienia [wg współczesnego mianownictwa wolne rodniki = reaktywne formy tlenu – *reactive oxygen species* – ROS; czasami używany bywa także termin „reaktywne formy azotu” – *reactive nitrogen species* – RNS- w odniesieniu tylko do tlenku azotu i nadtlenoazotynu] [47].

Wolne rodniki są bardzo reaktywnymi chemicznie cząsteczkami dzięki obecności niesparowanych elektronów. Nie wszystkie jednak wolne rodniki wykazują jednakowy stopień reaktywności, np. tlen nie jest zbyt reaktywny, chociaż ma dwa niesparowane elektrony. Przyczyną stosunkowo niskiej reaktywności tlenu jest kierunek spinu obu niesparowanych elektronów. Elektrony o tym samym kierunku spinu nie mogą zajmować tego samego orbitalu. W związku z tym cząsteczka tlenu nie może przyjąć pary elektronów na jeden orbital, ponieważ zgodnie z zasadami mechaniki kwantowej nie może on zawierać dwóch elektronów o tym samym kierunku spinu. Z zastrzeżenia tego wynika, że tlen może przyłączyć tylko pojedynczy elektron i dlatego do redukcji molekularnego tlenu niezbędne są liczne reakcje, podczas których powstają wysoce reaktywne produkty pośrednie [32].

1.1.1 Szlak metaboliczny tlenu

Tlen jest metabolizowany na końcu łańcucha reakcji elektronów i protonów. Do całkowitego zredukowania tlenu cząsteczkowego do wody niezbędne są cztery elektrony i cztery protony (Ryc.1.1). W pierwszej reakcji do tlenu przyłączany jest elektron i powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot -}$). Zwraca uwagę kropka przy symbolu nadtlenuka, która oznacza nie sparowany elektron i jest umownym symbolem wolnego rodnika. W wyniku dodania jednego elektronu, do anionorodnika ponadtlenkowego, reakcja katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), powstaje nadtlenek wodoru, silny utleniacz. Nadtlenek wodoru jest bardzo mobilny, łatwo przechodzi przez błony komórkowe. Jest silną toksyną komórkową, znane jest jego działanie uszkodzające komórki śródbłonka. Nie jest wolnym rodnikiem, lecz może tworzyć wolne rodniki (rodniki wodorotlenowe) i działać toksycznie. Nadtlenek wodoru jest substratem dla czterech typów reakcji: 1/ w obecności żelaza służącego jako katalizator a zarazem donor elektronu ulega dysocjacji do rodnika wodorotlenowego i jonu wodorotlenowego (reakcja Fentona). Rodnik wodorotlenowy jest niezwykle aktywny. Jest jedną z najbardziej reaktywnych cząsteczek chemicznych i często reaguje z innymi cząstkami chemicznymi znajdującymi się nawet w odległości pięciokrotnie większej od rozmiaru cząsteczki. Jest zdolny do utlenienia każdej cząsteczki organizmu. Wysoki stopień reaktywności ogranicza ruchliwość tego rodnika. Końcową reakcją w metabolizmie tlenu jest dodanie elektronu do rodnika wodorotlenowego i powstanie dwóch cząsteczek wody. 2/ i 3/ W reakcjach katalizowanych przez katalazę i peroksydazę glutationu nadtlenek wodoru przekształcany jest bezpośrednio do wody z pominięciem rodnika wodorotlenowego. 4/ Metabolizm tlenu w neutrofilach ma dodatkowy szlak, w którym peroksydaza leukocytarna w wyniku chlorowania nadtlenu wodoru tworzy kwas podchlorawy. Po

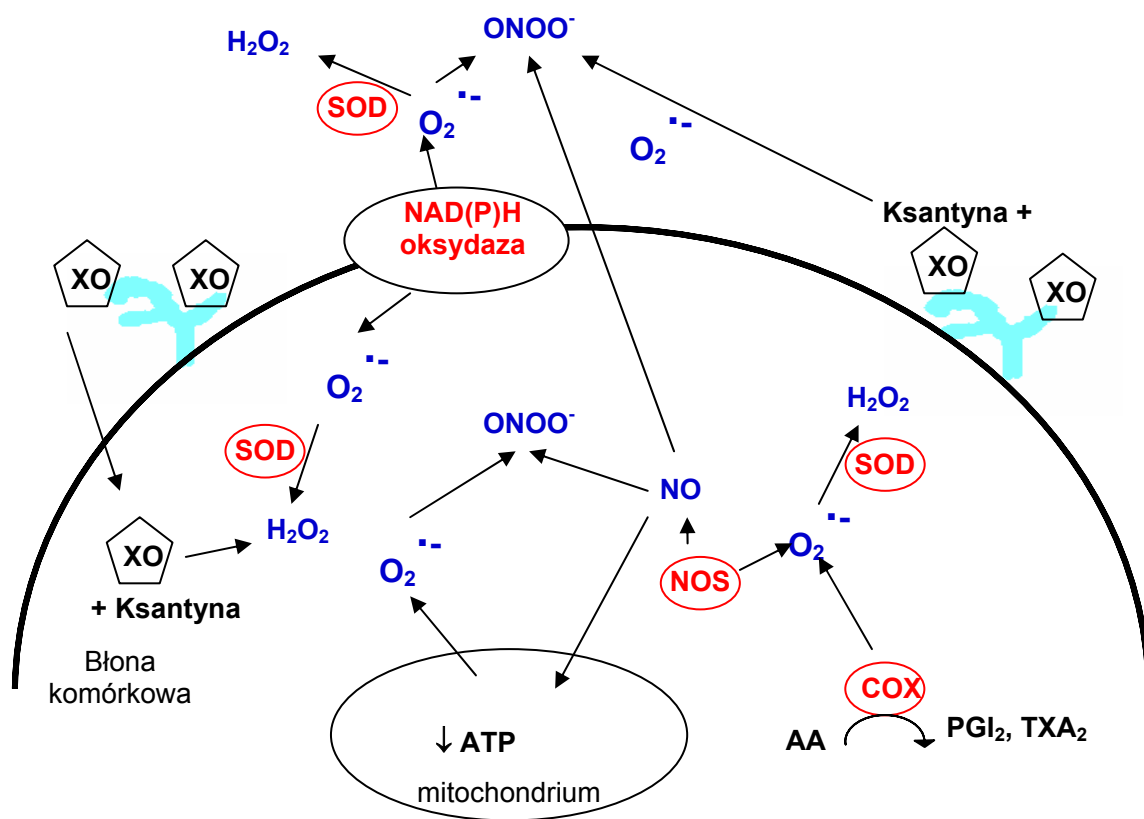
aktywacji neutrofilii przechodzenie tlenu w nadtlenek wodoru wzrasta dwudziestokrotnie. Nazywane jest to „wybuchem oddechowym”. Przy wzroście metabolizmu 40% nadtlenku wodoru przekształcane jest w podchloryn a reszta w rodniki wodorotlenowe. Podchloryn jest aktywnym składnikiem powszechnie stosowanych wybielaczy. Jest silnym środkiem bakteriobójczym w ciągu milisekund zabijającym bakterie [32].



Ryc.1.1 Szlak metaboliczny tlenu [32].

1.1.2 RFT w naczyniach; źródła i działanie

Komórki naczyń narażone są na działanie utleniaczy zarówno w sposób parakryny jak i autokryny. Granulocyty obojętnochłonne i monocyty uwalniają nadtlenek wodoru w takich warunkach jak np. reperfuzja po okresie niedokrwienia czy zapalenie. Dodatkowo tak komórki śródbłonna jak i mięśni gładkich naczyń uwalniają szereg utleniaczy mogących działać bezpośrednio i pośrednio na sygnalizację komórkową. Komórkowe źródła reaktywnych form tlenu przedstawione są na Ryc. 1.2 [4, 31].



Ryc.1.2 Źródła reaktywnych form tlenu w komórkach naczyń [31].

a) Tlenek azotu (NO)

Tlenek azotu syntezowany jest i w komórkach śródbłonna i w komórkach mięśni gładkich naczyń. L-arginina podlega pięciostopniowemu utlenieniu przez syntazę tlenku azotu (NOS) w L-cytrulinę i NO. Kofaktorami reakcji są: NADPH, tetrahydrobiopteryna (BH₄), dinukleotyd flawinowo-adeninowy (FAD) i mononukleotyd flawinowy (FMN). Wprawdzie w naczyniach krwionośnych obecne są wszystkie trzy izoformy NOS (eNOS-śródbłonkowa; iNOS-indukowalna i nNOS-neuronalna) to obecnie największe znaczenie w biologii naczyń przypisuje się eNOS i iNOS. Przepływ substratów przez eNOS powoduje tworzenie NO w stężeniach nanomolarnych i jest generalnie powiązane z cytoprotekcyjnym działaniem NO i utrzymywaniem homeostazy naczyniowej. Przepływ substratów przez iNOS powoduje tworzenie NO w stężeniach mikromolarnych i jest powiązane z cytotoksycznym działaniem NO i wywoływaniem patologii naczyniowych.

Działanie NO w naczyniach:

1/ regulacja napięcia naczyniowego; niskie stężenia NO produkowane przez komórki śródbłonna rozkurczają komórki mięśni gładkich prowadząc do rozszerzenia naczyń. To podstawowe uwalnianie NO jest kluczowe dla utrzymania podstawowego napięcia naczyniowego. Wysokie stężenia NO, występujące we wstrząsie septycznym, prowadzą do nadmiernego rozszerzenia naczyń i podciśnienia. NO syntezowany w cytozolu komórek śródbłonna dyfunduje do przylegających komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) gdzie wiąże się z zawierającym hem enzymem, rozpuszczalną cyklazą guanylanową (sGC). Aktywacja sGC zwiększa ilość komórkowego cGMP, co aktywuje zależną od cGMP kinazę białkową (PKG) prowadząc ostatecznie do zmniejszenia stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i rozkurczu mięśnia.

2/ hamowanie przylegania i agregacji płytek; wysokie poziomy NO syntezowane przez iNOS in vivo potrafią zapobiec przyleganiu płytek podobnie jak rozkurcz mięśni gładkich działanie to odbywa się za pośrednictwem cGMP.

3/ modulowanie proliferacji VSMC; NO hamuje proliferację VSMC w sposób zależny od dawki. W warunkach podstawowych komórki mięśni gładkich nie dzielą się, a ich proliferacja wiąże się z progresywnym zwężaniem światła tętnic obserwowanego w miażdżycy. Po urazie naczyniowym VSMC potrafią zwiększyć ekspresję iNOS, co ogranicza pourazową ich proliferację.

4/modulowanie apoptozy i proliferacji komórek śródbłonka; apoptoza komórek śródbłonka jest fizjologicznym procesem usuwającym uszkodzone komórki ze ściany naczynia. Nadmierna apoptoza wiązana jest ze zmianami miażdżycowymi. Wprawdzie niskie stężenia NO chronią śródbłonek przed bodźcami indukującymi apoptozę np. $TNF\alpha$, lecz wysokie stężenia stanowią już czynnik apoptozę wyzwalający.

5/ modulowanie wewnątrzkomórkowego stanu redoks; tlenek azotu będąc wolnym rodnikiem ma zdolność modulowania stanu redoks w komórkach naczyń. Niskie stężenia NO redukują obecność wewnątrzkomórkowych RFT a wysokie stężenia, poprzez tworzenie nadtlenoazotynu, mogą nasilać uraz oksydacyjny.

6/ hamowanie przylegania leukocytów; NO zmienia zdolność leukocytów do przylegania do ściany naczyń. Przyleganie leukocytów jest kluczowe w skutecznej odpowiedzi zapalnej, ale wiązane jest także z patogenezą miażdżycy.

7/ hamowanie oddychania komórkowego; NO moduluje funkcję zawierających hem enzymów mitochondrialnych. W stężeniach fizjologicznych NO w sposób odwracalny hamuje aktywność oksydazy cytochromu c współzawodnicząc z tlenem o wiązanie z hemem. Tlenek azotu obecny w wysokich stężeniach może poprzez tworzenie nadtlenoazotynu nieodwracalnie zahamować oddychanie komórkowe [35, 65].

b) Anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$)

Nadprodukcja anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach naczyń zaburza sygnalizację zależną od NO i wprowadza zmiany w kilku wewnątrzkomórkowych szlakach sygnalizacyjnych. Anionorodnik ponadtlenkowy obecny w naczyniach pochodzi z wielu źródeł. Jednym z nich jest ksantyna utleniana przez oksydazę ksantynową. Czynnikiem ograniczającym jest dostępność substratu-ksantyny. Innym źródłem jest specyficzna NADP(H) oksydaza będąca głównym źródłem pochodzących z mięśni gładkich RFT. Agoniści tacy jak angiotensyna II czy $TNF\alpha$ wykazują zdolność zwiększania zależnej od związanej z błoną komórkową NADPH-oksydazy syntezy anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach mięśni gładkich naczyń. Anionorodnik ponadtlenkowy powstający w erytrocycie jest produktem autooksydacji hemoglobiny do methemoglobiny, natomiast powstający w innych tkankach jest produktem reakcji katalizowanej przez enzymy takie jak reduktaza cytochromu P 450. Kolejne badania dostarczają dowodów na to, że także takie enzymy jak syntaza tlenu azotu i cyklooksygenaza (NOS i COX) w pewnych warunkach stanowią źródło $O_2^{\cdot-}$ [22, 31, 39].

c) Nadtlenoazotyn ($ONOO^-$)

Nadtlenoazotyn jest silnym utleniaczem powstającym w wyniku reakcji dwóch relatywnie słabych wolnych rodników, tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego. Stała reakcji wynosi $6,7 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ i przewyższa stałą reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową - $2 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. W normalnych warunkach, czynnikiem modulującym równowagę pomiędzy powstającymi tlenkiem azotu i anionorodnikiem ponadtlenkowym jest stężenie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych izoform SOD,

przekształcających anionorodnik ponadtlenkowy do nadtlenu wodoru. Nadtlenoazotyn, w wyniku zużywania pełniącemu ważne funkcje biologiczne tlenu azotu, działa pośrednio. Bezpośrednie efekty działania nadtlenoazotynu obejmują utlenianie lipidów oraz zależne od obecności grup tiolowych tworzenie donorów tlenu azotu [49, 64].

1.1.3 Rola RFT w sygnalizacji wapniowej

Reaktywne formy tlenu wpływają na wewnątrzkomórkowy metabolizm wapnia, ale ostateczny efekt zależny jest od wielu czynników. Działanie wolnych rodników na szlaki sygnalizacyjne wapnia zależy od rodzaju komórki-czy jest to komórka śródbłonna czy mięśni gładkich naczyń. Istotny jest także rodzaj badanego wolnego rodnika, jego stężenie i szeroko rozumiane warunki dokonywanego pomiaru (rodzaj naczynia, zwierzęcia eksperymentalnego lub parametrów hodowli komórkowej).

Mając na uwadze powyższe zastrzeżenia można jednakże dostrzec pewne prawidłowości. Najogólniej rzecz ujmując w komórkach śródbłonna anionorodnik nadtlenkowy nasila a nadtlenek wodoru osłabia zmiany stężenia wapnia indukowane działaniem agonisty. W komórkach mięśni gładkich naczyń RFT najprawdopodobniej inaktywują SERCA (*smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -transporting ATPase*) [31].

1.2 Antyutleniacze

Antyutleniaczem jest związek chemiczny mogący zmniejszyć lub opóźnić utlenianie substratów. Najogólniej rzecz ujmując antyutleniacze można podzielić na enzymatyczne i nieenzymatyczne.

1.2.1 Antyutleniacze enzymatyczne

Enzymami zaangażowanymi w ochronę antyoksydacyjną są dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza i peroksydaza glutationu.

SOD katalizuje przemianę dwóch anionorodników ponadtlenkowych w tlen cząsteczkowy i wodę, czyli usuwa uszkodzające RFT ze środowiska komórkowego. SOD istnieje w trzech izoformach (każda kodowana przez odmienny gen) zlokalizowanych w kompartmentach komórkowych. Dysmutaza ponadtlenkowa miedziano-cynkowa (CuZnSOD; SOD1) zlokalizowana jest głównie w cytozolu oraz w jądrze komórkowym i uważa się, że ulega ekspresji we wszystkich komórkach ssaków. Występowanie dysmutazy manganowej (MnSOD; SOD2) ograniczone jest do matriks mitochondrialnego, gdzie rozkłada powstające tam RFT. Trzecia izoforma dysmutazy, zewnątrzkomórkowa (ecSOD; SOD3), wydzielana jest poza komórkę. Stanowi główną dysmutazę chłonki, osocza i płynu stawowego. ecSOD wiązana jest na powierzchni komórek przez siarczan heparanu. Połączona jest podobnie jak SOD1 z jonem miedzi i cynku.

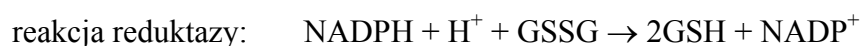
W naczyniach krwionośnych przeważającą izoformą SOD jest CuZnSOD (biorąc pod uwagę procent całkowitej aktywności SOD). Przykładowo w normalnej mysiej aorticie aktywność CuZnSOD stanowi 53%-80%, MnSOD 2%-7% całkowitej aktywności SOD a ecSOD odpowiada za resztę. Podobne zależności występują w

tętnicach ludzkich. Sugeruje się, że uwalnianie tlenu azotu ze śródbłonka zależy od CuZnSOD a ecSOD jest wymagana do ochrony tlenu azotu w czasie przenikania przez ścianę naczyń. Duże stężenie ecSOD występuje w przestrzeni pomiędzy śródbłonkiem a mięśniami gładkimi naczyń krwionośnych. Drogę tę musi pokonać tlenek azotu, aby wywołać rozkurcz. Obniżanie stężenia anionorodnika ponadtlenkowego zapobiega tworzeniu się nadtlenoazotu azotu zwiększając dostępność tlenu azotu.

Utrata przez ecSOD w wyniku proteolizy domeny wiążącej siarczan heparanu zmniejsza tkankowy czas półtrwania z 85 do 7 godzin doprowadzając do nasilenia urazu wywołanego działaniem RFT. Szereg czynników kontrolujących napięcie naczyń posiada także zdolność regulacji ekspresji ecSOD. Histamina, wazopresyna, oksytocyna, endotelina 1, angiotensyna II i serotonina zwiększają ekspresję w sposób zależny od białek G. Heparyna i siarczan heparanu zwiększają ekspresję ecSOD prawdopodobnie poprzez wpływ na kinazę białkową C (PKC) [5, 7, 9, 37].

Katalaza jest enzymem zawierającym żelazo hemowe. Redukuje ona nadtlenek wodoru do wody. Jest obecna w większości komórek, w najmniejszych ilościach występuje w komórkach serca i neuronach. Zahamowanie aktywności katalazy nie zwiększa toksyczności nadtlenku wodoru dla komórek śródbłonka, dlatego jej rola jako antyutleniacza jest niejasna.

Peroksydaza glutationowa redukuje nadtlenek wodoru do wody w wyniku usunięcia elektronów z glutationu w formie zredukowanej i przyłączenie ich do nadtlenku wodoru. Powrót glutationu do formy zredukowanej odbywa się dzięki działaniu reduktazy, która przenosi wodór z NADPH. Pełną reakcję można zapisać:



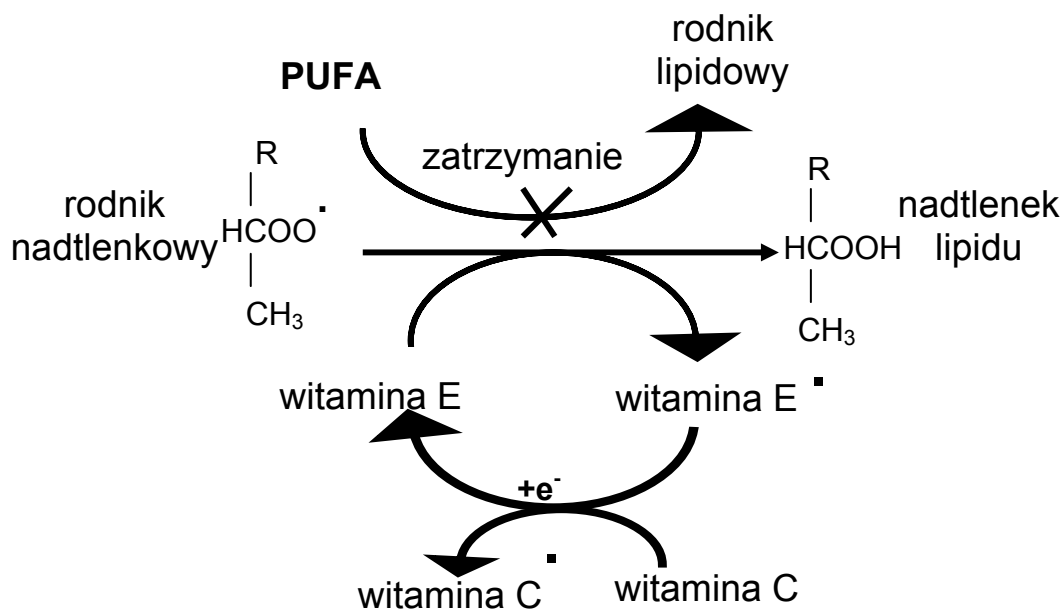
GSSG i GSH są odpowiednio utlenionym i zredukowanym glutationem. Aktywność peroksydazy glutationu u ludzi zależy od pierwiastka śladowego-selenu [32].

1.2.2 Antyutleniacze nieenzymatyczne (wymiatacze)

a) fizjologiczne:

Związki niebędące enzymami a wykazujące zdolność ochrony antyoksydacyjnej, to jest zmniejszania ilości wolnych rodników, bywają nazywane wymiataczami (*scavengers*). Najbardziej oczywiste, fizjologiczne, wydaje się działanie endogenego glutationu oraz egzogennych witamin E i C. Wprawdzie witaminy te są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych, to w obecnej dobie powszechnego dodawania ich do produktów spożywczych, dodatkowe spożywanie witamin w postaci tabletek nie niesie istotnych korzyści zdrowotnych. W pewnych określonych sytuacjach klinicznych może być nawet szkodliwe [32].

Witamina E (alfa-tokoferol) jest witaminą rozpuszczalną w lipidach, która przede wszystkim działa jako antyoksydant chroniący przed uszkodzeniem oksydacyjnym lipidy błonowe. Jest jedynym antyoksydantem zdolnym zatrzymać rozprzestrzeniającą się peroksydację lipidów. Mechanizm tego procesu przedstawiono na Ryc.1.3 Witamina E występuje w lipofilnym wnętrzu błon komórkowych, gdzie znajdują się także wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Gdy rozprzestrzeniająca się fala peroksydacji lipidów dociera do witaminy E, jest ona utleniana do wolnego rodnika, chroniąc tym samym kolejne wielonienasycone kwasy tłuszczowe przed utlenieniem. Rodnik witaminy E jest mało reaktywny i w ten sposób hamuje rozprzestrzenianie się peroksydacji. Taki sposób działania nadaje witaminie E funkcję antyoksydanta przerywającego reakcję łańcuchową. Rodnik witaminy E jest przekształcany z powrotem w witaminę E w reakcji, w której elektron dostarcza witamina C.



Ryc.1.3 Zatrzymanie peroksydacji lipidów błon komórkowych przez witaminę E – przerwanie reakcji łańcuchowej [32].

Witamina C (kwas askorbinowy) jest reduktorem dostarczającym elektrony wolnym rodnikom w celu uzupełnienia ich orbitali elektronowych. Jest ona rozpuszczalna w wodzie i występuje głównie w przestrzeni pozakomórkowej. Duże ilości witaminy C występują w płucach, gdzie prawdopodobnie odgrywają rolę ochronną, inaktywując zanieczyszczenia dochodzące do dróg oddechowych.

Glutation jest jednym z głównych antyutleniaczy w organizmie ludzkim. Zawierający siarkę trójpeptyd glutationu (glicyna-cysteina-glutamina) działa jak czynnik redukujący dzięki obecności w cząsteczce grup sulfhydrylowych cysteiny. Głównym działaniem antyoksydacyjnym glutationu jest bezpośrednia redukcja nadtlenu wodoru do wody z pominięciem tworzenia się rodników hydroksylowych.

Glutation jest antyutleniaczem wewnątrzkomórkowym. Nie przechodzi przez błony komórkowe bezpośrednio, lecz rozpada się na poszczególne aminokwasy, które następnie łączą się po drugiej stronie błony. Jest on syntezowany w komórce i tylko niewielkie ilości wydostają się poza komórkę. Egzogenny glutation ma niewielki wpływ na stężenie wewnątrzkomórkowe, co sprawia, że nie znajduje on zastosowania w terapii [32].

b) roślinne

Istnieje szereg produktów spożywczych, których korzystny wpływ na zdrowie nie wynika bezpośrednio z zawartości witamin, ale z obecności w nich substancji chemicznych zdolnych do wymiatania wolnych rodników. Oprócz najbardziej oczywistego czerwonego wina i soku z czarnej porzeczki intensywnym badaniom podlegają substancje czynne zawarte m.in. w zielonej herbacie[2, 67, 71], soi [70] i imbirze [17].

c) inne leki

Istnieje pogląd, że skuteczność wielu leków mających zastosowanie w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego wynika nie tylko z ich mechanizmu działania, ale także z dodatkowej funkcji zmniejszania stresu oksydacyjnego. Wymieniane są m.in. inhibitory konwertazy angiotensyny, antagonisty recaptora AT1, niektóre beta-adrenolityki (karwedilol) [11, 60], antagoniści kanału wapniowego [72] a także furosemid [26].

N-acetylocysteina jest powszechnie używanym mukolitykiem. Jest to zawierający grupy sylfhydrylowe analog glutationu zdolny do przenikania przez błony

komórkowe. N-acetylocysteina ma udowodnione działanie jako egzogeny analog glutationu [32, 63].

Istnieje szereg substancji chemicznych, wykazujących zdolność wymiatania wolnych rodników a nieznajdujących zastosowania jako leki, które wykorzystywane są w badaniach jako „narzędzia farmakologiczne”.

1.3 Rola reaktywnych form tlenu we wstrząsie septycznym

1.3.1 Zakażenie, zapalenie i niewydolność wielonarządowa a wstrząs.

Wstrząs jest terminem, którym określa się postępującą niewydolność krążenia, które nie jest w stanie dostarczyć niezbędnej ilości krwi i tlenu do najważniejszych narządów organizmu. W praktyce klinicznej, kluczowym objawem wstrząsu jest poważny spadek ciśnienia tętniczego, któremu często towarzyszy dysfunkcja lub niewydolność szeregu ważnych narządów włącznie z płucami, nerkami, wątrobą i mózgiem. Najczęstszą przyczyną wstrząsu jest przedostanie się bakterii do krwi (bakteriemia) prowadząca w wyniku wywołania układowej infekcji do wstrząsu septycznego. Wstrząs może być także wywołany nadmierną utratą krwi (krwotoczny), urazem (bólowy), niewydolnością serca (kardiogeny), zaburzeniem w unerwieniu naczyń krwionośnych (neurogeny) i ciężką reakcją alergiczną (anafilaktyczny).

Wstrząs septyczny, niezależnie od swojej etiologii, definiowany jest jako ciężka posocznica (układowa odpowiedź na infekcję) z obniżonym ciśnieniem pomimo adekwatnej terapii płynowej i zastosowania środków naczyniokurczących prowadząca do niedotlenienia tkanek [59].

Wstrząs septyczny jest ostatnim ogniwem w patogenetycznym łańcuchu zdarzeń zapoczątkowanym przez uraz, którym może być zarówno inwazja drobnoustrojów jak i oparzenie czy uraz fizyczny, wywołujący odpowiedź zapalną organizmu. Reakcja zapalna jest formą ochrony organizmu przed szkodliwymi skutkami urazu, ale sama może także doprowadzić do uszkodzenia tkanek, gdy produkcja czynników uszkodzających (np. enzymy proteolityczne, rodniki tlenowe) przeważa nad normalnymi mechanizmami obronnymi gospodarza. Kliniknym objawem rozległego

uszkodzenia zapalnego jest zespół dysfunkcji wielonarządowej, który może doprowadzić do zespołu niewydolności wielonarządowej (*multiple organ dysfunction syndrom* – MODS).

Zależności pomiędzy zakażeniem, zapaleniem i uszkodzeniem narządów stały się podstawą nowego nazewnictwa, zaproponowanego wspólnie przez American College of Chest Physician i Society of Critical Care Medicine. Ogólnoustrojowa reakcja zapalna (np. gorączka i leukocytoza) została nazwana *zespołem uogólnionej reakcji zapalnej* (*systemic inflammatory response syndrome* – SIRS). Jeśli podstawową przyczyną SIRS jest zakażenie, stan taki nazywany jest *posocznicą* (*sepsis*). Jeśli zaś posocznicy towarzyszą zaburzenia czynności jednego lub więcej ważnych narządów, mówi się o *ciężkiej posocznicy* (*severe sepsis*). Ciężka posocznica, w której dochodzi do spadku ciśnienia krwi niepoddającym się przetaczaniu płynów krwiozastępczych, to *wstrząs septyczny* (*septic shock*). Nazewnictwo to można przedstawić następująco:

Gorączka + leukocytoza = SIRS

SIRS + zakażenie = posocznica

Posocznica + dysfunkcja wielonarządowa = ciężka posocznica

Ciężka posocznica + oporny na przetaczanie płynów spadek
ciśnienia = wstrząs septyczny

Najczęściej wyizolowywanymi szczepami są Gram-ujemne patogeny jelitowe (np. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, i *Escherichia coli*), gronkowce (*Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus*) oraz *Enterococcus*. Drobnoustroje te również najczęściej występują w przypadkach ciężkiej posocznicy i wstrząsu septycznego. Chociaż posocznica wywoływana przez bakterie Gram-ujemne jest uważana za najczęstszą przyczynę niewydolności wielonarządowej spowodowanej zakażeniem, to zakażenie wywołane przez każdy drobnoustrój może być przyczyną tego

zespołu. Rodzaje drobnoustrojów powodujących rozsiane zakażenia na oddziale intensywnej terapii przedstawiono w Tabeli 1.1.

Tabela 1.1 Szpitalna posocznica u chorych w stanie ciężkim [33].

Drobnoustrój	Wyizolowane szczepy (%)	Najczęstsze źródło
Gram-ujemne patogeny jelitowe	38	Zapalenie płuc
Gronkowce koagulazo-ujemne	18	Cewniki naczyniowe
Gronkowiec złocisty	11	Zapalenie płuc
Enterokoki	10	Zapalenie płuc
Paciorkowce	7	Nieznane
Beztlenowce	5	Zapalenie płuc
<i>Candida</i>	5	Cewniki naczyniowe
Inne	6	Różne

1.3.2 LPS - receptor lipopolisacharydowy – sygnalizacja (TLR4)

Posocznica jest bezsprzecznie efektem złożonych interakcji pomiędzy bakterią a organizmem gospodarza, ale u większości pacjentów tylko niewielka ilość bakterii, jeśli w ogóle, jest wykrywalna we krwi lub w tkankach. To spostrzeżenie zaowocowało teorią, że zmiany kliniczne w posocznicy wywoływane są raczej przez toksyny niż w wyniku bezpośredniej interakcji nienaruszonej bakterii z komórką eukariotyczną. Nawet, jeżeli infekcja ograniczona jest do jednej lokalizacji (źródło infekcji) patogenetyczne bakterie doprowadzają do rozwoju zespołu niewydolności wielonarządowej w wyniku uwalniania toksyn do łożyska naczyniowego. W badaniach *in vitro* wykazano, że liczne toksyny bakteryjne wywołują spektrum reakcji komórkowych wysoce istotnych w patogenezie posocznicy. Tak, więc zdolność bakterii do wywołania infekcji doprowadzającej w rezultacie do wstrząsu septycznego wynika w znacznej mierze ze zdolności do wytwarzania (uwalniania) toksyn.

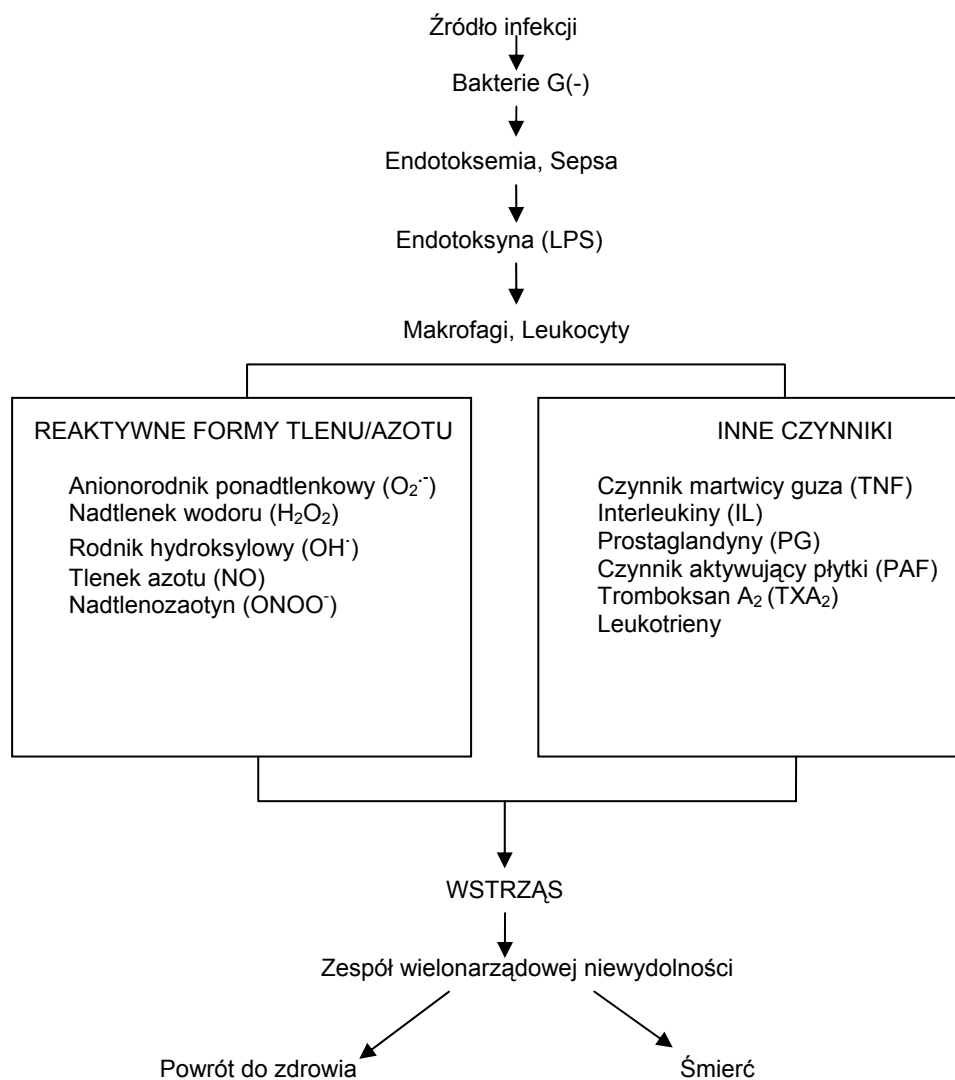
Każda z toksyn bakteryjnych może być zaklasyfikowana do jednej z dwóch kategorii. Pierwsza kategoria obejmuje endotoksyny i ich G(+) „ekwiwalenty” stanowiące strukturalny składnik ściany bakteryjnej. Najistotniejszym przedstawicielem tej grupy jest lipopolisacharyd (LPS) ściany bakterii G(-) a kwasy lipoteichowe i peptydoglikan stanowią jego odpowiedniki u bakterii G(+). Toksyny te zyskały miano „endotoksyn”, ponieważ nie są aktywnie wydzielane do otaczającego środowiska tylko uwalniane w wyniku rozpadu komórki bakteryjnej. Egzotoksyny reprezentują drugą kategorię toksyn bakteryjnych. Termin „egzotoksyna” podkreśla fakt aktywnego wydzielania do otoczenia [14].

Lipopolisacharydy są głównym integralnym składnikiem zewnętrznej błony bakterii Gram-ujemnych. Stanowią ostatnią barierę odgradzającą komórkę bakteryjną od otaczającego środowiska. Pod względem budowy chemicznej zawierają: 1/ łańcuch-*O* charakteryzujący się dużą zmiennością pomiędzy różnymi szczepami bakterii; 2/ mniej zmienny rdzeń oligosacharydowy; 3/ lipid *A* o najmniejszej strukturalnej zmienności.

Endotoksyna, aby skutecznie modyfikować funkcje wyższego organizmu, musi być uwolniona z powierzchni komórki bakteryjnej (Ryc.1.4). Działanie to nie polega na bezpośrednim zabijaniu komórek gospodarza, ale na ich pobudzeniu do wydzielania szeregu mediatorów, które to mediatory działają miejscowo, ogólnie lub na oba sposoby [14]. Najczęściej aktywowanymi przez LPS komórkami są makrofagi, zarówno te krążące we krwi jak i rezydujące w tkankach oraz komórki śródbłonna. Zadaniem makrofagów, komórek układu immunologicznego, jest fagocytoza i zniszczenie jakiegokolwiek obcej substancji mogącej być zagrożeniem dla gospodarza.

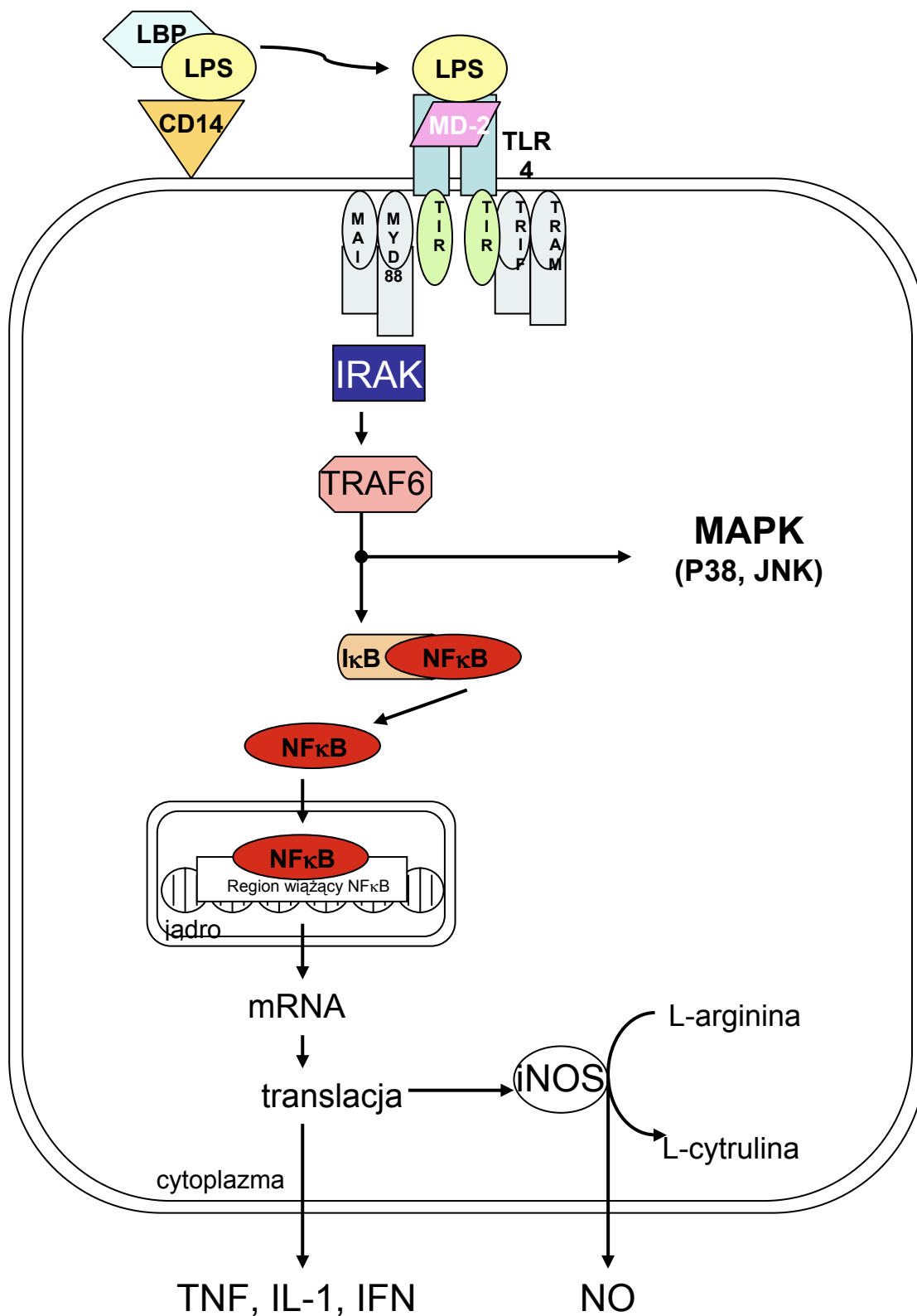
Aktywowane makrofagi uwalniają: cytokiny (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 itp.), pochodne kwasu arachidonowego (prostaglandyny) i wolne rodniki (reaktywne formy

tlenu). Szerokie spektrum aktywności cytokin obejmuje m.in. promowanie infiltracji tkankowej przez neutrofile i ich aktywację. Wszystko to ma na celu wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej i eliminację patogenu. Nadmierna uogólniona reakcja zapalna doprowadza do wstrząsu septycznego kończącego się niejednokrotnie śmiercią wraz z całkowitym załamaniem się funkcji jednego lub kilku układów [2, 14, 42].



Ryc.1.4 Patogenetyczna sekwencja zdarzeń we wstrząsie septycznym [2].

Prawdopodobnie pierwszą substancją zaangażowaną w rozpoznawanie **LPS** jest białko wiążące LPS (*LPS-binding protein* - **LBP**). LBP jest białkiem ostrej fazy produkowanym w wątrobie, które krążąc we krwi rozpoznaje i łączy się z częścią LPS określaną jako lipid A. Wydaje się, że rolą LBP jest ułatwienie przyłączenia LPS do kompleksu receptorowego. W pierwszym etapie LBP łączy się z LPS, następnie LBP-LPS łączy się z **CD14**, które pośredniczy w przekazaniu LPS na kompleks receptorowy składający się z receptora **TLR4** (*Toll-like receptor-4*) i **MD-2** (Ryc.1.5) [42].



Ryc.1.5 Uproszczony model sygnalizacji zależnej od LPS – „Toll-like” receptor-TLR4 [14, 42].

1.3.3 Reakcje śródbłonka na toksyny bakteryjne w posocznicy

Komórki śródbłonka stanowią atrakcyjny cel ataku dla patogenów a w szczególności uszkodzeń wywołanych działaniem toksyn bakteryjnych. Dzieje się tak, ponieważ śródbłonek pełni szereg funkcji, które są kluczowe dla utrzymania wewnątrzustrojowej homeostazy. W odpowiedzi na różnorakie bodźce fizyczne i chemiczne syntezuje i uwalnia dużą liczbę substancji (Tabela 1.2). Pozwala to śródbłonkowi uczestniczyć w regulacji napięcia i przepuszczalności naczyń, równowagi pomiędzy procesami koagulacji a fibrynolizy oraz aktywie uczestniczyć w procesie zapalnym [8]. Aktywacja tych funkcji stanowi część mechanizmów obronnych gospodarza skierowanych przeciw infekcji bakteryjnej i jako taka jest korzystna. Jakkolwiek w posocznicy i wstrząsie septycznym śródbłonek ulega nadmiernej aktywacji przyczyniając się do uszkodzenia tkanek.

Tabela 1.2 Substancje uwalniane przez śródbłonek [8].

Rozkurczające naczynia	Kurczące naczynia
<ul style="list-style-type: none">• Tlenek azotu• Bradykinina• Prostacyklina• EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor)• Serotonina*, histamina, substancja P	<ul style="list-style-type: none">• Angiotensyna II• Endotelina• Tromboksan A₂, serotonina*, kwas arachidonowy, prostaglandyna H₂, trombina, nikotyna
Ułatwiający wzrost komórek mięśni gładkich	Hamujący wzrost komórek mięśni gładkich
<ul style="list-style-type: none">• <i>Platelet-derived growth factor</i>• <i>Basic fibroblast growth factor</i>• <i>Insulin-like growth factor-I</i>• Endotelina, angiotensyna II	<ul style="list-style-type: none">• Tlenek azotu, prostacyklina, bradykinina• Siarczan heparanu• <i>Transforming growth factor β</i>
<i>Adhesion molecules</i>	Trombolityczne
<ul style="list-style-type: none">• <i>Endothelial leukocyte adhesion molecule</i>• <i>Intracellular adhesion molecule</i>• <i>Vascular cell adhesion molecule</i>	<ul style="list-style-type: none">• Tkankowy aktywator plazminogenu (tPA)• Inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI)-1• Trombomodulina

*Serotonina, w warunkach podstawowych, rozkurcza naczynia krwionośne, ale jednocześnie wywołuje paradoksalnie skurcz, gdy śródbłonek uszkodzony jest w wyniku nadciśnienia, hipocholesterolemii lub innych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego.

Jedną z funkcji śródbłonka, która podlega modyfikacji w warunkach wstrząsu septycznego jest zdolność do kontroli napięcia naczyniowego, a co za tym idzie przepływu tkankowego. Komórki śródbłonka koordynują działanie licznych, niejednokrotnie działających antagonistycznie, modulatorów napięcia naczyniowego (Tabela 1.2). Zachwianie tej delikatnej równowagi pomiędzy czynnikami kurczącymi a rozkurczającymi wynikających z obecności endotoksyny prowadzi do poważnych zaburzeń mikro- i makrokrążenia.

Bariera śródbłonkowa reguluje transport składników komórkowych, makromolekuł i płynu z przedziału naczyniowego do otaczających tkanek. Zwiększona przepuszczalność jest rezultatem skurczu komórek śródbłonka na skutek reorganizacji cytoszkieletu. Załamanie bariery naczyniowej prowadzące m.in. do obrzęku tkanek jest klasyczną cechą posocznicy i wstrząsu septycznego, które bywa wywoływane zarówno bezpośrednim atakiem toksyna na śródbłonek jak i za pośrednictwem szeregu mediatorów (np. cytokiny, PAF, leukotrieny) [14].

1.3.4 Mechanizmy doprowadzające do hyporeaktywności naczyń

W ostatnich latach udowodniono, że tendencja do rozwoju ciężkiej posocznicy i wstrząsu septycznego nie zależy od rodzaju drobnoustroju, lecz jest uwarunkowana reakcją gospodarza na zakażenie. Znaczy to, że im bardziej nasilona jest reakcja zapalna na zakażenie, tym większe jest ryzyko rozwoju niewydolności wielonarządowej [33].

W początkowym okresie ciężkiej posocznicy i wstrząsu septycznego często występuje hipowolemia spowodowana zarówno rozszerzeniem tętnic i żył jak i przesiąkaniem płynów do przestrzeni zewnątrznaczyniowej. Intensywna terapia płynowa prowadzi do tachykardii, obniżenia układowego oporu naczyniowego, normalnego lub podwyższonego rzutu serca i podwyższonego stężenia tlenu w tętnicy płucnej – krążenie hiperdynamiczne – u ponad 90% pacjentów. Taki zespół zaburzeń hemodynamicznych został sklasyfikowany jako wstrząs dystrybucyjny [43].

Wstrząs septyczny jest najczęstszą, ale nie jedyną, przyczyną wstrząsu przebiegającego z rozszerzeniem naczyń krwionośnych (Tabela 1.3). Do innych, rzadszych przyczyn zalicza się zatrucia związkami azotu, tlenkiem węgla, metforminą, cyjankami a także niektóre choroby mitochondrialne. Znaczące obniżenie ciśnienia charakteryzuje także późną (nieodwracalną) fazę wstrząsu kardiogenego i krwotocznego.

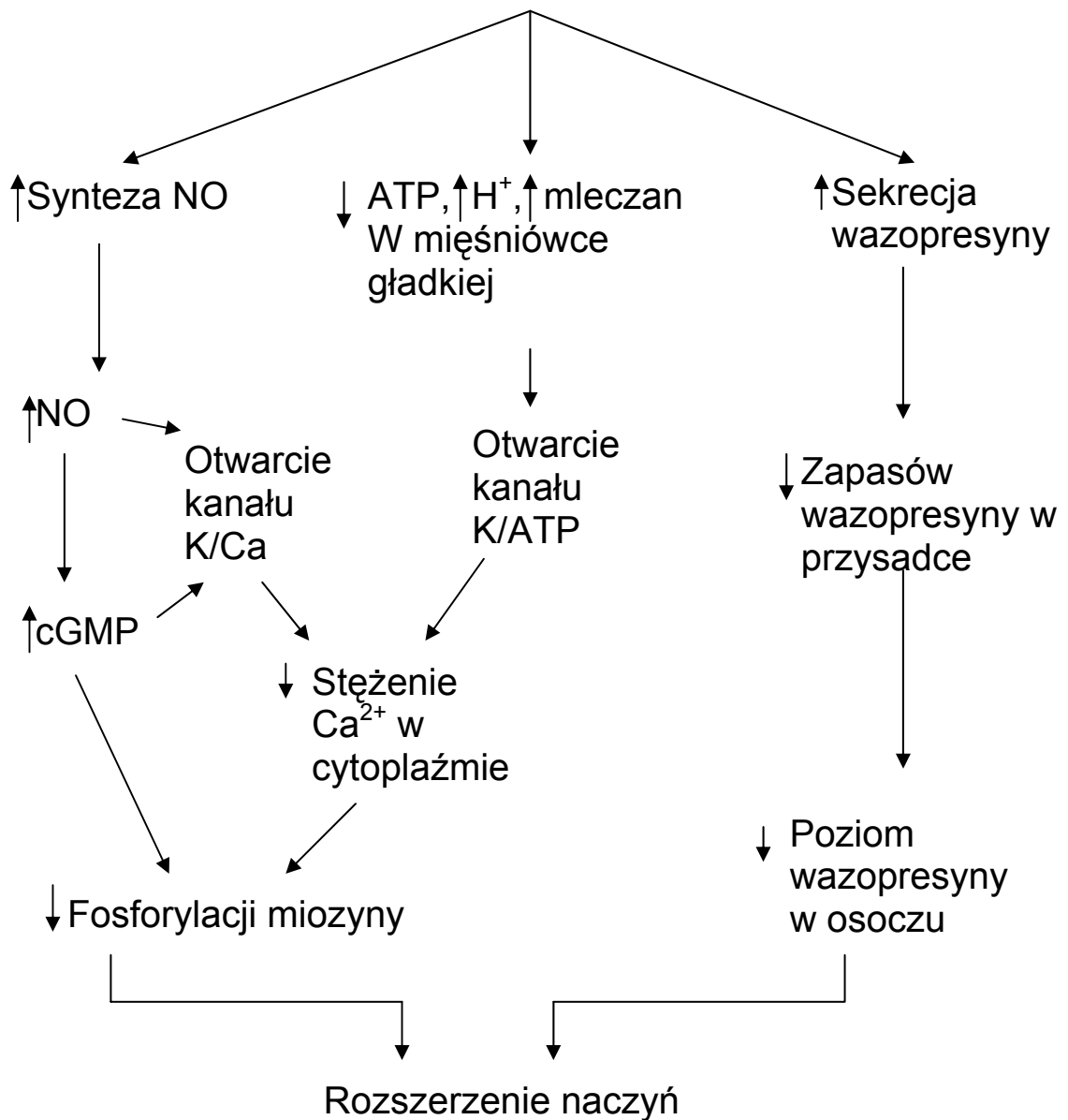
W badaniach poświęconych wrażliwości α -adrenoceptorów po kontakcie izolowanych naczyń z LPS (symulacja wstrząsu septycznego) stwierdzono zaburzenie przekazywania sygnału pomiędzy α -adrenoceptorem a kanałem wapniowym. Szczególnie dotyczyło to wczesnej fazy wstrząsu (2 godziny inkubacji z LPS), w której nie obserwuje się jeszcze zmian poziomu białek G [15, 16].

Utrzymanie prawidłowego ciśnienia tętniczego krwi wymaga sprawnego współdziałania szeregu układów hormonalnych i struktur. W szczególności mięśniówki gładkiej naczyń, układu renina-angiotensyna i katecholamin. We wszystkich przebadanych formach wstrząsu z rozszerzeniem naczyń stwierdzono aktywację układu renina-angiotensyna oraz podwyższenie osoczowego poziomu katecholamin. Tak, więc rozszerzenie naczyń i obniżenie ciśnienia muszą wynikać z upośledzenia kurczliwości mięśniówki gładkiej naczyń, która z kolei wywołana jest aktywacją indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), aktywacją kanałów potasowych ATP-zależnych oraz niedoborem wazopresyny (Ryc.1.6) [28].

Tabela 1.3 Przyczyny wstrząsu wazodylatacyjnego [28]

Posocznica
Nieadekwatne utlenowanie tkanek
Zatrucie związkami azotu
Zatrucie tlenkiem węgla
Przedłużone i ciężkie podciśnienie
Wstrząs krwotoczny
Wstrząs kardiogeny
Krążenie zewnątrzustrojowe
Wstrząs z przypuszczalnym rozszerzeniem naczyń
Zatrucie metforminą
Niektóre choroby mitochondrialne
Zatrucie cyjankami

Sepsa lub hipoksja tkankowa z kwasicią mleczanową



Ryc.1.6 Mechanizmy prowadzące do rozwoju wstrząsu wazodylatacyjnego [28].

a) Zwiększona synteza tlenu azotu.

Zwiększona synteza tlenu azotu prowadząca do rozszerzenia naczyń jest rezultatem aktywacji indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS). Czynnikiem aktywującym iNOS jest głównie lipopolisacharyd (LPS) będący integralnym składnikiem zewnętrznej błony bakterii G(-). Ponieważ LPS odpowiedzialny jest za objawy infekcji wywołanych przez te bakterie nazywany bywa również endotoksyną – oba terminy używane są wymiennie. Uważa się, że odpowiednikiem LPS u bakterii G(+) jest peptydoglikan i kwasy lipoteichowe. NO wydostając się ze śródbłonna do światła naczynia działa hamująco na leukocyty i agregację płytek, natomiast dyfuzja NO w kierunku od światła moduluje napięcie naczyń w wyniku stymulacji rozpuszczalnej cykazy guanylanowej w komórkach mięśni gładkich naczyń. Wzrost stężenia cGMP aktywuje białka docelowe np. kinezę białkową G wywołując rozkurcz naczyń [14, 28].

b) Aktywacja kanałów K^+_{ATP} w mięśniówce gładkiej naczyń.

Prawidłowy skurcz naczyń wymaga, aby takie neuronalne lub hormonalne ligandy jak angiotensyna II i norepinefryna doprowadziły po związaniu się ze swoimi właściwymi receptorami, poprzez układ drugorzędowych przekaźników, do wzrostu stężenia wapnia w cytozolu. Wzrost ten może wynikać zarówno z uwalniania wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych jak i wnikania wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez zależne od napięcia kanały wapniowe.

Uzupełnieniem dobrze znanych mechanizmów regulujących napięcie naczyń są wyniki niedawnych badań wskazujących na potencjał błonowy komórek mięśniówki gładkiej naczyń. Zmiany potencjału błonowego odgrywają kluczową rolę w tym procesie. Depolaryzacja, poprzez wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego, indukuje skurcz; hiperpolaryzacja w wyniku obniżenia stężenia wapnia indukuje

rozkurcz. Hiperpolaryzacja błony komórkowej zapobiega wnikaniu wapnia do komórki przeciwdziałając skurczowi nawet podczas obecności ligandów wyzwalających skurcz.

Otwarcie kanałów potasowych umożliwia wypływ potasu i zapobiega wnikaniu wapnia do komórki prowadząc do hiperpolaryzacji. W warunkach zwiększonego metabolizmu tkankowego lub niedotlenienia tkankowego aktywacja kanałów K^+_{ATP} w tętniczkach przyczynia się do obniżenia ciśnienia charakterystycznego dla wstrząsu przebiegającego z rozszerzeniem naczyń np. wstrząs septyczny [19, 29, 66].

c) Niedobór wazopresyny

We wstępnej fazie wstrząsu krwotocznego lub septycznego, wazopresyna (wraz z innymi czynnikami naczyniokurczącymi) przyczynia się do utrzymania ciśnienia tętniczego. Wazopresyna uwalniana jest z przysadki w odpowiedzi na obniżenie ciśnienia osiągając w osoczu wysokie stężenia. Wraz z pogarszaniem się wstrząsu dochodzi do obniżenia stężenia wazopresyny w osoczu, czemu towarzyszy wyczerpanie się zapasów w przysadce aczkolwiek dokładny mechanizm wymaga jeszcze wyjaśnienia [28, 29, 36].

2.Cel pracy

Celem niniejszej pracy było porównanie wpływu zmiataczy wolnych rodników na skurcz naczyń wywołany różnymi agonistami w warunkach podstawowych (bez zastosowania układu generującego wolne rodniki), oraz w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego obecnością LPS. Reaktywne formy tlenu (np. tlenek azotu, anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenoazotyn) odgrywają rolę w patogenezie wielu schorzeń, lecz szczególnie podkreśla się ich wpływ na rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego i w reakcji zapalnej. Hyporeaktywność naczyń we wstrząsie septycznym spełnia oba kryteria. Dostępne w piśmiennictwie wyniki działania reaktywnych form tlenu, oraz rezultaty ich zmiatania są niejednoznaczne. Zmiatanie anionorodnika ponadtlenkowego może zwiększać biodostępność tlenku azotu, lecz wielokrotnie podkreśla się, że osiągnane efekty zależą m.in. od gatunku zwierzęcia, rodzaju naczynia, zastosowanego agonisty, stężenia wolnego rodnika i innych czynników. Badanie, jaki wpływ ma wybór zmiatacza i agonisty na skurcz naczyń pozwoli lepiej zrozumieć rolę wolnych rodników we wstrząsie septycznym.

3. Materiał i metoda

Procedura eksperymentalna uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Opis procedury

Dorośle króliki rasy mieszanej o masie ciała 2,0-2,5 kg były usypiane poprzez przedawkowanie środka usypiającego (Vetbutal; pentobarbital, 100mg/kg, i.v.) podawanego do żyły brzeżnej usznej. Pobierano odcinek piersiowy aorty, oczyszczano z otaczającej tkanki łącznej a następnie dzielono na cztery pierścienie szerokości około 4 mm. Pierścienie były umieszczane w 5mL naczyniach do narządów izolowanych wypełnionych płynem Krebsa-Henseleita zawierającym milimolowe stężenia następujących soli rozpuszczonych w podwójnie destylowanej wodzie: 118 NaCl; 4.7 KCl; 1.9 CaCl₂ x 2H₂O; 0.6 MgSO₄ x 7 H₂O; 1.2 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 6 glukoza; 2 kwas pirogronowy. Podczas całego eksperymentu utrzymywano temperaturę roztworu na poziomie 37⁰C oraz napowietrzanie mieszaniną gazów,(95% O₂ + 5% CO₂) co umożliwiało otrzymanie fizjologicznego pH 7,4. Siłę skurczu aorty mierzono przy pomocy przetwornika izometrycznego połączonego z czterokanałowym rejestratorem liniowym I 6514-II (Linseis, GmBH, Selb, Germany).

Trzy z pierścieni poddawane były inkubacji z reagentami. Czwarty pierścień zawsze otrzymywał tylko odpowiednie ilości rozpuszczalnika (wody), aby wyeliminować zmiany kurczliwości zależne od czasu. Skurcz maksymalny tego pierścienia w odpowiedzi na agonistę uznano za 100% i służył za kontrolę. Pierwszym etapem była konstrukcja krzywych stężenie-efekt dla agonistów. Kolejne stężenie podawano dopiero w momencie, gdy poprzednie osiągnęło swój efekt maksymalny. Każdy pierścień aorty królika miał kontakt tylko z jednym wymiataczem, jednym

agonistą i ewentualnie z LPS, aby wyeliminować ryzyko zafałszowywania wyników przez desensytyzację.

W drugiej serii doświadczeń inkubacja z odpowiednim wymiataczem wolnych rodników trwała 0,5 godziny. W trzeciej serii eksperymentów przedłużono ją o 4 godziny kontaktu pierścieni z lipopolisacharydem. Po zakończonej inkubacji zawieszano pierścienie aorty pionowo przy użyciu haczyków ze stali nierdzewnej, ustawiano obciążenie wstępne na poziomie 3g a następnie poddawano preparat 1 godzinnej stabilizacji – ciągły przepływ zapewniała pompa perystaltyczna ppl-0.5 Zalimp („Zalimp” Warszawa, Poland). W rezultacie przeprowadzonych doświadczeń otrzymano trzy rodzaje krzywych zależności stężenie-efekt:

1/dla agonisty (kontrola)

2/dla agonisty w obecności wymiataczy wolnych rodników

3/dla agonisty w obecności wymiataczy wolnych rodników i lipopolisacharydu

Wzory strukturalne wybranych związków przedstawia Ryc.3.1.

- Zastosowano następujące odczynniki:

A/ agonisty

-fenylefryna (10^{-8} – 3×10^{-4} M)

Phenylephrini hydrochloridum; **(PE)** $C_9H_{13}NO_2 \times HCl$;

Chlorowodorek (R)-(-)-1-(3-Hydroksyfenylo)-2-metyloaminoetanolu; Mw 203,7

-norepinefryna (10^{-9} – 3×10^{-4} M)

Norepinephrini bitartas; **(NE)** $C_8H_{11}NO_3 \times C_4H_6O_6$;

Wodorowinian ([-]-Norepinefryny); Mw 319,3

-angiotensyna II (10^{-9} – 3×10^{-5} M)

Angiotensin II human; **(Ang II)** $C_{50}H_{71}N_{13}O_{12} \times XH_2O$

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe; Mw 1046

B/ wymiatacze wolnych rodników

- tiron (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M)

Sól disodowa kwasu 4,5 dihydroksy-1,3-benzenodisulfonowego; **TIRON**;
 $C_6H_4S_2O_8Na_2$; Mw 314,2

- tempol (10^{-4} M)

4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno 1-oksyl; **TEMPOL**

$C_9H_{18}NO_2$; Mw 172,2

-dysmutaza ponadtlenkowa [SOD](100U/mL)

Dysmutaza ponadtlenkowa; (**SOD**)

Mw ~32000; 2000-10000 U/mg;

1 U odpowiada ilości enzymu wystarczającej do zahamowania samoutlenianiu pirogalolu w 50% przy pH 8,2 i w 25°C

-3-metylo-1,2-cyklopentanodion [MCP] (10^{-4} M)

3-metylo-1,2-cyklopentanodion; (**MCP**) $C_6H_8O_2$;

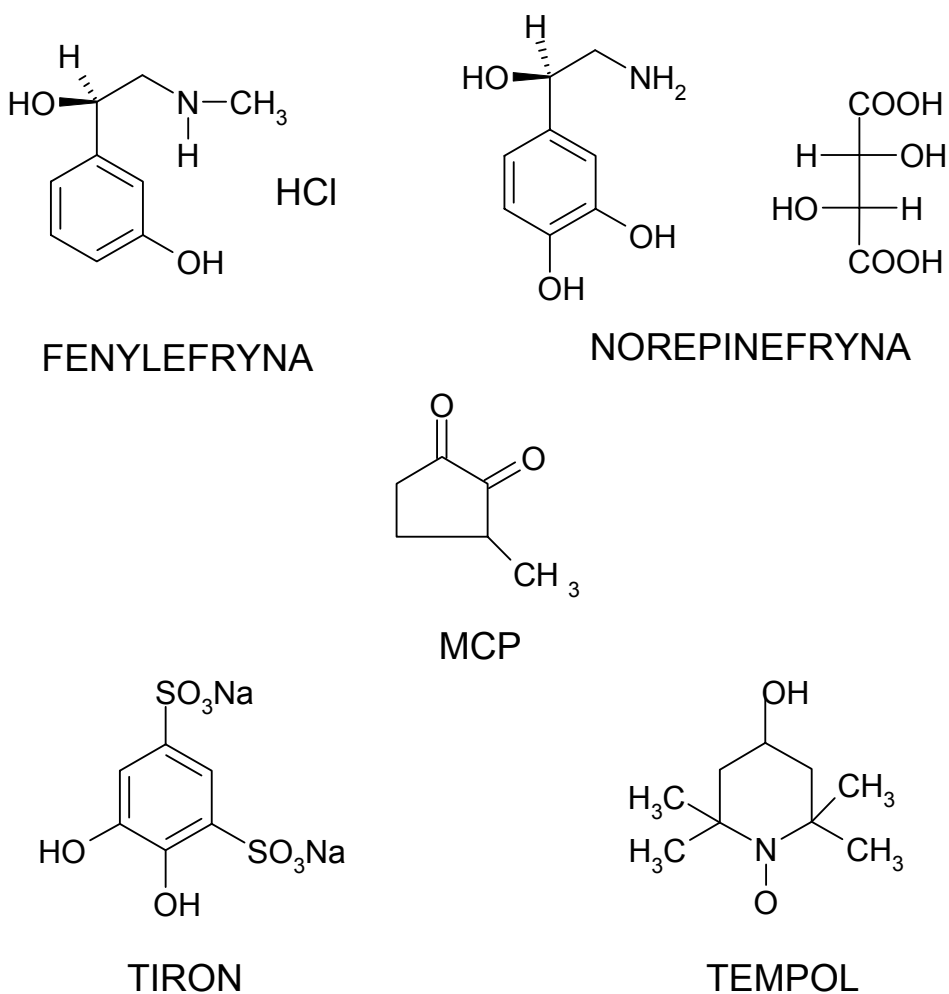
Mw 112,1; Rozpuszczalność w wodzie $\leq 0,2\%$

C/ lipopolisacharyd [LPS](10 μ g/mL)

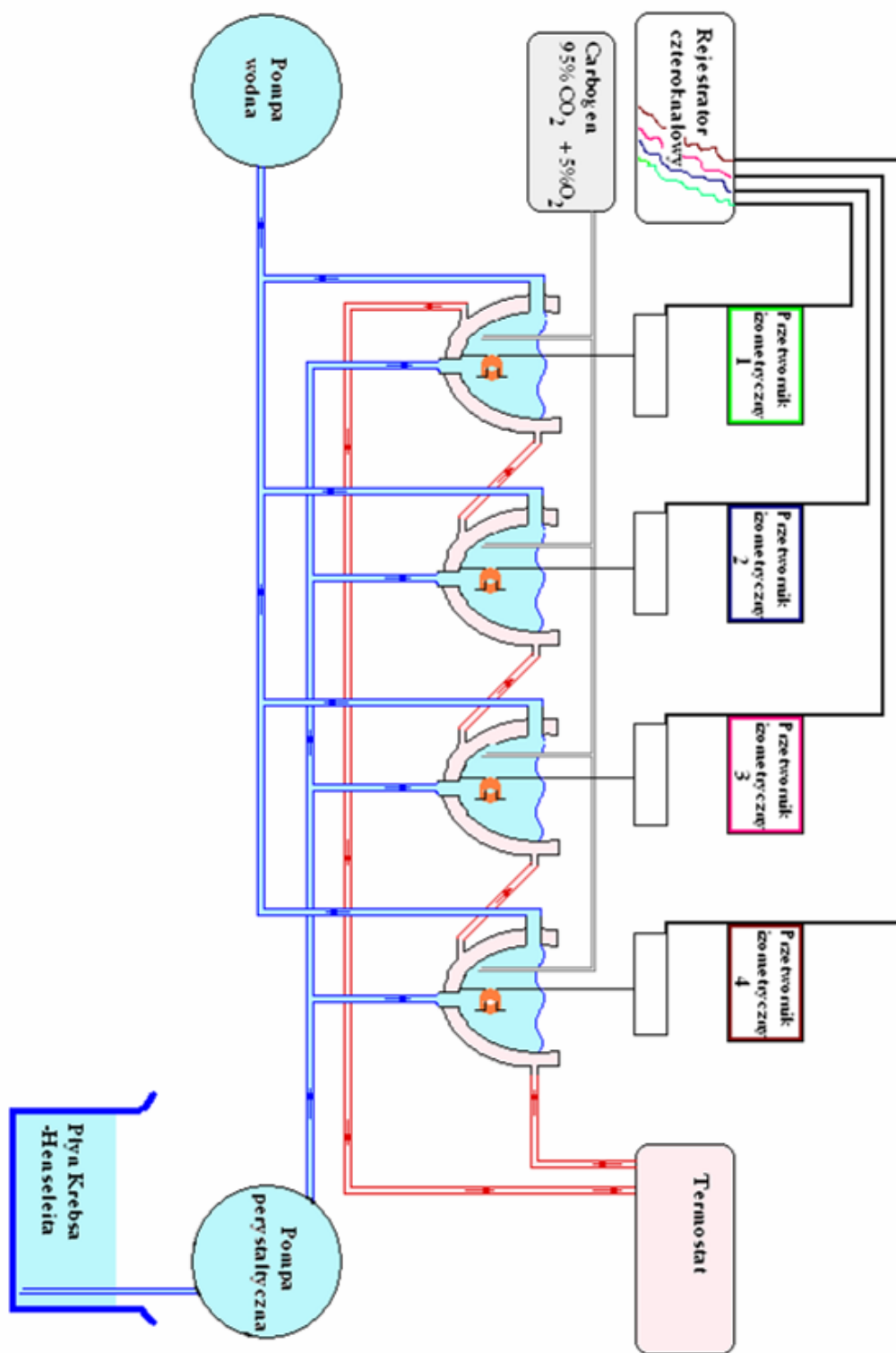
Sole niezbędne do sporządzenia roztworu Krebsa-Henseleit'a zakupiono w P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne (Gliwice, Poland). Fenylefryna, norepinefryna, angiotensyna II, Tiron, dysmutaza ponadtlenkowa i LPS pochodzą z Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). MCP i Tempol zakupiono od Fluka Chemie AG CH-9471 Buchs.

Statystyka

Maksymalną odpowiedź na agonistę pierścienia inkubowanego bez wymiatacza uznano za 100% i służyła jako kontrola. Każda eksperymentalna grupa składała się z sześciu do piętnastu pierścieni pobranych z różnych królików. Rezultaty wyrażono jako średnia±s.e.m.. Statystyczną istotność określono za pomocą standardowych procedur ANOVA i ustalono na poziomie $p < 0,05$.



Ryc.3.1 Wzory strukturalne agonistów i wymiataczy RFT użytych w niniejszej pracy.



Ryc.3.2 Schemat aparatury.

4. Wyniki

Modulacja kurczliwości mięśniówki wymiataczami

Pierwszym etapem pracy było sprawdzenie czy związki o charakterze wymiataczy wolnych rodników mają zdolność modulacji skurczy mięśniówki gładkiej naczyń. Odpowiedź na tak postawione pytanie jest twierdząca aczkolwiek obserwowane zmiany dotyczyły tylko Emax bez wpływu na EC₅₀ (Tabele 4.1, 4.2, 4.3). Efekt polegający na zmniejszeniu, zwiększeniu lub bez wpływu na odpowiedź skurczową pierścienia zależał zarówno od zastosowanego agonisty, wymiatacza, a nawet - w przypadku Tironu - od zastosowanego stężenia.

W przypadku skurczy pierścieni aorty królika indukowanych fenylefryną Tiron, SOD i MCP zmniejszyły maksymalną odpowiedź (Tiron+PE 79±3,33%; SOD+PE 95±2,56%; MCP+PE 91±2,94%) a Tempol nasilił ją (Tempol+PE 117±7,78%) (Tabela 4.1). Jeśli czynnikiem indukującym skurcz była norepinefryna to Tempol i SOD nasilały efekt maksymalny (Tempol+NE 115±7,64%; SOD+NE 111±5,27%), MCP zmniejszał (MCP+NE 92±3,19%) a efekt Tironu zależał od zastosowanego stężenia (Tiron[10⁻³]+NE 128±6,09%; Tiron[10⁻⁴]+NE 104±4,69%; Tiron[10⁻⁵] 92±2,39%). Najwyższe zastosowane stężenie [10⁻³] nasiliło, średnie było bez wpływu, a najmniejsze [10⁻⁵] zmniejszyło efekt maksymalny (Tabela 4.2). Podczas wywoływania skurczy angiotensyną II zanotowano brak wpływu modulującego MCP i SOD (MCP+AngII 105±4,99%; SOD+AngII 103±5,17%) oraz nasilenie efektu maksymalnego przez Tiron i Tempol (Tiron+AngII 125±6,32%; Tempol+AngII 111±5,65%) (Tabela 4.3).

Hyporeaktywność indukowana przez LPS

Drugim etapem pracy było ustalenie procedury pozwalającej osiągnąć hyporeaktywność naczyń w odpowiedzi na kontakt z endotoksyną bakteryjną. Cztero

godzinna inkubacja z LPS wywołała około dwudziesto procentowe zmniejszenie reaktywności. Uznając maksymalny skurcz pierścienia kontrolnego po 4 godz. za 100% uzyskano następujące wyniki prezentowane jako Emax w procentach \pm SEM (PE $78\pm 1,82\%$; NE $82\pm 3,31\%$; AngII $81\pm 1,8\%$). Wyniki uzyskane dla poszczególnych agonistów nie różniły się między sobą w sposób statystycznie znamienne (Tabele 4.4, 4.5, 4.6).

Wymiatacze a indukowana przez LPS hyporeaktywność

Celem trzeciego etapu pracy było ustalenie czy wymiatacze wolnych rodników zapobiegą hyporeaktywności będącej konsekwencją kontaktu naczyń z endotoksyną bakteryjną. Tempol, SOD i MCP skutecznie zapobiegły hyporeaktywności przy skurczach wywoływanych każdym z agonistów (Tabele 4.4, 4.5, 4.6). Wyjątkiem okazał się Tiron, który zapobiegł wprawdzie zmniejszonej reaktywności mięśniówki przy skurczach wywoływanych fenylefryną i angiotensyną II natomiast był zupełnie nieskuteczny w przypadku skurczy wywoływanych norepinefryną (Tiron+LPS+NE $77\pm 5,25\%$). W porównaniu do wyników uzyskanych dla pierścieni poddanych tylko kontaktowi z endotoksyną a obkurczanych norepinefryną uzyskano dalsze zmniejszenie reaktywności, aczkolwiek nie było już ono statystycznie istotne (LPS+NE $82\pm 3,31\%$). Drugim, wyróżniającym się w odniesieniu do norepinefryny zmiataczem okazał się MCP. O ile sam MCP zmniejszał kurczliwość (MCP+NE $92\pm 3,19\%$) o tyle zastosowanie MCP przed inkubacją z LPS doprowadziło nie tylko do zapobieżenia hyporeaktywności, ale wręcz nasiliło skurcz naczyń (MCP+LPS+NE $119\pm 3,58\%$) (Tabela 4.5).

Przebieg krzywych zależności stężenie-efekt w warunkach kontrolnych oraz w obecności wymiataczy wolnych rodników oraz LPS przedstawiono na rycinach 4.1-4.12.

Tabela 4.1 Wpływ wymiataczy reaktywnych form tlenu na skurcz aorty wywołany fenylefryną. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM dla N doświadczeń w poszczególnych grupach (* $p < 0,05$)

	N	E _{max} [%] \pm SEM	EC ₅₀ [M/L]	LogEC ₅₀ \pm SEM
PE	15	100 \pm 0	5,43 x 10 ⁻⁷	-6,26 \pm 0,15
Tiron [10 ⁻³]+PE	8	79* \pm 3,33	2,48 x 10 ⁻⁶	-5,60 \pm 0,13
Tiron [10 ⁻⁴]+PE	9	75* \pm 4,51	3,39 x 10 ⁻⁶	-5,47 \pm 0,13
Tempol[10 ⁻⁴]+PE	8	117* \pm 7,78	3,88 x 10 ⁻⁷	-6,41 \pm 0,09
MCP[10 ⁻⁴]+PE	8	91* \pm 2,94	1,04 x 10 ⁻⁶	-5,98 \pm 0,13
SOD[100U/ml]+PE	9	95* \pm 2,56	8,37 x 10 ⁻⁷	-6,08 \pm 0,13

Tabela 4.2 Wpływ wymiataczy reaktywnych form tlenu na skurcz aorty wywołany norepinefryną. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM dla N doświadczeń w poszczególnych grupach (* $p < 0,05$)

	N	E _{max} [%] \pm SEM	EC ₅₀ [M/L]	LogEC ₅₀ \pm SEM
NE	15	100 \pm 0	1,56 x 10 ⁻⁷	-6,91 \pm 0,14
Tiron[10 ⁻³]+NE	6	92* \pm 2,39	7,28 x 10 ⁻⁷	-6,14 \pm 0,09
Tiron[10 ⁻⁴]+NE	9	104 \pm 4,69	3,86 x 10 ⁻⁷	-6,41 \pm 0,09
Tiron[10 ⁻³]+NE	9	128* \pm 6,09	4,47 x 10 ⁻⁸	-7,35 \pm 0,16
Tempol[10 ⁻⁴]+NE	6	115* \pm 7,64	1,09 x 10 ⁻⁷	-6,96 \pm 0,16
MCP[10 ⁻⁴]+NE	8	92* \pm 3,19	5,33 x 10 ⁻⁷	-6,27 \pm 0,09
SOD[100U/ml]+NE	8	111* \pm 5,27	1,5 x 10 ⁻⁷	-6,82 \pm 0,11

Tabela 4.3 Wpływ wymiataczy reaktywnych form tlenu na skurcz aorty wywołany angiotensyną II. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM dla N doświadczeń w poszczególnych grupach (* $p < 0,05$)

	N	E _{max} [%] \pm SEM	EC ₅₀ [M/L]	LogEC ₅₀ \pm SEM
AngII	12	100 \pm 0	2,33 x 10 ⁻⁹	-8,63 \pm 0,15
Tiron[10 ⁻³]+AngII	9	125* \pm 6,32	7,07 x 10 ⁻¹⁰	-9,15 \pm 0,19
Tempol[10 ⁻⁴]+AngII	9	111* \pm 5,65	9,66 x 10 ⁻¹⁰	-9,02 \pm 0,26
MCP[10 ⁻⁴]+AngII	9	105 \pm 4,99	8,79 x 10 ⁻¹⁰	-9,06 \pm 0,27
SOD[100U/ml]+AngII	9	103 \pm 5,17	2,38 x 10 ⁻⁹	-8,62 \pm 0,14

Tabela 4.4 Wpływ wymiataczy reaktywnych form tlenu na indukowaną przez LPS hyporeaktywność izolowanej aorty. Agonista wywołujący skurcz-fenylefryna. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM dla N doświadczeń w poszczególnych grupach (* $p < 0,05$)

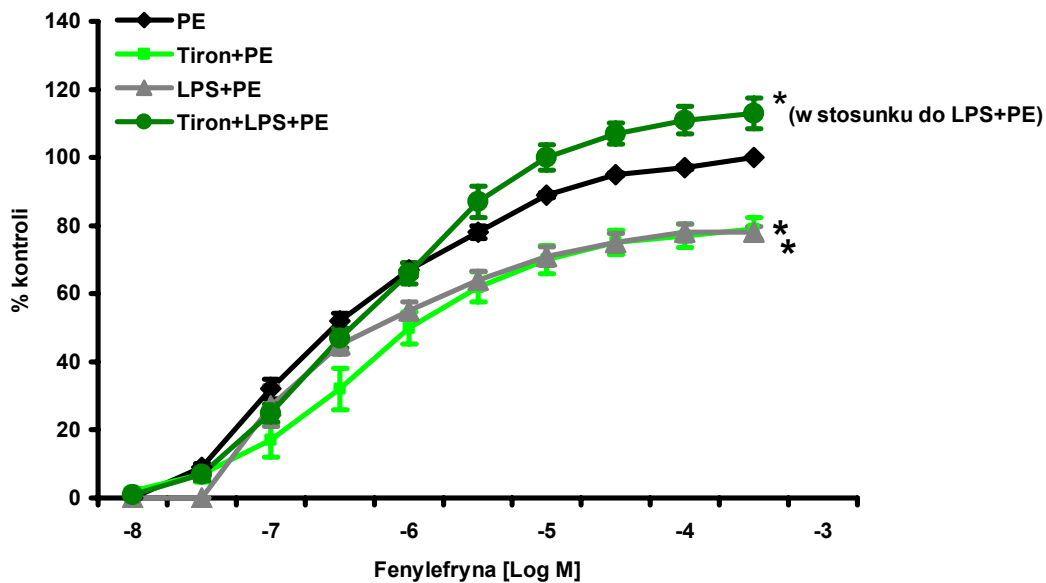
	N	Emax[%] \pm SEM	EC ₅₀ [M/L]	LogEC ₅₀ \pm SEM
PE	15	100 \pm 0	5,43x10 ⁻⁷	-6,26 \pm 0,15
(kontrola) LPS+PE	6	78\pm1,82	1,89x10 ⁻⁶	-5,72 \pm 0,17
Tiron[10 ⁻³]+LPS+PE	8	113* \pm 4,49	4,56x10 ⁻⁷	-6,34 \pm 0,12
Tempol[10 ⁻⁴]+LPS+PE	9	104* \pm 3,46	3,38x10 ⁻⁷	-6,47 \pm 0,15
MCP[10 ⁻⁴]+LPS+PE	6	100* \pm 2,85	5x10 ⁻⁷	-6,30 \pm 0,16
SOD[100U/ml]+LPS+PE	6	91* \pm 4,56	6,85x10 ⁻⁷	-6,16 \pm 0,18

Tabela 4.5 Wpływ wymiataczy reaktywnych form tlenu na indukowaną przez LPS hyporeaktywność izolowanej aorty. Agonista wywołujący skurcz-norepinefryna. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM dla N doświadczeń w poszczególnych grupach (* $p < 0,05$)

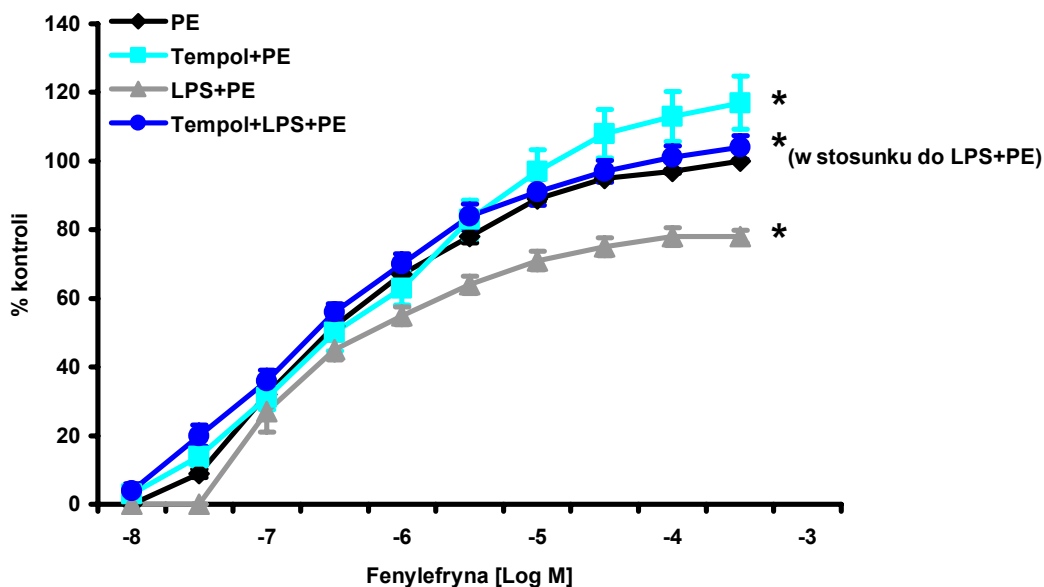
	N	Emax[%] \pm SEM	EC ₅₀ [M/L]	LogEC ₅₀ \pm SEM
NE	15	100 \pm 0	1,56 x10 ⁻⁷	-6,81 \pm 0,14
(kontrola) LPS+NE	6	82\pm3,31	6,49 x10 ⁻⁷	-6,19 \pm 0,15
Tiron[10 ⁻³]+LPS+NE	7	77 \pm 5,25	2,37 x10 ⁻⁶	-5,63 \pm 0,15
Tempol[10 ⁻⁴]+LPS+NE	7	114* \pm 5,66	1,42 x10 ⁻⁷	-6,85 \pm 0,09
MCP[10 ⁻⁴]+LPS+NE	8	119* \pm 3,58	6,75 x10 ⁻⁸	-7,17 \pm 0,16
SOD[100U/ml]+LPS+NE	6	106* \pm 2,07	2,09 x10 ⁻⁷	-6,68 \pm 0,15

Tabela 4.6 Wpływ wymiataczy reaktywnych form tlenu na indukowaną przez LPS hyporeaktywność izolowanej aorty. Agonista wywołujący skurcz-angiotensyna II. Wyniki są wartościami średnimi \pm SEM dla N doświadczeń w poszczególnych grupach (* $p < 0,05$)

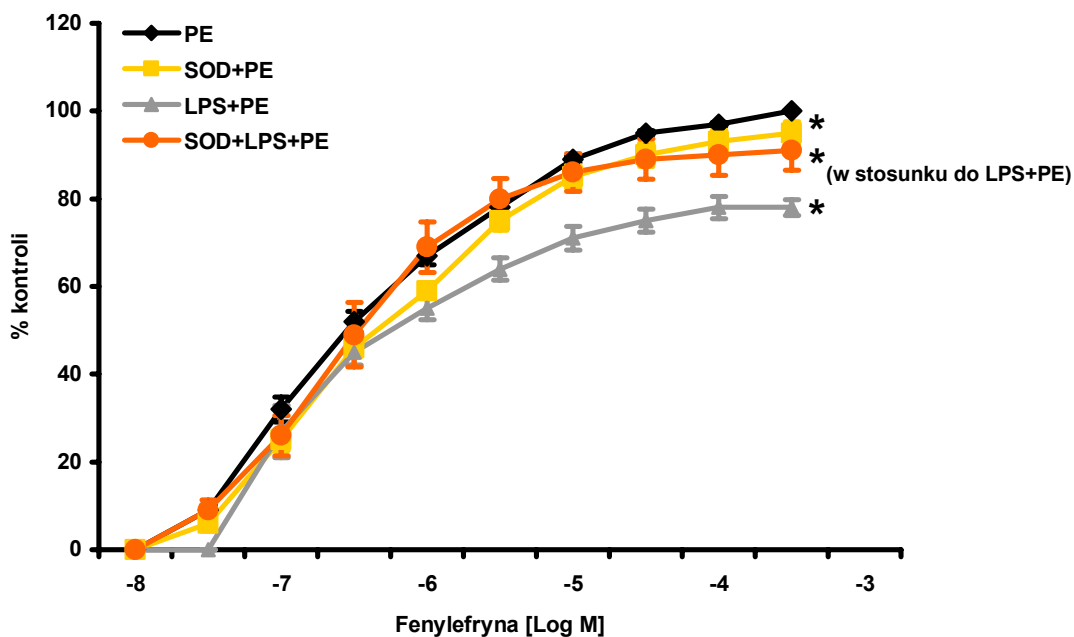
	N	Emax[%] \pm SEM	EC ₅₀ [M/L]	LogEC ₅₀ \pm SEM
AngII	12	100 \pm 0	1,33 x10 ⁻⁸	-7,87 \pm 0,16
(kontrola) LPS+AngII	6	81\pm1,8	6,26 x10 ⁻⁸	-7,21 \pm 0,12
Tiron[10 ⁻³]+LPS+AngII	8	109* \pm 6,13	1,56 x10 ⁻⁸	-7,81 \pm 0,14
Tempol[10 ⁻⁴]+LPS+AngII	6	96* \pm 1,59	1,29 x10 ⁻⁸	-7,89 \pm 0,18
MCP[10 ⁻⁴]+LPS+AngII	8	98* \pm 5,08	1,47 x10 ⁻⁸	-7,83 \pm 0,08
SOD[100U/ml]+LPS+AngII	6	110* \pm 2,84	9,36 x10 ⁻⁹	-8,03 \pm 0,17



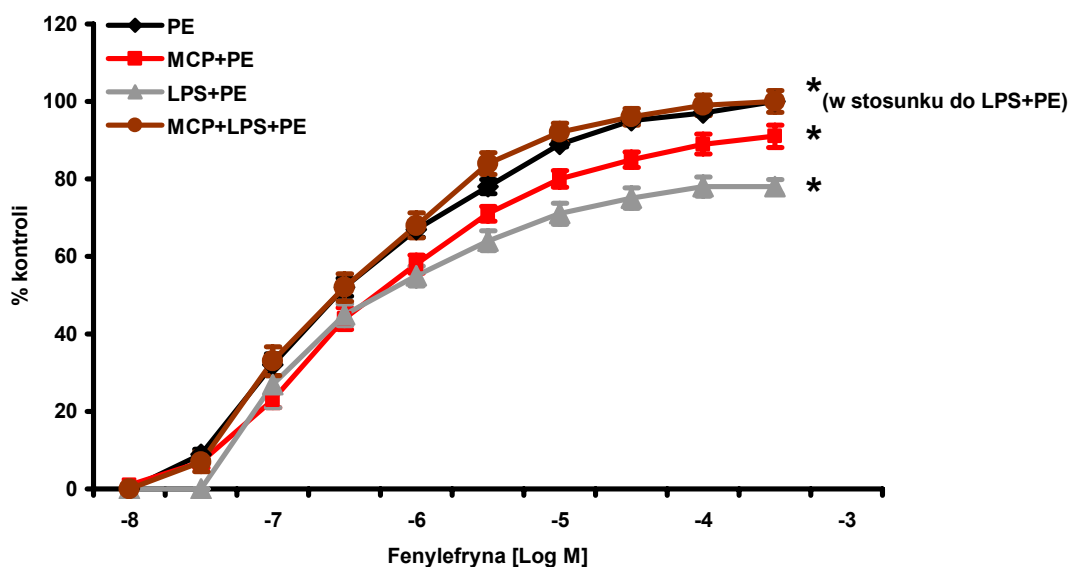
Ryc.4.1 Krzywe zależności stężenie-efekt dla fenylefryny (PE)(kontrola) oraz dla fenylefryny po wcześniejszej inkubacji z Tironem, z LPS, z Tironem i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



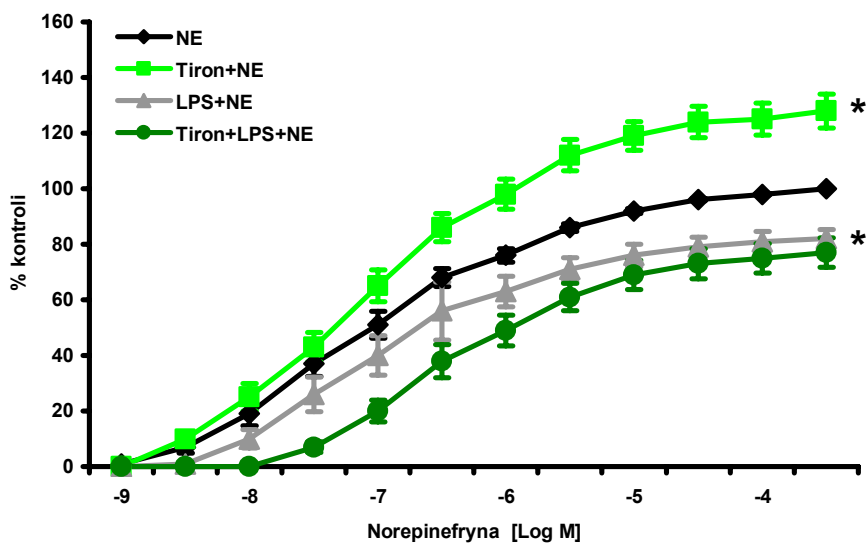
Ryc.4.2 Krzywe zależności stężenie-efekt dla fenylefryny (PE)(kontrola) oraz dla fenylefryny po wcześniejszej inkubacji z Tempolem, z LPS, z Tempolem i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia \pm S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



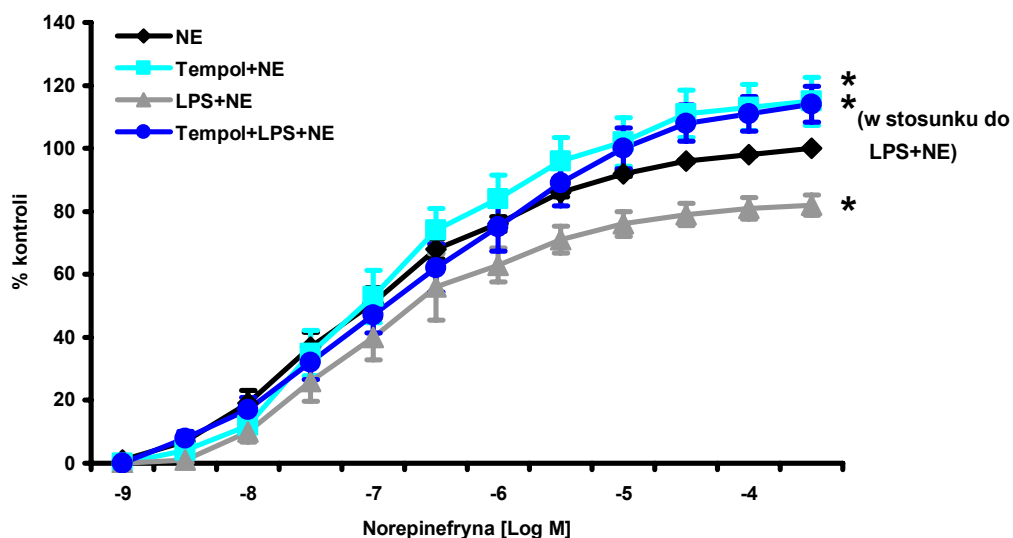
Ryc.4.3 Krzywe zależności stężenie-efekt dla fenylefryny (PE)(kontrola) oraz dla fenylefryny po wcześniejszej inkubacji z SOD, z LPS, z SOD i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



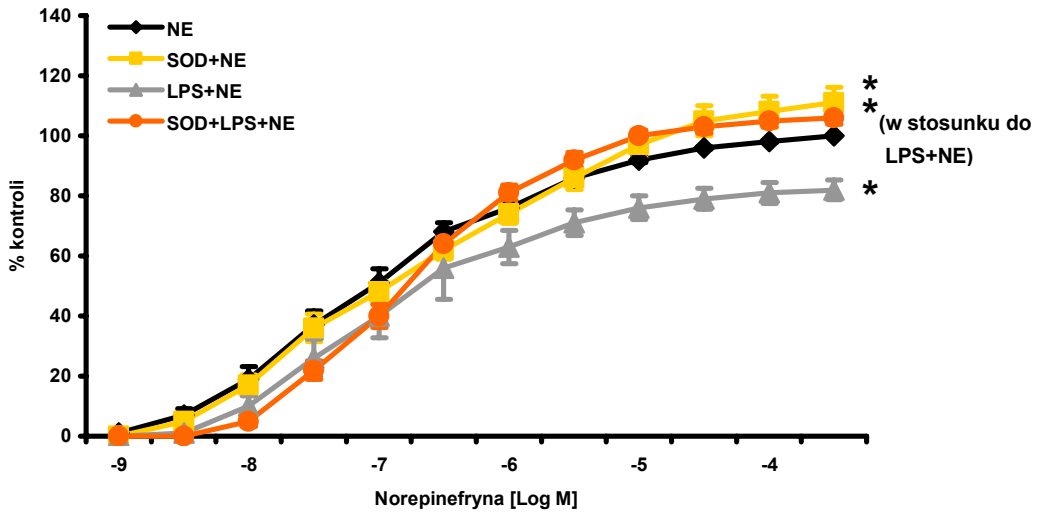
Ryc.4.4 Krzywe zależności stężenie-efekt dla fenylefryny (PE)(kontrola) oraz dla fenylefryny po wcześniejszej inkubacji z MCP, z LPS, z MCP i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



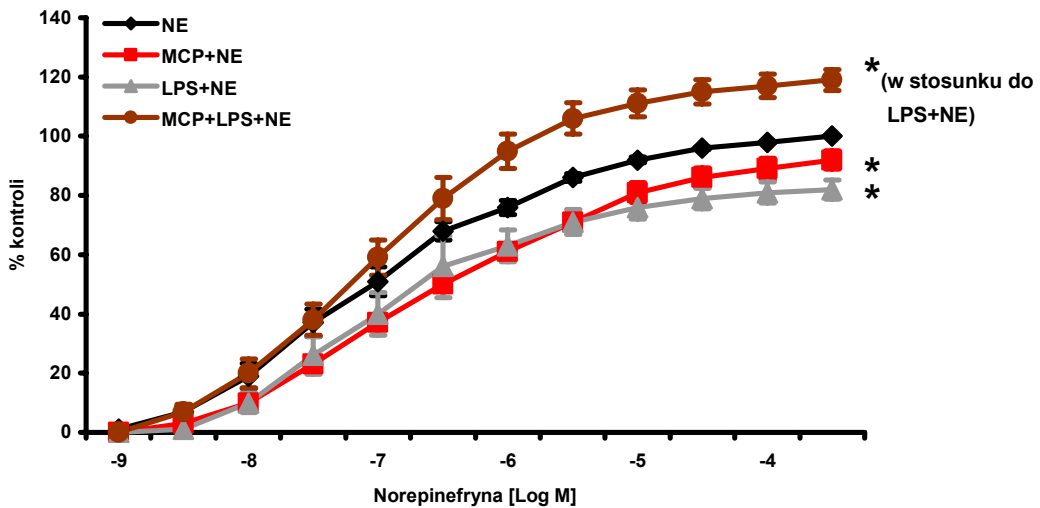
Ryc.4.5 Krzywe zależności stężenie-efekt dla norepinefryny (NE)(kontrola) oraz dla norepinefryny po wcześniejszej inkubacji z Tironem, z LPS, z Tironem i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



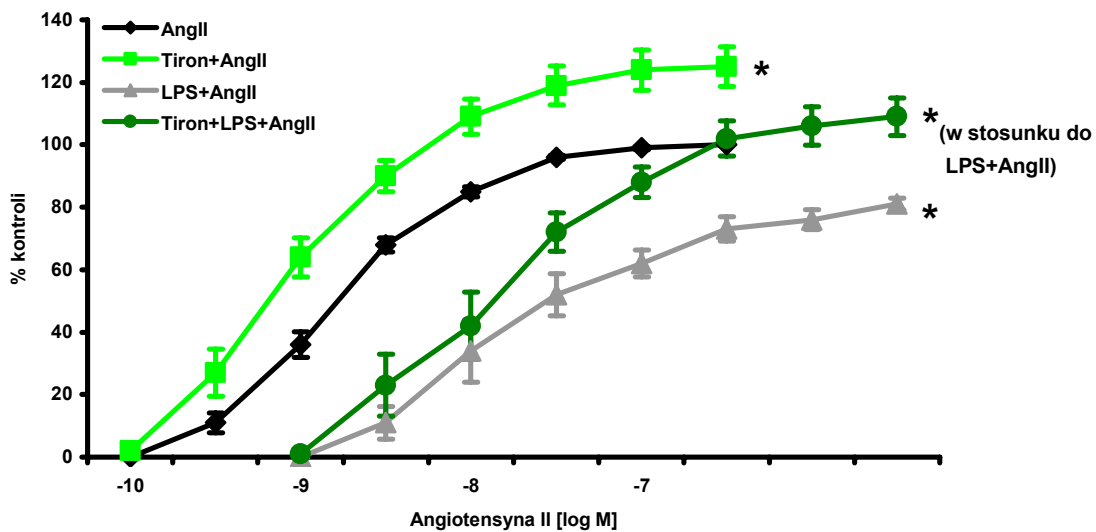
Ryc.4.6 Krzywe zależności stężenie-efekt dla norepinefryny (NE)(kontrola) oraz dla norepinefryny po wcześniejszej inkubacji z Tempolem, z LPS, z Tempolem i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



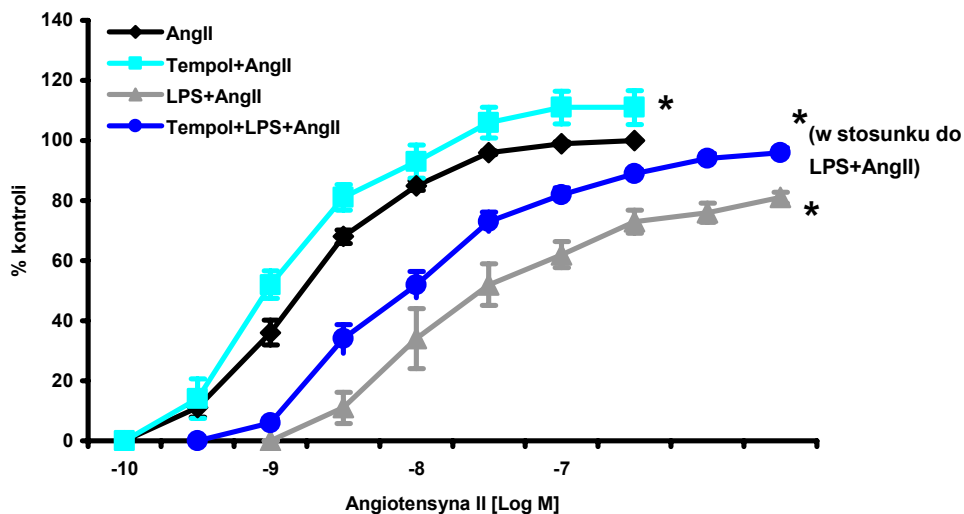
Ryc.4.7 Krzywe zależności stężenie-efekt dla norepinefryny (NE)(kontrola) oraz dla norepinefryny po wcześniejszej inkubacji z SOD, z LPS, z SOD i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



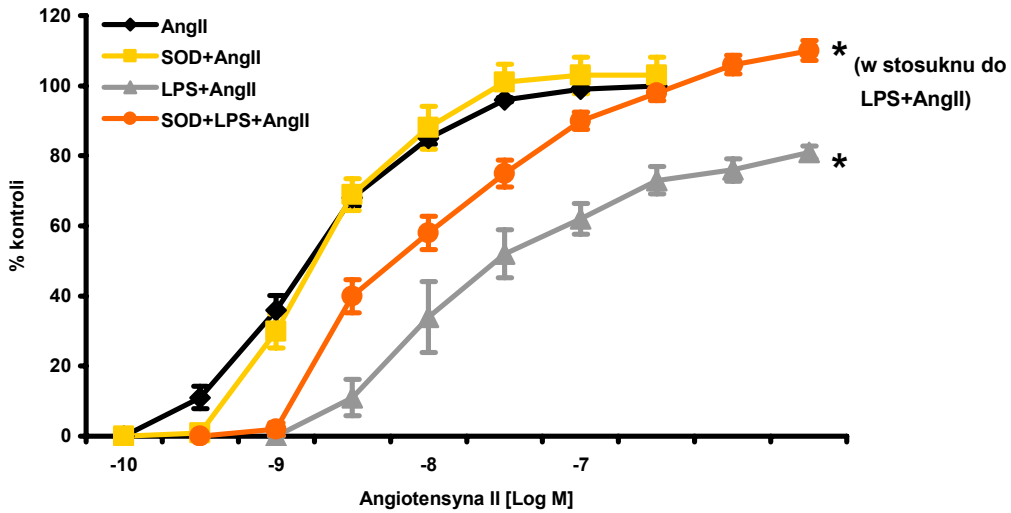
Ryc.4.8 Krzywe zależności stężenie-efekt dla norepinefryny (NE)(kontrola) oraz dla norepinefryny po wcześniejszej inkubacji z MCP, z LPS, z MCP i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-15.



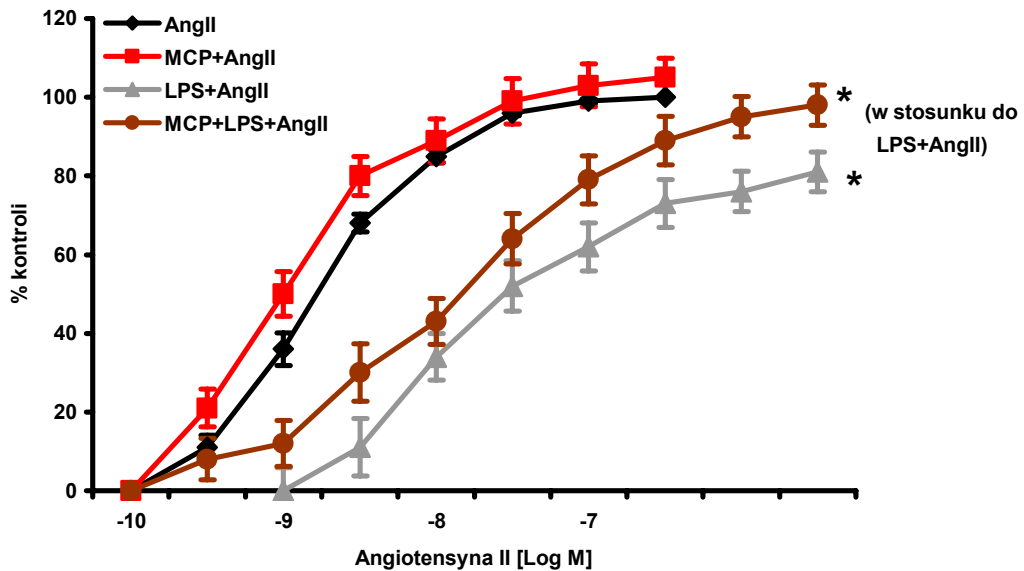
Ryc.4.9 Krzywe zależności stężenie-efekt dla angiotensyny II (AngII)(kontrola) oraz dla angiotensyny II po wcześniejszej inkubacji z Tironem, z LPS, z Tironem i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-12.



Ryc.4.10 Krzywe zależności stężenie-efekt dla angiotensyny II (AngII)(kontrola) oraz dla fenylefryny po wcześniejszej inkubacji z Tempolem, z LPS, z Tempolem i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-12.



Ryc.4.11 Krzywe zależności stężenie-efekt dla angiotensyny II (AngII)(kontrola) oraz dla angiotensyny po wcześniejszej inkubacji z SOD, z LPS, z SOD i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-12.



Ryc.4.12 Krzywe zależności stężenie-efekt dla angiotensyny II (AngII)(kontrola) oraz dla angiotensyny II po wcześniejszej inkubacji z MCP, z LPS, z MCP i z LPS. Wyniki przedstawione są jako procent skurczu; (średnia±S.E.M.) * $p < 0,05$ w stosunku do wartości kontrolnych. N=6-12.

5.Dyskusja

Reaktywne formy tlenu łącznie są z patogenezą wielu schorzeń, ale ich dokładne miejsce i rola (wtórny przekaźnik?) pozostają wciąż niedostatecznie wyjaśnione. Szczególnie intrygująca jest ich funkcja we wstrząsie septycznym. W związku z tym zasadniczym celem niniejszej pracy było określenie związku RFT z wynikającą z obecności LPS hyporeaktywnością naczyń. Szczególnie ważnym pytaniem było czy wymiatanie RFT tej hyporeaktywności przeciwdziało?

Wstrząs septyczny definiowany jest jako ciężka posocznica z opornym na przetaczanie płynów spadkiem ciśnienia. Czynnikiem odpowiedzialnym za hyporeaktywność mięśniówki naczyń na działanie czynników presyjnych jest głównie endotoksyna bakteryjna – lipopolisacharyd. Wskazują na to badania przeprowadzone na zwierzętach *in vivo* – podanie dożylnie LPS wywołuje zmiany hemodynamiczne charakterystyczne dla wstrząsu septycznego, *in vitro* – na naczyniach izolowanych [1] oraz *ex vivo* – na naczyniach pobranych od zwierząt poddanych działaniu endotoksyny [57]. Podobne wyniki uzyskiwano podając endotoksynę zdrowym ochotnikom [44]. Powyższe obserwacje stanowiły podstawę wyboru LPS jako czynnika indukującego hyporeaktywność naczyń charakterystyczną dla wstrząsu septycznego.

Izolowana aorta królika jest preparatem farmakologicznym, który pomimo tego, że pierwszy raz został opisany już w 1953 r. nadal stanowi jedno z częściej stosowanych naczyń krwionośnych dla oceny takich czynników naczyniokurczących jak: katecholaminy, angiotensyny i inne. Pobudzenie znajdujących się tu między innymi receptorów alfa-adrenergicznych i AT-1 powoduje skurcz mięśni gładkich [10, 47].

Reaktywne formy tlenu w ciągu ostatniej dekady są licznymi pracami, aczkolwiek zwracają uwagę na rozbieżności w wynikach otrzymywanych przez różnych badaczy. Przykładem może być chociażby wpływ SOD na krzywą zależności stężenie-efekt dla

norepinefryny. Według jednych autorów SOD w stężeniu 200 U/ml nie modyfikuje skurczy tętnicy krezkowej szczura wywołanych przez norepinefrynę [18]. Inna grupa uzyskała przesunięcie krzywej zależności stężenia-efekt dla norepinefryny w prawo, gdy naczyniem badanym była aorta szczura a SOD zastosowano w stężeniach 10 – 100 U/ml [54]. Wyniki uzyskane dla SOD w niniejszej pracy zależą od zastosowanego agonisty. W przypadku norepinefryny zaobserwowano zwiększenie efektu maksymalnego. Wielokrotnie podkreśla się wpływ warunków eksperymentu (procedura, dobór agonisty i wymiatacza) na uzyskiwane wyniki.

Wybór PE, NE i AngII na agonistów wywołujących skurcz podyktowany był następującymi przesłankami: 1/ Fenylefryna jest jednym z najczęściej stosowanych „narzędzi farmakologicznych” ze względu na jej wybiórcze powinowactwo do receptora alfa1-adrenergicznego. 2/ Norepinefryna jest zarówno endogennym przekaźnikiem odpowiedzialnym za utrzymanie podstawowego napięcia naczyń jak i lekiem stosowanym w celu podniesienia obniżonego ciśnienia tętniczego (np. w przebiegu wstrząsu). Według ostatnich doniesień jedna z RFT – nadtlenoazotyn – ma zdolność inaktywacji norepinefryny, co stanowić może kolejne źródło obserwowanych rozbieżności [52, 58]. 3/ Trzecim agonistą zastosowanym w badaniach była angiotensyna II, pierwotnie opisana jako związek silnie kurczący naczynia a obecnie uważana za wielofunkcyjny hormon. Oddziałuje ona na wiele komórkowych procesów ważnych dla regulacji funkcji naczyń obejmujących wzrost komórek, apoptozę, migrację, zapalenie i zwłóknienie. Narastający materiał dowodowy wskazuje, że plejotropowe efekty naczyniowe AngII indukuje poprzez zależne od NAD(P)H generowanie RFT [61].

Jedną z pierwszych kwestii do decyzji w toku ustalania procedury był wybór czasu inkubacji z LPS oraz zastosowanego stężenia. W badaniach na zdrowych ochotnikach poddanych działaniu endotoksyny zaobserwowano, że maksymalne zmiany hemodynamiczne obejmujące zmniejszoną reakcję ciśnienia tętniczego i akcję serca na działanie fenylefryny występuje po 4 h [44]. W modelach zwierzęcych *in vitro* stosowano inkubację od 1h nawet do 46h [1, 15, 16, 40, 57, 66]. Mając na uwadze mechanizm działania LPS (pobudzenie receptorów RLT4 i zmiana ekspresji genów) wydaje się zrozumiała rola czasu. Istotnie statystycznie obniżenie reaktywności naczyń było obserwowane po minimum 3h kontaktu naczyń z endotoksyną. Dłuższe, 4-6-18-20-46h, inkubacje skutkowały dalszym pogłębieniem hyporeaktywności przy zachowanej wrażliwości preparatów kontrolnych [40, 57, 66].

Bakteryjny lipopolisacharyd stosowany był w szerokim zakresie stężeń od 0,1µg/ml [57] poprzez 1, 10 aż do 100µg/ml [40,66]. Spodziewane rezultaty, pod postacią hyporeaktywności preparatów, uzyskiwano przy każdym z zastosowanych stężeń. Dodatkowe zastosowanie surowicy, źródło LBP (białko wiążące LPS ułatwiające pobudzenie receptora TLR4), do fizjologicznego roztworu soli zawierającego endotoksynę ułatwia uzyskanie hiporeaktywności, ale nie jest niezbędne [40, 42, 57].

Kolejną wymagającą decyzji kwestią było usunięcie lub zachowanie śródbłonka. Wyniki prac nad rolą śródbłonka w hyporeaktywności naczyń wskazują, że: 1) w warunkach kontrolnych śródbłonka vs jego brak powoduje przesunięcie krzywej zależności stężenie-efekt dla agonisty w prawo bez zmian efektu maksymalnego; 2) po inkubacji z LPS stopień hyporeaktywności był podobny niezależnie od tego czy śródbłonek był zachowany czy usunięty [1, 40]; 3) usunięcie śródbłonka powoduje, że pewna grupa wymiataczy wolnych rodników nie wywiera znaczącego wpływu na

skurcze wywoływane norepinefryną [54]. Reaktywne formy tlenu powstające w aorcie królika uwalniane są wprawdzie przez wszystkie trzy warstwy – śródbłonek, mięśniówkę i przydanek, ale główne źródło stanowi NAD(P)H-pochodny anionorodnik ponadtlenkowy z mięśniówki i przydanki. Mechaniczne usuwanie śródbłonka nie wpływa znacząco na poziom anionorodnika ponadtlenkowego [41].

Mając na uwadze powyżej przytoczone fakty zastosowano w niniejszej pracy, w modelu *in vitro*, 4. godzinną inkubację z endotoksyną w stężeniu 10 µg/ml przy zachowanym śródbłonku.

Wybór zastosowanych w niniejszej pracy wymiataczy podyktowany był następującymi ich właściwościami:

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) uważana jest obecnie za główny enzym odpowiedzialny za rozkład anionorodnika ponadtlenkowego powstającego u zdrowych osobników w wyniku normalnych procesów metabolicznych [37]. Stosowane stężenia wahały się od 10 aż do 1000 U/mL, przy czym najczęściej stosowanym stężeniem było 100-150-200 U/mL [18, 21, 54, 62].

Tempol i Tiron są najczęściej stosowanymi eksperymentalnie niebiałkowymi związkami chemicznymi naśladującymi działanie SOD. Są przechodzącymi przez błony biologiczne zmiataczami anionorodnika ponadtlenkowego. Tempol ingeruje nie tylko w efekty działania, ale także w tworzenie takich związków jak anionorodnik nadtlenkowy, rodnik hydroksylowy i nadtlenoazotyn. Dowody z badań przedklinicznych dowodzą, że Tempol może być użyteczny w terapii wstrząsu, zapalenia i urazu towarzyszącego reperfuzji po okresie niedokrwienia [37]. Zastosowane stężenie i czas inkubacji jest wynikiem wcześniejszych badań sprawdzających efektywność Tempolu w zakresie stężeń od 10^{-9} do 10^{-3} M wskazujących na optymalne stężenie 10^{-4} M przez 30min [51].

Tiron charakteryzuje się podobną do Tempolu aktywnością w zmiataniu wolnych rodników. Niedawne doniesienia podkreślające zdolność Tironu do wiązania Ca^{2+} w stężeniach równych, a nawet mniejszych, od tych stosowanych do zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego sugerują ostrożność w interpretowaniu wyników uzyskiwanych dla Tironu. Przemawiają także przeciwko ekstrapolowaniu wyników uzyskiwanych dla Tironu na inne związki o charakterze wymiataczy [12]. Stosowane w piśmiennictwie stężenia Tironu wahały się od 10^{-5} do 10^{-2} M [7, 20, 62, 68].

MCP (3-metylo-1,2-cyklopentanedion) jest związkiem otrzymywanym z ekstraktu z kawy, który selektywnie rozkłada nadtlendioazotyn i efektywnie chroni enzym komórkowy, reduktazę GSH, przed uszkadzającym działaniem tego silnego nierodnikowego utleniacza. MCP znosi inaktywację reduktazy GSH przez nadtlendioazotyn poprzez hamowanie tworzenia nitrotyrozyny. MCP był najefektywniejszy w stężeniu 10^{-4} M [23].

Podstawowym pytaniem nasuwającym się po stwierdzeniu hyporeaktywności mięśniówki gładkiej naczyń na działanie środków wazokonstrykcyjnych jest, dlaczego tak się dzieje? Odpowiedź niestety nie jest ani prosta ani jednoznaczna. Pierwsze próby wyjaśnienia zmniejszonej wrażliwości naczyń wskazywały na zwiększoną syntezę tlenu azotu. Przykładem potwierdzającym słuszność tej koncepcji jest między innymi badanie przeprowadzone na pacjentach z objawami wstrząsu septycznego polegające na oznaczaniu azotanów, azotynów i endotoksyny równoległe z kontrolą parametrów hemodynamicznych. Stwierdzono podwyższenie osoczowych poziomów azotanów i azotynów korelujące z podwyższeniem poziomu endotoksyny [13]. Jedynym znanym źródłem azotanów i azotynów produkowanych w tkankach ssaków jest szlak metaboliczny przekształcający L-argininę do tlenu azotu [35].

Kolejnym podejściem było oznaczanie metodami immunologicznymi ekspresji indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS). W jednej z prac oznaczano ekspresję iNOS w małych tętnicach sieciowych pobieranych w czasie laparoskopii od pacjentów we wstrząsie septycznym. Zwiększona ekspresja iNOS odpowiadała zwiększonej produkcji NO. Zastosowanie inhibitora iNOS, estru metylowego N^G-nitro-L-argininy (L-NAME), nasiliło skurcz naczyń indukowany norepinefryną [56].

Następne badania zaczęły wskazywać na rolę wolnych rodników w utrzymaniu prawidłowego napięcia naczyń oraz na interakcje pomiędzy śródbłonkowym tlenkiem azotu a RFT generowanymi w czasie skurczy pierścieni aorty szczura [54]. W tym też czasie pojawiły się prace koncentrujące się na chemicznym aspekcie reakcji, którym podlegają reaktywne formy tlenu a w szczególności anionorodnik ponadtlenkowy, NO i nadtlenoazotyn. Reakcja tlenku azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym, ograniczana tylko szybkością dyfuzji ($6,7 \times 10^9$ m/s), prowadzi do powstania nadtlenoazotynu – związku o silnych własnościach utleniających [24, 53].

Jednym z pierwszych zwiastunów zmiany koncepcji hyporeaktywności było badanie przeprowadzone na zdrowych ochotnikach podczas eksperymentalnie wywołanej endotoksemii. Pomimo stwierdzenia charakterystycznych dla endotoksemii zmian hemodynamicznych i zmniejszonej reaktywności na presyjne działanie NE i PE nie wykazano zwiększenia ilości tak mRNA jak i samego białka iNOS. Jedną z rozważanych przez autorów hipotez tłumaczących zmniejszoną reaktywność naczyń we wstrząsie był rozkład katecholamin przez wolne rodniki [44]. Wśród innych sugestii znalazła się ingerencja LPS w aktywność kanałów jonowych oraz internalizacja naczyniowych alfa-adrenoreceptorów [44] oraz koncepcja zaburzonego przekazywania pomiędzy alfa-adrenoceptorem a kanałem wapniowym [15, 16].

Przyczynkiem do przeprowadzenia następującej pracy było odkrycie, że nadtlenoazotyn reaguje z norepinefryną przekształcając ją w utlenione pochodne. Badaniu podlegała aktywność wazokonstrykcyjna, poddanej działaniu nadtlenoazotynu, norepinefryny *in vitro* oraz *in vivo*. Aplikacja preinkubowanej z nadtlenoazotynem norepinefryny w celu wywołania skurczy izolowanych pierścieni aorty szczura przyniosła zmniejszenie reakcji naczynia w sposób zależny od zastosowanego stężenia nadtlenoazotynu. Pomiar ciśnienia tętniczego u poddanych znieczuleni szczurów, którym wstrzyknięto dożylnie preinkubowaną z nadtlenoazotynem norepinefrynę nie wykazały znaczących zmian. Autorzy wysunęli wniosek, że utlenienie i dezaktywacja norepinefryny przez nadtlenoazotyn może być, przynajmniej częściowo, odpowiedzialne za hyporeaktywność naczyń we wstrząsie septycznym [58].

Uzupełniających dowodów dostarczyła praca badająca wpływ donorów tlenu azotu i donorów nadtlenoazotynu na działanie kurczące i stężenie norepinefryny. Autorzy dowiedli, że tylko nadtlenoazotyn a nie tlenek azotu odpowiada za rozkład norepinefryny [52].

Pierwszym etapem ustalania związku reaktywnych form tlenu z hyporeaktywnością izolowanej aorty w obecności LPS było doprowadzenie do procedury pozwalającej tą hyporeaktywność zaobserwować. Zastosowana procedura pozwoliła uzyskać około 20% zmniejszenie reaktywności aorty na działanie wszystkich trzech użytych agonistów PE, NE i AngII. Najlepiej udokumentowaną przyczyną powyższego zjawiska jest zwiększona synteza tlenu azotu (EDRF) będąca rezultatem zwiększonej ekspresji indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) (Ryc.1.6). Dowodzą tego zarówno badania polegające na oznaczaniu ilości białka iNOS jak i na blokowaniu syntezy NO poprzez zastosowanie antagonistów np. L-NAME [54].

Model eksperymentu in vitro jest próbą naśladowania warunków panujących w naczyniach podczas wstrząsu septycznego. Stres oksydacyjny, stan charakterystyczny między innymi dla wstrząsu septycznego, polega również na zwiększonej syntezie pozostałych reaktywnych form tlenu jak anionorodnik ponadtlenkowy czy nadtlenoazotyn. Nadtlenoazotyn jest produktem reakcji łączenia tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym w stosunku 1:1.

Zmniejszenie dostępności NO, jednego z dwóch substratów reakcji prowadzącej do powstania nadtlenoazotynu, zapobiega hyporeaktywności naczyń będącej reakcją na kontakt z LPS. Podobny efekt miało wymiatanie drugiego z substratów, anionorodnika ponadtlenkowego, oraz produktu reakcji – nadtlenoazotynu. SOD i Tempol (wymiatacze anionorodnika ponadtlenkowego), oraz MCP (wymiatacz nadtlenoazotynu) zapobiegły hyporeaktywności naczyń przy skurczach wywoływanych PE, NE i AngII. Tiron (wymiatacz anionorodnika ponadtlenkowego) zapobiegł hyporeaktywności przy skurczach wywoływanych PE i AngII, natomiast przy skurczach wywoływanych NE okazał się całkowicie nieskuteczny. Doszło nawet do pogłębienia hyporeaktywności w porównaniu do wpływu samego LPS, ale zmiany te nie były istotne statystycznie (Tabela 4.5). Brak zdolności Tironu do odwracania hyporeaktywności pierścieni przy skurczach wywoływanych przez norepinefrynę można przypisać jego innym właściwościom, a w szczególności chelatowaniu wapnia [12].

Zaobserwowane zapobieganie hyporeaktywności poprzez wymiatanie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenoazotynu świadczy o tym, że zmniejszona reaktywność nie wynika z prostej przewagi (zwiększonej dostępności) tlenu azotu ile ze zmniejszenia stężenia substratu do syntezy nadtlenoazotynu. Głównym czynnikiem

upośledzającym kurczliwość jest, więc nie tlenek azotu, ale powstający z niego nadtlenoazotyn.

Wyniki uzyskane w eksperymentach badających modulujący wpływ wymiataczy na skurcz mięśniówki gładkiej naczyń charakteryzują się znacznie większą zmiennością. Brak LPS, jak również jakiegokolwiek innego czynnika mogącego stanowić przyczynę stresu oksydacyjnego sprawia, że obserwowane zmiany mogą być wynikiem aktualnego stanu redoks tkanek. Najlepszą ilustracją tego stwierdzenia są wyniki uzyskane dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Inkubacja pierścieni aorty królika z SOD doprowadziła do zmniejszenia reaktywności przy skurczach wywoływanych fenylefryną (Tabela 4.1). Wymiatanie anionorodnika ponadtlenkowego może powodować przewagę tlenu azotu a więc zmniejszenie efektu maksymalnego. Potwierdzeniem tej hipotezy w piśmiennictwie są rezultaty badań nad pierścieniami aorty szczura. SOD spowodował przesunięcie w prawo krzywej stężenie-efekt dla norepinefryny [54] i 5-hydroksytryptaminy [55]. Niestety, wyniki uzyskane w niniejszej pracy dla pozostałych agonistów nie przystają do tej teorii. SOD, w sposób statystycznie znamienne, nasilił skurcz wywołany norepinefryną (Tabela 4.2). Do wyjaśnienia tego zjawiska przydatne może być spostrzeżenie, że produktem dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego przez SOD jest nadtlenek wodoru [18] a nadtlenek wodoru w małym stężeniu może kurczyć aortę [69]. SOD nie wpłynął modulująco na skurcze wywoływane Angiotensyną II. Badania nad modyfikowanymi genetycznie myszami z zablokowanym genem dla ecSOD wskazują, że endogenny ecSOD jest głównym czynnikiem antagonizującym naczyniowy anionorodnik ponadtlenkowy. ecSOD współdziała w regulacji ciśnienia krwi oraz funkcji naczyń w modelu nadciśnienia zależnego od angiotensyny II. „Chroni” NO w drodze od komórek śródbłonna do komórek mięśniówki gładkiej naczyń. ecSOD występuje w takim

nadmiarze, że nawet w sytuacjach stresu oksydacyjnego nie występuje niedobór aktywności tego enzymu [20].

Tempol, niebiałkowy, przechodzący przez błony biologiczne mimetyk SOD, wzmocnił efekt maksymalny przy skurczach wywoływanych każdym z trzech agonistów. Jest to najprawdopodobniej efektem działania produktu dysmutacji – nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru wywołuje skurcze izolowanych pierścieni aorty szczura w sposób zależny od zastosowanego stężenia, którym można zapobiec poprzez zastosowanie katalazy [69].

Sposób modulowania skurczy pierścieni aorty królika w niniejszej pracy różnił się w zależności od zastosowanego stężenia Tironu i agonisty. Tiron w stężeniu 10^{-4} i 10^{-3} M zmniejszył efekt maksymalny przy skurczach wywoływanych fenylefryną (Tabela 4.1). Wytlumaczeniem może być bądź przewaga NO (rozłożony anionorodnik ponadtlenny), bądź wiązanie wapnia. Przy skurczach wywoływanych norepinefryną Tiron w stężeniu (10^{-5} M) zmniejszył efekt maksymalny. Efektem zastosowania wyższych stężeń było nasilenie E_{max} . Przy stężeniu Tironu 10^{-4} M, nie doszło do istotnego statystycznie, w porównaniu do wartości kontrolnych, modulowania efektu maksymalnego. Najwyższe stężenie (10^{-3} M) przyniosło, podobnie jak w przypadku Tempolu, nasilenie efektu maksymalnego (Tabela 4.2). Obserwowane rozbieżności są wypadkową kilku procesów. Przy niskich stężeniach Tironu przeważają procesy wiązania wapnia i zmiatania anionorodnika ponadtlennego z pozostawieniem względnego nadmiaru NO. Zwiększenie stężenia Tironu do 10^{-3} M spowodowało, że przeważał efekt działania produktu dysmutacji - nadtlenu wodoru, albo nasiloną kurczliwość była rezultatem braku rozkładania norepinefryny przez nadtlenoazotyn. Brak zmiany efektu maksymalnego przy stężeniu pośrednim (10^{-4} M) wynikał prawdopodobnie z równoważenia się obu procesów. Przy skurczach wywoływanych

angiotensyną II Tiron (10^{-3} M) doprowadził do nasilenia efektu maksymalnego podobnie jak w przypadku norepinefryny.

MCP było związkiem, który w najmniejszym stopniu modulował skurcze pierścieni aorty. Brak modulacji efektu maksymalnego przy skurczach indukowanych angiotensyną II odpowiadało zmniejszenie efektu maksymalnego przy skurczach indukowanych fenylefryną i norepinefryną.

Dodatkowym czynnikiem, który należy brać pod uwagę podczas analizowania wyników uzyskiwanych przy skurczach indukowanych angiotensyną II jest fakt, że angiotensyna II nasila zależną od NAD(P)H syntezę anionorodnika ponadtlenkowego, czyli substratu do tworzenia nadtlenoazotynu [35, 61].

Jeżeli, co wykazano w niniejszej pracy, wymiatacze wolnych rodników zapobiegły indukowanej przez LPS hyporeaktywności to nasuwa się pytanie, w jaki sposób RFT oddziałują na homeostazę naczyniową? Najbardziej oczywistym mechanizmem wywoływania dysfunkcji śródbłonna jest unieczynnianie tlenu azotu przez anionorodnik ponadtlenkowy. Nadtlenoazotyn w porównaniu do tlenu azotu jest znacznie słabszym aktywatorem cykazy guanylanowej. W rezultacie obserwowane jest upośledzenie mediowanej przez NO relaksacji. Drugim mechanizmem toksyczności nadtlenoazotynu jest zmiana aktywności innych układów enzymatycznych jak np.; nitracja grup tyrozynowych w syntazie prostacykliny prowadząca do inaktywacji tego enzymu. Kolejne szkodliwe działanie nadtlenoazotynu związane jest z jego silnymi właściwościami utleniającymi [50]. Nadtlenoazotyn utlenia tetrahydrobiopterynę, jest to kofaktor eNOS do syntezy NO. Skutkuje to rozprężeniem eNOS (*uncoupling*), w którym eNOS przełącza się z enzymu tworzącego NO na enzym tworzący anionorodnik ponadtlenkowy [25, 46].

Rodnik hydroksylowy, będący związkiem o dużej toksyczności, lecz ograniczonej mobilności, działa głównie w miejscu swojego powstawania. Substratem do jego tworzenia jest nadtlenek wodoru. Reakcja przebiega w obecności katalizujących jonów metalu (żelazo – reakcja Fentona). Sugeruje się, że rodnik hydroksylowy może zarówno kurczyć jak i rozkurczać izolowane tętnice a zależy to od rodzaju naczynia i od gatunku zwierzęcia. Zastosowanie układu generującego rodnik hydroksylowy (nadtlenek wodoru + Fe^{2+} =reakcja Fentona) na izolowane pierścienie aorty szczura udowodniło, że rodnik hydroksylowy sam, przy braku innych czynników kurczących, kurczy te pierścienie w sposób niezależny od śródbłonka oraz w sposób zależny od stężenia [30].

Podobnie niejednoznaczne wyniki można napotkać w pracach badających wpływ nadtlenu wodoru na kurczliwość izolowanych tętnic. Często podkreślany jest wpływ rodzaju naczynia i gatunku zwierzęcia. W aorcie, nadtlenek wodoru w stężeniach niskich powoduje skurcz w sposób niezależny od śródbłonka, natomiast w stężeniach wyższych powoduje rozkurcz w sposób zależny od śródbłonka. Endogenny, pochodzący z NAD(P)H oksydazy nadtlenek wodoru pośredniczy w zwiększonej syntezie tlenu azotu w komórkach śródbłonka [3, 18, 30, 31].

Czy wymiatanie anionorodnika ponadtlenkowego przez SOD i związki naśladujące działanie SOD (produktem reakcji jest nadtlenek wodoru) może nasilać toksyczność wolnych rodników w wyniku kumulacji powstającego nadtlenu wodoru oraz następnego w szlaku metabolicznym tlenu rodnika hydroksylowego? Nie wydaje się to prawdopodobne.

Nadtlenek wodoru sam z siebie nie jest wolnym rodnikiem, ale słabo aktywnym utleniaczem. Toksyczny jest powstający, w wyniku reakcji Fentona z $Fe(II)$ jako kofaktorem, rodnik hydroksylowy. Żelazo magazynowane jest jako $Fe(III)$, więc aby

reakcja Fentona mogła mieć miejsce musi zostać zredukowane do „wolnego”, rozpuszczalnego Fe(II). Najbardziej prawdopodobne jest, że reagentem odpowiedzialnym za „uzdatnianie” żelaza, stwarzającym warunki umożliwiające przebieg reakcji Fentona, jest reaktywny anionorodnik ponadtlenkowy a nie nadtlenek wodoru.

Anionorodnik ponadtlenkowy jest wolnym rodnikiem mającym zdolność inicjowania reakcji łańcuchowej. Celem, substratem, reakcji utleniania są takie biologiczne molekuly jak DNA, RNA, katecholaminy itp. Na każdym etapie, teoretycznie nieprzerywalnego, łańcucha reakcji produktem jest, co najmniej jedna cząsteczka nadtlenku wodoru. Dla porównania SOD z dwóch cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego i dwóch protonów tworzy jedną cząsteczkę nadtlenku wodoru i jedną cząsteczkę tlenu. Tak, więc dysmutacja anionorodnika ponadtlenkowego zmniejsza całkowity ładunek nadtlenku wodoru a nie zwiększa go.

Wreszcie nie ma przekonujących dowodów, że reakcja Fentona rzeczywiście zachodzi *in vivo* gdyż nie zidentyfikowano odpowiednich kompleksów żelaza [24, 37].

Na zakończenie wypada rozważyć perspektywy zastosowania terapeutycznego SOD i związków naśladujących jego działanie. Podjęte były już do tej pory liczne próby zastosowania klinicznego SOD. W badaniach tych zastosowano dysmutazę ponadtlenkową miedziowo-cynkową pochodzenia bydłowego. Uzyskano obiecujące rezultaty w schorzeniach przewlekłych związanych z zapaleniem (reumatoidalne zapalenie stawów i osteoarthritis) oraz w znoszeniu działań ubocznych towarzyszących radio- i chemioterapii. Głównym problemem, przyczyną ubocznych działań immunologicznych, było nie-ludzkie pochodzenie preparatu, co doprowadziło do zarzucenia badań.

Odpowiedzią na ten problem (ograniczenie) może być synteza związków niebiałkowych o małej masie cząsteczkowej, naśladujących działanie SOD. I rzeczywiście, dostępnych jest obecnie kilka klas związków różniących się między sobą budową chemiczną i selektywnością. Jeden z nowszych związków noszący symbol M 40403 (pochodna Mn (II) pentaazamakrocycliczna) z sukcesem ukończył badanie kliniczne I fazy badające bezpieczeństwo na zdrowych ochotnikach [37].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy mają przede wszystkim charakter poznawczy. Rzucają one nowe światło na rolę reaktywnych form tlenu we wstrząsie septycznym. Potwierdzają zdolność wymiataczy wolnych rodników do zapobiegania hyporeaktywności naczyń będącej rezultatem kontaktu z LPS oraz sugerują, że mimetyki SOD mogłyby być potencjalnie zastosowane w terapii nie tylko chorób przewlekłych jak np. reumatoidalne zapalenie stawów, ale także stanów ostrych, jakim jest wstrząs septyczny.

6.Wnioski

1. Wymiatacze reaktywnych form tlenu modulują skurcz pierścieni aorty w sposób zależny od zastosowanego wymiatacza oraz agonisty.
2. Podobny stopień hyporeaktywności naczyń po ich inkubacji z LPS niezależnie od zastosowanego agonisty.
3. Wymiatacze anionorodnika ponadtlenkowego SOD i Tempol oraz wymiatacz nadtlenoazotynu MCP zapobiegają wywołanej przez LPS hyporeaktywności pierścieni aorty przy wywoływaniu skurczy norepinefryną, fenylefryną i angiotensyną II.
4. Tiron, niebiałkowy mimetyk SOD, nie zapobiega wywołanej przez LPS hyporeaktywności pierścieni przy skurczach wywołanych norepinefryną.

7. Streszczenie

Celem niniejszej pracy było porównanie wpływu wymiataczy wolnych rodników na skurcz naczyń w warunkach podstawowych oraz z warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego obecnością LPS. Stres oksydacyjny rozumiany jako nadmierna, przekraczająca możliwości kompensacyjne organizmu, produkcja reaktywnych form tlenu, obecny jest we wstrząsie septycznym. Jedną z głównych cech charakteryzujących wstrząs septyczny jest także hyporeaktywność naczyń. Badanie, jaki wpływ ma wybór wymiatacza reaktywnych form tlenu i agonisty na skurcz naczyń pozwoliłoby lepiej zrozumieć rolę wolnych rodników we wstrząsie septycznym

Doświadczenia wykonano na pierścieniach odcinka piersiowego izolowanej aorty królika. Pierścienie były umieszczane w naczyniach do narządów izolowanych wypełnionych płynem Krebsa-Henseleita. Trzy z pierścieni poddawane były inkubacji z reagentami a czwarty zawsze otrzymywał tylko odpowiednie ilości rozpuszczalnika, aby wyeliminować zmiany kurczliwości zależne od czasu. Skurcz maksymalny tego pierścienia w odpowiedzi na agonistę uznano za 100% i służył za kontrolę. Do wywoływania skurczy naczyń zastosowano NE, PE i AngII. W celu wymiatania wolnych rodników zastosowano cztery związki: SOD, Tiron i Tempol (niebiałkowymi mimetykami SOD) do zmniejszenia stężenia anionorodnika ponadtlenkowego oraz MCP wykazujące powinowactwo do nadtlenoazotynu.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wymiatacze reaktywnych form tlenu modulują skurcz pierścieni aorty w sposób zależny od zastosowanego wymiatacza oraz agonisty. Czterogodzinna inkubacja z LPS wywołała około dwudziesto procentowe zmniejszenie reaktywności w skurczach wywoływanych każdym z agonistów. Podczas gdy SOD, Tempol oraz MCP zapobiegały wywoływanej przez LPS hyporeaktywności przy skurczach indukowanych NE, PE i AngII, to Tiron

okazał się nieskuteczny w zapobieganiu hyporeaktywności, gdy czynnikiem indukującym skurcz była NE.

Podsumowując wyniki niniejszej pracy można stwierdzić, że niebiałkowe związki naśladujące działanie SOD mogłyby stanowić jedną z opcji terapeutycznych w leczeniu schorzeń, którym towarzyszy nadmierna produkcja wolnych rodników i hyporeaktywność naczyń na działanie katecholamin np. wstrząsu septycznego.

8. Summary

The aim of his paper was to compare the influence of free radical scavengers on vascular smooth muscle contractions in non stimulated conditions and during the oxidative stress evoked by the presence of LPS. Oxidative stress, defined as exceeding host's compensatory mechanisms production of reactive oxygen species (ROS), accompanies septic shock and so vascular hyporeactivity does. Addressing the problem of the importance the choice of ROS scavenger and agonist have on vascular contraction would help to understand better the role of free radicals in septic shock.

Experiments were conducted on rabbit aortic rings. The rings were placed in organ chambers for isolated organs filled with physiologic Krebs-Henseleit solution. Three of the rings were subdued to incubation with reagents and the last one received only equivalent amounts of solvent to eliminate time-dependant changes in contractility. The maximal response of this ring was considered to be 100% and served as a control. NE, PE and AngII were used to evoke contractions. Four agents were applied for scavenging free radicals: SOD, Tiron and Tempol (non peptide SOD mimetics) for reducing superoxide's concentration and peroxynitrite scavenging MCP.

Obtained results are the basis for the following conclusions. ROS scavengers modulate aortic rings' contractions in a way dependant on applied scavenger and agonist. Four hour incubation with LPS resulted in an approximately twenty percent reduction in maximal effect for each of the agonists. SOD, Tempol and MCP prevented LPS-induced hyporeactivity for contractions evoked by NE, PE and AngII. Tiron proved to be ineffective in preventing vascular hyporeactivity if NE was the contracting agent.

Summarizing the results of this work, it can be stated, that non peptide SOD mimetics could become one of the therapeutical options for managing conditions

accompanied with free radical excess production and vascular hyporeactivity, like septic shock.

9. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AA – *arachidonic acid* - kwas arachidonowy

AngII – *angiotensin II* – angiotensyna II

ATP – *adenosine triphosphate* - adenozyntrifosforan

cGMP – *guanosine 3'-5' cyclic-monophosphate* - cykliczny guanozyno-3',5'-
monofosforan

COX – *cyclooxygenase* - cyklooksygenaza

ecSOD – *extracellular SOD* – zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa

EDRF – *endothelium-derived relaxing factor*

eNOS – *endothelial nitric oxide synthase* – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu

GSH – *glutathione* – glutation

H₂O₂ – *hydrogen peroxide* - nadtlenek wodoru

iNOS – *inducible nitric oxide synthase* – indukowalna syntaza tlenku azotu

IRAK – *interleukin-1 receptor-associated kinase* – kinaza związana z receptorem dla
interleukiny-1

K_{ATP} – *ATP-sensitive potassium channel* - kanał potasowy zależny od ATP

LBP – *LPS-binding protein* – białko wiążące LPS

L-NAME – *L-nitro-arginine methyl ester* – ester metylowy L-nitroargininy

LPS – *lipopolisaccharide* - lipopolisacharyd

MAPK – *mitogen-activated protein kinase* – kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MCP – 3-metylo-1,2-cyklopentanedion

mRNA - matrycowy kwas rybonukleinowy

NE – *norepinephrine* – norepinefryna

NFκB – *nuclear factor-κB* – czynnik jądrowy-κB

nNOS – *neuronal nitric oxide synthase* – neuronalna syntaza tlenku azotu

NO – *nitric oxide* – tlenek azotu

O₂^{•-} - *superoxide* – anionorodnik ponadtlenkowy

ONOO⁻ - *peroxynitrite* – nadtlenoazotyn

PE – *phenylephrine* - fenylefryna

PGI₂ – *prostacyclin* - prostacyklina

RFT – reaktywne formy tlenu

ROS – *reactive oxygen species*

sGC – *soluble guanylate cyclase* - rozpuszczalna cyklaza guanylanowa

SOD – *superoxide dismutase* – dysmutaza ponadtlenkowa

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

TNF α - *tumour necrosis factor* – czynnik nekrotyzujący guza

TRAF6 – *tumour necrosis factor receptor-associated factor* – czynnik związany z receptorem dla czynnika nekrotyzującego guza

TXA₂ - *thromboxan* - tromboksan

VSMC – *vascular smooth muscle cells* – komórki mięśni gładkich naczyń

XO – *xanthine oxidase* - oksydaza ksantynowa

10. Piśmiennictwo

1. Beasley D., Cohen R.A. i Levinsky N.G. (1990): Endotoxin inhibits contraction of vascular smooth muscle in vitro. *Am. J. Physiol.* **258**: H1187-H1192.
2. Bhattacharyya J., Biswas S. i Datta A.G. (2004): Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants. *Current Med Chem.* **11**: 359-368.
3. Cai H., Li Z., Dikalov S., Holland S.M., Hwang J., Jo H., Dudley S.C. i Harrison D.G. (2002): NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II. *J. Biol. Chem.* **277**: 48311-48317.
4. Cai H. i Harrison D.G. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res.* **87**: 840-844.
5. Cooke C.M. i Davidge S.T. (2003): Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc. Res.* **60**: 635-642.
6. Didion S.P. i Faraci F.M. (2003): Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles. *Stroke.* **34**: 2038-2042.
7. Didion S.P., Ryan M.J., Didion L.A., Fegan P.E., Sigmund C.D. i Faraci F.M. (2002): Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ. Res.* **91**: 938-944.
8. Drexler H. (1998): Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am. J. Cardiology* **82**: 3S-4S.

9. Fattman C.L., Schaefer L.M. i Oury T.D. (2003): Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 236-256.
10. Furchgott R.F. i Bhadrakom S. (1953): Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **108**: 129-43.
11. Ghiadoni L., Magagna A., Versari D., Kardasz I., Huang Y., Taddei S. i Salvetti A. (2003): Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension* **41**: 1281-1286.
12. Ghosh M., Wang H.D. i McNeill J.R. (2002): Tiron exerts effects unrelated to its role as a scavenger of superoxide anion: effects on calcium binding and vascular responses. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**:755-760.
13. Gómez-Jiménez J., Salgado A., Mourelle M., Martín M., Segura R., Peracaula R. i Moncada S. (1995): L-arginine: Nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit. Care Med.* **23**: 253-258.
14. Grandel U. i Grimminger F. (2003): Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Critical Reviews. in Immunology* **23**: 267-299.
15. Grześk G. i Szadujkis-Szadurski L. (2001): Pharmacometric analysis of α_1 -adrenoceptor function in rat tail artery pretreated with lipopolisaccharides. *Pol. J. Pharmacol.* **53**: 605-613.
16. Grześk G. i Szadujkis-Szadurski L. (2003): Physiological antagonism of angiotensin II and lipopolisaccharides in early endotoxemia: pharmacometric analysis. *Pol. J. Pharmacol.* **55**: 753-762.

17. Ippoushi K., Azuma K., Ito H., Horie H. i Higashio H. (2003): [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Sci.* **73**: 3427-3437.
18. Itoh T., Kajikuri J., Hattori T., Kusama N. i Yamamoto T. (2003): Involvement of H₂O₂ in superoxide-dismutase-induced enhancement of endothelium-dependent relaxation in rabbit mesenteric resistance artery. *Br. J. Pharmacol.* **139**: 444-456.
19. Jackson W.E. (2000): Ion channels and vascular tone. *Hypertension* **35**: 173-178.
20. Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R. i Brandes R.P. (2003): Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability. *Circ. Res.* **93**: 622-629.
21. Kawazoe T., Kosaka H., Yoneyama H. i Hata Y., (2000): Acute production of vascular superoxide by angiotensin II but not by catecholamines. *J. Hypertens.* **18**: 179-185.
22. Kerr S., Brosnan M.J., McIntyre M., Reid J.L., Dominiczak A.F. i Hamilton C.A. (1999): Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* **33**: 1353-1358.
23. Kim A.R., Zou Y., Kim .S., Choi J.S., Chang G.Y., Kim Y.J. i Chung H.Y. (2002): Selective peroxynitrite scavenging activity of 3-methyl-1,2-cyclopentanedione from coffee extract. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**: 1385-1392.

24. Koppenol W.H. (1998): The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **25**: 385-391.
25. Kuzkaya N., Weissmann N., Harrison D.G. i Dikalov S. (2003): Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols. *J. Biol. Chem.* **278**: 22546-22554.
26. Lahet J.J., Lenfant F., Couderot-Masuyer C., Ecartot-Laubriet E., Vergely C., Durnet-Archeray M.J., Freysz M. i Rochette L. (2003): In vivo and in vitro antioxidant properties of furosemide. *Life Sci.* **73**: 1075-1082.
27. Lancel S., Tissier S., Mordon S., Marechal X., Depontieu F., Scherpereel A., Chopin C. i Neviere R.(2004): Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J. Am. College of Cardiology*; **43**: 2348-2358.
28. Landry D.W., Levin H.R., Gallant E.M., Ashton R.C., Seo S., D'Alessandro D., Oz M.C. i Olivier J.A. (1997): Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation* **95**: 1122-1125.
29. Landry D.W. i Oliver J.A. (2001): The pathogenesis of vasodilatory shock.. *N. Engl. J. Med.* **345**: 588-596.
30. Li J., Li W., Liu W., Altura B.T. i Altura B.M. (2004): Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. *Eu. J. Pharmacol.* **499**: 171-178.
31. Lounsbury K.M., Hu Q. i Ziegelstein R.C. (2000): Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:1362-1369.

32. Marino P.L. (2001): Intensywna terapia. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław. Toksyczne działanie tlenu s:31-48.
33. Marino P.L. (2001): Intensywna terapia. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław. Zakażenie, zapalenie i niewydolność wielonarządowa s:510-516.
34. Mihm M.J., Wattanapitayakul S.K., Piao S., Hoyt D.G. i Bauer J.A. (2003): Effects of angiotensin II on vascular endothelial cells: formation of receptor-mediated reactive nitrogen species. *Bioch. Pharmacol.* **65**: 1189-1197.
35. Moncada S., Palmer R.M.J. i Higgs E.A. (1991): Nitric oxide: Physiology, patophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
36. Morales D., Madigan J., Cullinane S., Chen J., Heath M., Oz M., Olivier J.A. i Landry D.W. (1999): Reversal by vasopressin of intractable hypotension in the late phase of hemorrhagic shock. *Circulation* **100**: 226-229.
37. Muscoli C., Cuzzocrea S., Riley D.P., Zweier J.L., Thiemermann Ch., Wang Z. i Salvemini D. (2003): On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br. J. Pharmacol.* **140**: 445-460.
38. Muzykantov V.R. (2001): Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J. Contr. Release.* **71**: 1-21.

39. Oltman C.L., Kane N.L., Miller F.J., Spector A.A., Weintraub N.L. i Dellserger K.C. (2003): Reactive oxygen species mediate arachidonic acid-induced dilation in porcine coronary microvessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**: H2309-H2315.
40. O'Brien A.J., Wilson A.J., Sibbald R., Singer M. i Clapp L.H. (2001): Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. *Br. J. Pharmacol.* **133**: 351-360.
41. Pagano P.J., Ito Y., Tornheim K., Gallop P.M., Tauber A.I. i Cohen R.A. (1995): An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* **268**: H2273-H2280.
42. Pålsson-McDermott E.M. i O'Neill L.A.J. (2004): Signal transduction by the lipopolisaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**: 153-162.
43. Parrillo J.E. (1993): Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N. Engl. J. Med.* **328**: 1471-1477.
44. Pleiner J., Heere-Ress E., Langenberger H., Sieder A.E., Bayerle-Eder M., Mittermayer F., Fuchsjäger-Mayrl G., Böhm J., Jansen B. i Wolzt M. (2001): Adenoceptor hyporeactivity is responsible for *Escherichia coli* endotoxin-induced acute vascular dysfunction in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**: 95-100.
45. Polderman K.H. i Girbes A.R.J. (2004): Drug intervention trials in sepsis: divergent results. *Lancet* **363**: 1721-1723.

46. Pritchard K.A., Groszek L., Smalley D.M., Sessa W.C., Wu M., Villalon P. i Wolin M.S. (1995): Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ. Res.* **77**: 510-518.
47. Regoli D. (2004): Pharmacology of nitric oxide: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Design* **10**: 1667-1676.
48. Rodrigues-Martinez M., Garcia-Cohen E.C., Banea A.B., Gonzalez R., Salaices M. i Martin J. (1998): Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br. J. Pharmacol.* **125**: 1329-1335.
49. Ronson R.S., Nakamura M. i Vinten-Johansen J. (1999): The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc. Res.* **44**: 47-59.
50. Schulz E., Anter E. i Keaney J.F.Jr. (2004): Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr. Med. Chem.* **11**: 1093-1104.
51. Shastri S., Gopalakrishnan V., Poduri R. i Wang H.D. (2002): Tempol selectively attenuated angiotensin II evoked vasoconstrictor responses in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **20**: 1381-1391.
52. Shelkovernikov S., Merlic C.A. i Gonick H.C. (2004): Influence of nitric donors and peroxynitrite on the contractile effect and concentration of norepinephrine. *Life Sci.* **74**: 2919-2928.

53. Squadrito G.L. i Pryor W.A. (1998): Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**: 392-403.
54. Srivastava P., Hegde L.G., Patnaik G.K. i Dikshit M. (1998): Role of endothelial-derived reactive oxygen species and nitric oxide in norepinephrine induced rat aortic ring contractions. *Pharm. Res.* **38**: 265-274.
55. Srivastava P., Rajanikanth M., Raghavan S.A.V. i Dikshit M. (2002): Role of endogenous oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroksytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. *Pharmacol. Res.* **45**: 375-382.
56. Stoclet J.S., Martinez M.C., Ohlmann P., Chasserot S., Schott C., Kleschyov A.L., Schneider F. i Andriantsitohaina R. (1999): Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. *Circulation* **100**: 107-112.
57. Suba E.A., McKenna T.M. i Williams T.J. (1990): In vivo and in vitro effects of endotoxin on vascular responsiveness to norepinephrine and signal transduction in the rat. *Circulatory Shock* **36**: 127-133.
58. Takakura K., Xiaohong W., Takeuchi K., Yasuda, Y. i Fukuda S. (2003): Deactivation of norepinephrine by peroxynitrite as a new pathogenesis in the hypotension of septic shock. *Anaesth.* **98**:928-934.
59. Thiemermann Ch. (1997): Nitric oxide and septic shock. *Gen. Pharmacol.* **29**: 159-166.

60. Touyz R.M. (2004): Reactive Oxygen Species, Vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. *Hypertension* **44**: 248-252.
61. Touyz R.M. (2004): Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease. *Brazilian J. of Medical and Biological Research* **37**: 1263-1273.
62. Ülker S., McMaster D., McKeown P.P. i Bayraktutan U. (2003): Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc. Res.* **59**: 488-500.
63. Victor V.M., Rocha M. i De La Fuente M. (2003): N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Rad. Res.* **37**: 919-929.
64. Vinten-Johansen J. (2000): Physiological effects of peroxynitrite. Potential products of the environment. *Circ. Res.* **87**:170-172.
65. Walford G. i Loscalzo J. (2003): Nitric oxide and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* **1**: 2112-2118.
66. Wilson A.J. i Clapp L.H. (2002): The molecular site of action of K_{ATP} channel inhibitors determines their ability to inhibit iNOS-mediated relaxation in rat aorta. *Cardiovasc. Res.* **56**: 154-163.
67. Wippel R., Rehn M., Gorren A.F.C., Schmidt K. i Mayer B. (2004): Interference of the polyphenol epicatechin with the biological chemistry of nitric oxide- and peroxynitrite-mediated reactions. *Biochem. Pharmacol.* **67**: 1285-1295.

68. Yang D., Feletou M., Boulanger C.M., Wu H., Levens N., Zhang J. i Vanhoutte P.M. (2002): Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 136: 104-110.
69. Yang Z., Zheng T., Zhang A., Altura B.T. i Altura B.M. (1998): Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *E. J. Pharmacol.* **334**: 169-181.
70. Yen G. i Lai H. (2003): Inhibition of reactive nitrogen species in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7892-7900.
71. Yokozawa T., Rhyu D.Y. i Cho E.J. (2004): (-)-Epicatechin 3-O-gallate ameliorates the damages related to peroxynitrite production by mechanisms distinct from those of other free radical inhibitors. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 231-239.
72. Zhou M., Jaimes E.A. i Raj L. (2004): Inhibition of oxidative stress and improvement of endothelial function by amlodipine in Angiotensin II-infused rats. *Am. J. Hypert.* **17**: 167-171.