

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVIII
2008
SUPPLEMENT 12**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Rafał Dworakowski

**ROLA WOLNYCH RODNIKÓW
W PATOGENEZIE DYSFUNKCJI
ŚRÓDBŁONKA ORAZ REGULACJI
FUNKCJI LEWEJ KOMORY
U CHORYCH Z NIEWYDOLNOŚCIĄ SERCA**

*The role of reactive oxygen species in pathophysiology
of endothelial dysfunction and regulation of left
ventricular function in human heart failure*

Rozprawa habilitacyjna

Akademia Medyczna w Gdańsku
I Katedra i Klinika Kardiologii
Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Rynkiewicz

Gdańsk 2008

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD

Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Akademia Medyczna w Gdańsku
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published in Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica Database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

Niniejszą pracę dedykuję mojej córce

PODZIĘKOWANIA

W sposób szczególny pragnę podziękować Panu Profesorowi Andrzejowi Rynkiewiczowi, kierownikowi I Katedry i Kliniki Kardiologii AMG, za nieocenioną i wszechstronną pomoc, za inspirację do pracy naukowej oraz za nieustające wsparcie, bez którego realizacja tej pracy nie byłaby możliwa.

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy były wykonane w Kings College London w latach 2006-2007. Chciałbym wyrazić swoją szczególną wdzięczność Panu Profesorowi Ajayowi Shah za możliwość pracy w jego zespole oraz umożliwienie mi prowadzenia badań. Przeprowadzenie prezentowanych badań było możliwe tylko dzięki jego profesjonalnemu wsparciu, pomocy oraz stworzeniu doskonałych warunków do pracy naukowej.

Bardzo dziękuję Koleżankom i Kolegom z Kings College London za wszechstronną pomoc w prowadzeniu badań oraz ogromną życzliwość. W sposób szczególny pragnę podziękować Simonowi Walker za wprowadzenie mnie w tajniki biologii molekularnej oraz za nieocenioną pomoc przy realizacji tego projektu.

Chciałbym podziękować Azizowi Momin i kolegom z kardiologii za pomoc przy zbieraniu materiału. Serdecznie dziękuję również Colinowi Murdoch, Robinowi Ray, Alison Brewer, Alison Cave, Kevinowi Roberts, Emmie Sparks, Melanie Marshall, Evelyn Harrison oraz Markowi Kearney za wszelką okazaną pomoc.

Dziękuję moim Koleżankom i Kolegom z I Kliniki Chorób Serca AMG, a w szczególności Pani Irencie Dragan za wszelką pomoc okazaną podczas realizacji tej pracy.

W końcu chciałbym podziękować moim Rodzicom, Bratu, wszystkim Przyjaciołom oraz innym bliskim mi Osobom, którzy obdarzyli mnie życzliwością podczas realizacji tej pracy.

W sposób szczególny pragnę podziękować mojej żonie Dorocie, która okazała mi nieocenioną pomoc i wsparcie podczas mojego pobytu za granicą oraz podczas realizacji tej pracy.

Bardzo dziękuję Europejskiemu Towarzystwu Kardiologicznemu oraz Kings College London za umożliwienie mi prowadzenia pracy naukowej.

ACKNOWLEDGMENTS

First of all I would like to deeply thank Professor Andrzej Rynkiewicz, Head of the 1st Department of Cardiology, Medical University of Gdańsk, Poland, for his invaluable and comprehensive help, for the inspiration to pursue scientific research, his continued support, without which this work would not have been possible.

This study was carried out at Kings College London, UK in years 2006-2007. I am very grateful to Professor Ajay Shah, the head of Department of Cardiology, for the great opportunity to be part of his team, being involved in exciting research projects and the opportunity to perform the presented study. His professional and personal support, and limitless help made this research project possible.

I wish to express my warmest thanks to all members of Prof. Shah's team for their acceptance and all help during my work and stay in London. I owe special thanks to Simon Walker, who introduced me to the field of molecular biology, for his invaluable help in the realization of this project and friendship. I would like to thank my colleagues from cardiothoracic surgery, Aziz Momin and Olaf Wendler, for help in collecting the material. I would like to thank Colin Murdoch, Robin Ray, Alison Brewer, Alison Cave, Kevin Roberts, Emma Sparks, Melanie Marshall, Evelyn Harrison and Mark Kearney for all their help.

I would like to thank my colleagues from 1st Department of Cardiology, especially Irena Dragan, for their help and all support during this realization of the project.

Finally, I would like to thank my parents, my brother and all my friends for their support and continued motivation. Specially, I would like to thank my wife, Dorota, who gave me invaluable support and help during my stay abroad.

I am very grateful to European Cardiac Society and Kings College London for supporting my stay and research.

Wykaz najczęściej używanych skrótów:

ACE	– <i>angiotensin converting enzyme</i> – enzym konwertujący angiotensynę
CRP	– <i>C-reactive protein</i> – białko C-reaktywne
HF	– <i>heart failure</i> – niewydolność serca
Il	– <i>interleukin</i> - interleukina
NADPH	– <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> - dwunukleotyd nikotyno-amidoadeninowy
NYHA	– New York Heart Association – Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne
NOS	– <i>nitric oxide synthase</i> – syntaza tlenku azotu
NO	– <i>nitric oxide</i> – tlenek azotu
Nox	– <i>NADPH oxidase</i> – oksydaza NADPH
ROS	– <i>reactive oxygen species</i> – wolne rodniki tlenowe
RAAS	– <i>renin-angiotensin-aldosterone system</i> – układ renina-angiotensyna-aldosteron
RT-PCR	– <i>real time-reverse transcription-polymerase chain reaction</i> – odwrotna transkrypcja sprzężona z łańcuchową reakcją polimerazową w czasie rzeczywistym
mRNA	– <i>messenger Ribonucleic Acid</i> – informacyjny kwas rybonukleinowy
TNF	– <i>tumor necrosis factor</i> – czynnik martwicy guza
TRAF	– <i>TNF receptor-associated factor</i> – czynnik związany z receptorem dla TNF

W niniejszej rozprawie wykorzystano część wyników prezentowanych w publikacji:

Dworakowski R., Walker S., Momin A., Desai J., El-Gamel A., Wendler O., Kearney M.T., Shah A.M. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure.

J. Am. Coll. Cardiol. 2008, 51, 1349-56.

Wszyscy współautorzy pisemnie oświadczyli, że wkład autora niniejszej rozprawy w realizację powyższej pracy wynosił co najmniej 85%.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	13
1.1. NIEWYDOLNOŚĆ SERCA	13
1.2. BIOCHEMICZNE MARKERY NIEWYDOLNOŚCI SERCA	14
1.3. DYSFUNKCJA ŚRÓDBŁONKA	17
1.4. STRES OKSYDACYJNY	19
1.5. OKSYDAZA NADPH	22
1.6. PODSUMOWANIE	27
2. CELE PODJĘTYCH BADAŃ	29
3. MATERIAŁ I METODY	30
3.1. MATERIAŁ KLINICZNY	30
3.2. OZNACZENIA MARKERÓW ZAPALENIA	30
3.3. OCENA FUNKCJI WAZOMOTORYCZNEJ	31
3.4. OCENA PRODUKCJI WOLNYCH RODNIKÓW	31
3.5. OCENA EKSPRESJI PODJEDNOSTEK OKSYDAZY NADPH ORAZ IZOFORM SYNTAZY TLENKU AZOTU METODĄ RT-PCR.....	32
3.6. ANALIZA STATYSTYCZNA	33
4. WYNIKI	34
4.1. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA	34
4.2. CYTOKINY ZAPALNE	37
4.3. FUNKCJA WAZOMOTORYCZNA	39
4.4. PRODUKCJA WOLNYCH RODNIKÓW	40
4.5. EKSPRESJA PODJEDNOSTEK OKSYDAZY NADPH ORAZ IZOFORM SYNTAZY TLENKU AZOTU	43
5. OMÓWIENIE	46
6. WNIOSKI	54
7. STRESZCZENIE	55
8. SUMMARY	56
9. PIŚMIENNICTWO	57

1. WSTĘP

1.1. Niewydolność serca

Pomimo postępu w kardiologii, jaki dokonał się w ostatnich 20 latach i znacznego zmniejszenia śmiertelności z powodu chorób układu krążenia, roczna śmiertelność wśród chorych z ciężką niewydolnością serca w klasie III-IV NYHA, wciąż jest bardzo wysoka i przekracza 25%. W USA liczba zgonów w wyniku niewydolności serca w 1992 r. wynosiła prawie 40 tys. i była o 80% wyższa niż w 1980, i prawie 4-krotnie większa niż w 1968 roku. Według najnowszych danych z europejskiego rejestru z lat 2000 - 2003, śmiertelność wśród chorych z niewydolnością serca pozostaje wciąż wysoka i ponad 30% chorych umiera w ciągu 3 lat [159]. Niewydolność serca wyraźnie częściej dotyczy osób starszych a proporcja kobiet do mężczyzn jest zbliżona, co wyróżnia niewydolność serca od innych chorób układu krążenia. Głównymi przyczynami niewydolności serca są choroba wieńcowa, nadciśnienie tętnicze oraz cukrzyca [36]. Rzadsze przyczyny niewydolności serca obejmują późno rozpoznane wrodzone lub nabyte wady zastawkowe, kardiomiopatie pierwotne oraz wtórne np. w przebiegu infekcji wirusowej, działania toksyn (w tym alkoholu i niektórych leków), chorób metabolicznych, kolagenoz, chorób auto-immunologicznych. Postęp w leczeniu ostrych zespołów wieńcowych przyniósł znaczną poprawę rokowania oraz zmniejszenia śmiertelności w ostrym zawałe serca, ale wydaje się, że paradoksalnie może przyczynić się do zwiększenia liczby chorych z niewydolnością serca [177].

Niewydolność serca to zespół kliniczny wynikający z uszkodzenia mięśnia sercowego, prowadzącego do niewydolności serca jako pompy oraz do zmniejszenia rzutu serca, z obiektywnymi dowodami upośledzonej czynności serca i odpowiedzią na typowe leczenie. Niewydolność serca wynikająca z niedomogi skurczowej lub/i rozkurczowej prowadzi w konsekwencji do niewydolności krążenia, stanu klinicznego, który charakteryzuje się szeregiem zaburzeń ogólnoustrojowych, między innymi zatrzymaniem sodu i wody, zwiększeniem oporu obwodowego, zwiększonym pobudzeniem układu współczulnego oraz postępującą przebudową mięśnia sercowego i naczyń krwionośnych.

Niewydolności serca jest konsekwencją postępującego procesu przebudowy mięśnia sercowego. Proces ten cechuje szereg zmian na poziomie tkankowym i komórkowym, między innymi zmianą ekspresji genów i białek. W początkowym etapie przebudowa ma charakter adaptacyjny i pozwala utrzymać prawidłowy rzut serca (pomimo utraty masy mięśniowej związanej z niedokrwieniem) i/lub przezwyciężyć zwiększone obciążenie następcze. W miarę upływu czasu proces przebudowy prowadzi do stopniowego poszerzenia lewej komory serca i jej

zwłóknienia, przyczyniając się do występowania zaburzenia rytmu i skutkując dalszym postępującym pogorszeniem funkcji serca jako pompy [150].

Od wielu lat do oceny zaawansowania niewydolności serca stosuje się klasyfikację Nowojorskiego Towarzystwa Kardiologicznego (New York Heart Association - NYHA). Opiera się ona na ocenie ciężkości subiektywnych objawów klinicznych. W wielu badaniach wykazano, że klasyfikacja NYHA jest silnym, negatywnym, niezależnym czynnikiem rokowniczym [155, 195].

Zaburzenia hemodynamiczne są jedynie pierwszym etapem rozwoju zespołu klinicznego. Konsekwencją zmniejszonego rzutu serca jest aktywacja szeregu mechanizmów kompensacyjnych, prowadzących do aktywacji układu współczulnego i zmniejszenia aktywności układu przywspółczulnego [62]. Dysregulacja na poziomie neurohormonalnym prowadzi do podwyższonego stężenia amin katecholowych w tym noradrenaliny, angiotensyny oraz endoteliny [21, 64, 128]. Wszystkie te substancje są silnymi wazopressorami, powodują zwiększenie oporu obwodowego i zwiększają obciążenie serca. Aktywacja układu adrenergicznego oraz hipoperfuzja nerek powodują pobudzenie układu renina-angiotensyna-aldosteron [113]. Angiotensyna II i aldosteron poprzez wpływ na skurcz naczyń tętniczych, bezpośrednie działanie inotropowe dodatnie oraz zwiększenie wolemii, pozwalają utrzymać odpowiedni przepływ krwi przez ważne życiowo organy pomimo obniżonego rzutu serca, ale w dłuższym okresie powodują przewodnienie i przyczyniają się do duszności wysiłkowej lub spoczynkowej oraz występowania obrzęków obwodowych. Większość objawów niewydolności serca jest związana z aktywacją mechanizmów kompensacyjnych spowodowanych zmniejszonym rzutem serca.

1.2. Biochemiczne markery niewydolności serca

Już w latach sześćdziesiątych stwierdzono, że pacjenci z niewydolnością serca mają podwyższone stężenie noradrenaliny w spoczynku a do dodatkowego wzrostu jej stężenia dochodzi w czasie wysiłku [34]. Później wykazano, że stężenie noradrenaliny jest podwyższone u chorych bezobjawowych, koreluje z zaawansowaniem niewydolności serca oraz jest ono niezależnym czynnikiem prognostycznym [37]. Kolejnym ważnym krokiem w badaniach nad patofizjologią niewydolności serca było wykazanie zaburzeń w zakresie układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) przez Swedberga i wsp. [176]. Aktywacja układu noradrenaliny oraz RAA, powodując zatrzymanie sodu i wody oraz skurcz naczyń, ma na celu utrzymanie prawidłowego ciśnienia tętniczego. Oba układy wzajemnie oddziałują na siebie i regulują swoją aktywność. Dla przykładu stymulacja receptorów β_1 -adrenergicznych w aparacie przykłębuszkowym, związana z aktywacją układu współczulnego oraz aktywacją baroreceptorów, w wyniku zmniejszonego przepływu nerkowego, aktywują sekrecję reniny. Renina przekształca angiotensynogen, produkowany w wątrobie do angiotensyny I,

która ulega dalszej transformacji do angiotensyny II przez enzym konwertujący angiotensynę (*ACE - angiotensin converting enzyme*). Chociaż zwiększenie stężenia reniny nie jest powszechnie stwierdzane u chorych z niewydolnością serca, podwyższone stężenie angiotensyny II występuje nawet u chorych bezobjawowych [64]. Angiotensyna II jest jedną z najsilniejszych substancji powodujących skurcz mięśni gładkich naczyń i wraz z aminami katecholowymi (głównie noradrenaliną) przyczynia się do zwiększenia systemowego oporu naczyniowego. Dodatkowo, angiotensyna II reguluje uwalnianie noradrenaliny oraz aldosteronu [1]. Poprzez zwiększone wchłanianie sodu w nerkach aldosteron przyczynia się do zatrzymania płynów i występowania obrzęków [166]. Aldosteron wykazuje również działanie centralne na receptory w przysadce, przez które reguluje uwalnianie wazopresyny. Wazopresyna powoduje dodatkowe zwiększenie akumulacji płynów i systemowy skurcz mięśni gładkich naczyń, nasilając objawy niewydolności krążenia. Podobnie jak w przypadku opisanych wyżej mediatorów, zwiększone stężenie wazopresyny koreluje z rokowaniem i stwierdzane się zarówno u chorych z ostrą, jak i przewlekłą niewydolnością serca [165].

Działanie omawianych substancji nie ogranicza się tylko do regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej oraz oporu naczyniowego. Wykazują one szereg działań na poziomie komórkowym zarówno na naczynia jak i na mięsień sercowy. Dla przykładu angiotensyna II bezpośrednio wpływa na przebudowę mięśnia sercowego, pobudza przerost kardiomiocytów i może aktywować apoptozę [162]. Ponadto angiotensyna II i aldosteron aktywują proliferację fibroblastów, regulują wytwarzanie kolagenu oraz procesy włóknienia w sercu [121, 130].

Kolejną substancją, która odgrywa ważną rolę w patofizjologii niewydolności serca jest cząsteczka białkowa wydzielana przez komórki śródbłonna, zwana endoteliną. Jest to jedna z silniejszych znanych substancji powodujących skurcz mięśni gładkich naczyń oraz aktywujących proliferację komórkową [180]. Podobnie jak angiotensyna II, endotelina reguluje przebudowę serca i naczyń wpływając na procesy włóknienia [181]. Uwalnianie endoteliny jest aktywowane przez różne substancje wazoaktywne, między innymi angiotensynę II, noradrenalinę, trombinę oraz niektóre cytokiny zapalne. Podwyższone stężenie endoteliny stwierdzano u wszystkich chorych z niewydolnością serca. Stężenie endoteliny dobrze koreluje z ciężkością nadciśnienia płucnego, nasileniem niewydolności serca i rokowaniem [86, 111]. Badacze *Valsartan Heart Failure Trial* (Val-HeFT) porównali wartość prognostyczną różnych neurohormonów u 4300 chorych z niewydolnością serca. Okazało się, że największą wartość prognostyczną odnośnie śmiertelności u chorych z niewydolnością serca mają kolejno: BNP, duża endotelina-1, noradrenalina, endotelina-1, renina i na końcu aldosteron [111].

Zapalenie odgrywa ważną rolę w patogenezie i w rozwoju wielu postaci niewydolności serca. Po raz pierwszy obecność zapalenia u chorych z niewydolnością serca zaobserwowano stwierdzając podwyższone stężenia reaktywnego białka C (CRP; *C-reactive protein*) w grupie 40 chorych z niewydolnością serca

[55]. CRP jest białkiem ostrej fazy produkowanym przez wątrobę między innymi w odpowiedzi na interleukinę 6 (Il-6). W wielu badaniach wykazano, że poziom CRP koreluje z ciężkością niewydolności serca i rokowaniem [5]. Na poziomie komórkowym CRP wykazuje bezpośrednie działanie na funkcję śródbłonka, redukuje uwalnianie tlenu azotu, zwiększa ekspresję molekuł adhezyjnych oraz pobudza wytwarzanie wolnych rodników [152, 191]. W niewydolności serca obserwowano także zwiększenie stężenia wielu cytokin, takich jak TNF- α , Il-1, Il-2, Il-6 oraz rozpuszczalnego receptora dla tych cytokin (m.in. receptora dla TNF- α) [20]. Stężenia większości z nich dobrze korelowały z nasileniem niewydolności serca oraz z rokowaniem [114, 183]. Dodatkowo w badaniu *The Framingham Heart Study* w oparciu o stężenia białka C-reaktywnego, TNF- α oraz Il-6, badacze mogli nawet zidentyfikować bezobjawowych pacjentów, którzy mieli zwiększone ryzyko rozwoju niewydolności serca w przyszłości [190].

Po raz pierwszy zwiększone stężenie TNF- α u chorych z niewydolnością serca opisał Levine i wsp. w 1990 [114]. Później wykazano, że TNF- α ma bezpośrednie działanie inotropowe ujemne, wpływa niekorzystnie na przebudowę mięśnia sercowego i progresję niewydolności serca [59]. TNF- α aktywując metaloproteiny reguluje procesy włóknienia i powoduje poszerzenie lewej komory [168]. Stężenie Il-6, podobnie jak TNF- α , jest podwyższone u pacjentów z niewydolnością serca. Podobnie jak w przypadku TNF- α wykazano, że wyższe stężenie Il-6 koreluje dobrze ze stopniem zaawansowania choroby i ze zwiększoną śmiertelnością [40, 185]. Il-6 wykazuje działanie inotropowe ujemne oraz stymuluje przerost serca [59, 82]. Aktualnie uważa się, że przynajmniej część działań TNF- α oraz Il-6 można wiązać z regulacją produkcji wolnych rodników przez oksydazę NADPH [39].

Niewydolność serca jest związana z zaburzeniami wielu systemów regulacyjnych na poziomie para- i autokrynnym, włączając tlenek azotu [20]. Tlenek azotu jest wytwarzany między innymi przez komórki śródbłonka naczyniowego. Początkowo działanie biologiczne tlenu azotu wiązano jedynie z regulacją napięcia naczyniowego [145]. Później wykazano, że tlenek azotu, jako tak zwany „drugi przekaźnik”, reguluje funkcję wielu organów oraz komórek. Tlenek azotu jest syntetyzowany na drodze enzymatycznej transformacji z L-argininy przez syntazę tlenu azotu (NOS; *nitric oxide synthase*). Syntaza tlenu azotu występuje w trzech izoformach: neuronalnej (nNOS), indukowanej (iNOS) oraz śródbłonkowej (eNOS) [63]. Podstawową postacią syntazy tlenu azotu występującą w komórkach śródbłonka jest eNOS, która produkuje NO w sposób ciągły, aczkolwiek jej aktywność jest ściśle regulowana. W odróżnieniu do eNOS, ekspresja iNOS w komórkach śródbłonka jest indukowana przez cytokiny zapalne. Enzym ten może produkować znacznie większe ilości NO w porównaniu do eNOS. NO jako drugi przekaźnik aktywuje cyklazę guanylową w komórkach mięśni gładkich naczyń i powoduje ich rozkurcz. W ten sposób NO pełni ważną

rolę w regulowaniu oporu obwodowego. Zmniejszenie oporu obwodowego, a przez to zmniejszenie obciążenia następczego, poprawia czynność niewydolnego serca. Dodatkowo NO może regulować funkcję serca poprzez modulowanie kurczliwości, metabolizmu komórkowego, wzrostu komórek i apoptozy [53, 105, 127, 188].

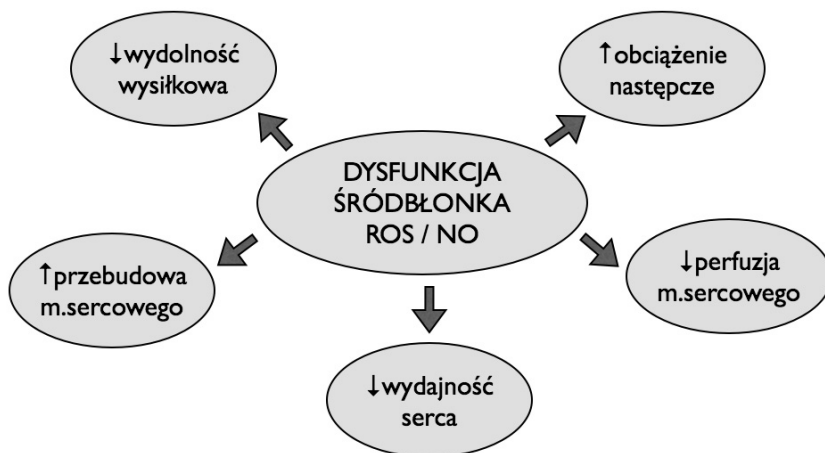
1.3. Dysfunkcja śródbłonna

Śródbłonek naczyniowy to wyściółka naczyń, utworzona z jednej warstwy wysoce wyspecjalizowanych komórek oddzielających światło naczyń od otoczenia. Komórki śródbłonna reagują na lokalne zmiany przepływu krwi czy ciśnienia parcjalnego tlenu i modulują homeostazę wewnątrznacyniową [72], regulując napięcie mięśni gładkich naczyń, utrzymanie płynność krwi, krzepliwość, przepuszczalności naczyń, proliferację komórkową oraz apoptozę. Mediatorami tych procesów są substancje wydzielane przez endothelium, takie jak wspomniane wcześniej tlenek azotu (NO), endothelina (ET-1), prostacykliny oraz czynniki wzrostu. Na powierzchni komórek śródbłonna występuje enzym konwertujący angiotensynę (ACE) oraz tkankowy aktywator plasminogenu (tPA). Przez niewydolność śródbłonna rozumie się występowanie zaburzenia funkcji jednego lub wielu opisanych powyżej systemów [24].

Napięcie mięśni gładkich naczyń jest regulowane przez tlenek azotu, prostacykliny oraz endoteliny, a jednym z podstawowych wykładników zaburzeń funkcji śródbłonna jest zmniejszenie biodostępności tlenu azotu. Uważa się, że upośledzenie zależnej od śródbłonna wazodylatacji jest podstawowym markerem niewydolności śródbłonna. W warunkach fizjologicznych stres tarcia (*shear stress*) pobudza ekspresję eNOS oraz zwiększa wydzielanie tlenu azotu. W przewlekłej niewydolności serca występuje niewydolność śródbłonna, która między innymi cechuje się zmniejszoną biodostępnością tlenu azotu [81]. Zmniejszenie biodostępności tlenu azotu może być związane ze zmniejszeniem wytwarzania, na przykład w wyniku zmniejszenia ekspresji eNOS (w związku ze zwolnionym przepływem krwi przez naczynia w wyniku zmniejszenia stresu tarcia). Haywood i wsp. sugerowali, że podstawowe wydzielanie NO pozostaje niezmiennione w niewydolności serca, prawdopodobnie w związku ze zwiększoną ekspresją iNOS [78]. Inni badacze nie potwierdzali tych obserwacji, a wręcz przeciwnie stwierdzali zmniejszenie podstawowego wydzielania NO [133].

Upośledzenie zależnego od śródbłonna rozkurczu mięśni gładkich, w wyniku zmniejszonego wydzielania NO, odgrywa istotną rolę w patofizjologii niewydolności serca, jest jedną z przyczyn zwiększonego oporu obwodowego (ryc. 1). Wykazano, że zaburzenia funkcji śródbłonna i zmniejszenie biodostępności NO są jednymi z wcześniejszych cech niewydolności serca [79]. Dodatkowo w ostatnich latach potwierdzono znamiennej korelację pomiędzy dysfunkcją

śródbłonka a zdarzeniami sercowo-naczyniowymi i rokowaniem w niewydolności serca [61, 77, 101].



Ryc. 1. Rola dysfunkcji śródbłonki w patologii niewydolności serca
 Fig. 1. The role of endothelial dysfunction in pathology of heart failure

Skurcz naczyń krwionośnych wynika także ze zwiększonego stężenia krążących substancji naczynioskurczowych, takich jak noradrenalina, angiotensyna oraz endotelina. Tlenek azotu pełni jednak kluczową rolę w tym procesie, ponieważ może równoważyć efekt działania czynników wazokonstrykcyjnych i pełni podstawową rolę w regulacji napięcia naczyniowego na poziomie komórkowym [24].

Rozkurcz naczyń występujący fizjologicznie w czasie wysiłku jest znacznie ograniczony u chorych z niewydolnością serca. Wykazano, że rozkurcz naczyń może być częściowo przywrócony po podaniu L-argininy, prekursora tlenu azotu, sugerując podstawową rolę śródbłonki w regulacji napięcia naczyniowego [81]. Zmniejszenie biodostępności NO częściowo przyczynia się do ograniczenia tolerancji wysiłku w związku z niedostateczną perfuzją mięśni szkieletowych, pogorszeniem hemodynamiki i dodatkowym zwiększeniem obciążenia następczego [44]. W przypadku układu żylnego – zwiększone napięcie żyłne skutkuje w zwiększeniu obciążenia wstępnego i przeciążenia objętościowego [140, 141]. Konsekwencją zmiany ekspresji NOS jest zmniejszenie biodostępności tlenu azotu, oraz upośledzenie funkcji śródbłonki naczyniowego, co wpływa na funkcję naczyń i serca. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że zwiększona ekspresja eNOS wpływa korzystnie na przebudowę mięśnia sercowego po zawale w odróżnieniu od braku eNOS, który związany jest z większym uszkodzeniem [94, 164].

Podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za upośledzenie zależnej od śródbłonka wazorelaksacji jest zmniejszenie biodostępności tlenku azotu [24]. Może ono wynikać ze zmniejszenia produkcji tlenku azotu, w wyniku obniżonej ekspresji syntazy tlenku azotu (*nitric oxide syntase* – *NOS*), braku substratu (L-argininy) lub kofaktora dla *NOS* (tetrahydrobiopteryny - BH_4) lub zwiększonej inaktywacji NO [6]. W badaniach klinicznych zwracano uwagę, że krótkoterminowe i przewlekłe podawanie przeciw utleniaczy – witaminy C, skutkowało w poprawie zależnego od tlenku azotu rozkurczu naczyń, co sugeruje istotną rolę wolnych rodników w niedomodze śródbłonka [84]. Farquharson i Landmesser w swoich badaniach wykazali, że dysfunkcja śródbłonka w przewlekłej niewydolności serca rzeczywiście jest związana ze zwiększeniem rozkładu NO przez wolne rodniki [57, 110]. Dodatkowo w kolejnych pracach wykazano, że blokowanie receptora dla aldosteronu w eksperymentalnej niewydolności serca u szczurów otrzymujących inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ACEI) poprawia funkcję śródbłonka i przyczynia się do zwiększenia biodostępności NO poprzez zmniejszone wytwarzanie wolnych rodników [163]. Johar i wsp. wykazali, że poprzez blokadę receptora aldosteronowego można zahamować indukowaną przez angiotensynę II aktywację oksydazy NADPH [92]. W tych i w wielu innych badaniach eksperymentalnych i klinicznych wykazano, że stres oksydacyjny pełni kluczową rolę w patofizjologii niewydolności serca [117].

1.4. Stres oksydacyjny

Przez termin stres oksydacyjny rozumie się zachwianie równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników oraz endogennymi mechanizmami antyoksydacyjnymi, na korzyść wolnych rodników. Wykazano, że stężenie markerów stresu oksydacyjnego jest zwiększone u pacjentów z niewydolnością serca. Dodatkowo markery te, podobnie jak markery zapalenia, dobrze korelują ze stopniem dysfunkcji lewej komory oraz stopniem zaawansowania niewydolności serca. Początkowo uważano, że działanie wolnych rodników polega jedynie na bezpośrednim uszkodzeniu komórek prowadzącym do martwicy bądź aktywacji apoptozy [53, 58]. Współczesne badania zmieniły ten pogląd, gdyż wykazano, że biologiczne działanie wolnych rodników zależy bardzo od ich ilości, miejsca działania oraz równowagi pomiędzy poziomem generowanych wolnych rodników a aktywnością układów antyoksydacyjnych. Wykazano, że wolne rodniki jako tzw. „drugi przekaźnik”, pełnią funkcję regulacyjną i wpływają na szereg procesów wewnątrzkomórkowych, modulując aktywność wielu białek wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [28]. Proces ten powszechnie określa się jako *redox signalling* – przekaźnictwo zależne od wolnych rodników.

Wolne rodniki tlenowe (*reactive oxygen species* – *ROS*) to substancje posiadające niesparowany elektron i cechujące się znaczącą reaktywnością. Do wolnych rodników zalicza się: wolny rodnik ponadtlenkowy (O_2^*), rodnik hydroksylowy

(OH^{*}), nadtlenoazotyn (ONOO^{*}) oraz nadtlenek wodoru (H₂O₂). Nadtlenek wodoru nie jest wolnym rodnikiem *per se*, ale ma cechy wolnych rodników, takie jak duża reaktywność. Poszczególne rodniki różnią się pomiędzy sobą czasem półtrwania i miejscem działania. Rodnik hydroksylowy jest wysoce reaktywny, ale ze względu na niezwykle krótki czas półtrwania działa tylko w miejscu powstania. Podobnie rodnik ponadtlenkowy ma krótki czas półtrwania, wynoszący tylko kilka sekund, ponieważ ulega bardzo szybkiej transformacji do nadtlenu wodoru w procesie zależnym od dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Rodnik ponadtlenkowy nie przechodzi przez błony komórkowe i dlatego działa wyłącznie w miejscu powstania, w przeciwieństwie do nadtlenu wodoru, który swobodnie przenika pomiędzy różnymi kompartmentami komórkowymi. Wolne rodniki tlenowe, zwłaszcza rodnik ponadtlenkowy (O₂^{*}), mogą regulować aktywność i stężenie NO. Tlenek azotu niezwykle łatwo wchodzi w reakcje z rodnikiem ponadtlenkowym a wynikiem tej reakcji jest wysoce reaktywny i bardzo toksyczny rodnik nadtlenoazotynowy (ONOO^{*}) [182]. Poziom wolnych rodników zależy nie tylko od aktywności enzymów wytwarzających, ale także od aktywności układów antyoksydacyjnych [41, 45, 117].

Wolne rodniki wywierają silne działanie biologiczne w wielu stanach patologicznych. Zwiększony stres oksydacyjny stwierdzano w nadciśnieniu tętniczym, cukrzycy, miażdżycy, niewydolności serca, w uszkodzeniu związanym z niedokrwieniem-reperfuzją, oraz w przewlekłej niewydolności nerek [157]. Uważa się, że wolne rodniki wpływają na funkcję śródbłonna, zapalenie i przyczyniają się do rozwoju miażdżycy [106, 154, 182].

W układzie sercowo-naczyniowym wykazano, że wolne rodniki regulują funkcję wielu białek, między innymi tych związanych z procesem przetwarzania pobudzenia elektrycznego na skurcz (białek kanałów jonowych, kanałów wapniowych – SERCA) [67] oraz białek miofilamentów [112, 158]. Jak wspomniano wcześniej wolne rodniki zmniejszają biodostępność tlenu azotu i przez to przyczyniają się do niewydolności śródbłonna.

Dodatkowo na poziomie wewnątrzkomórkowym wolne rodniki wpływają na ekspresję szeregu białek i regulują fenotyp komórek. Wolne rodniki modulują funkcję fibroblastów, aktywują ich proliferację oraz syntezę kolagenu, aktywują i zwiększają ekspresję metaloproteinaz [170, 172], pozostają więc kluczowe w regulacji procesów włóknienia. Na poziomie wewnątrzkomórkowym wolne rodniki wpływają na kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK) oraz czynniki transkrypcyjne (między innymi NF-κB) [33].

Potencjalnymi źródłami wolnych rodników są enzymy mitochondrialnego łańcucha oddechowego, enzymy zawierające cytochrom P450, oksydaza ksantynowa, komórki zapalne, syntaza tlenu azotu (*uncoupled NOS*) oraz oksydaza NADPH [46, 57, 117, 132]. Mitochondrialny łańcuch oddechowy stanowi istotne źródło wolnych rodników w angiopatii cukrzycowej oraz w niedokrwieniu

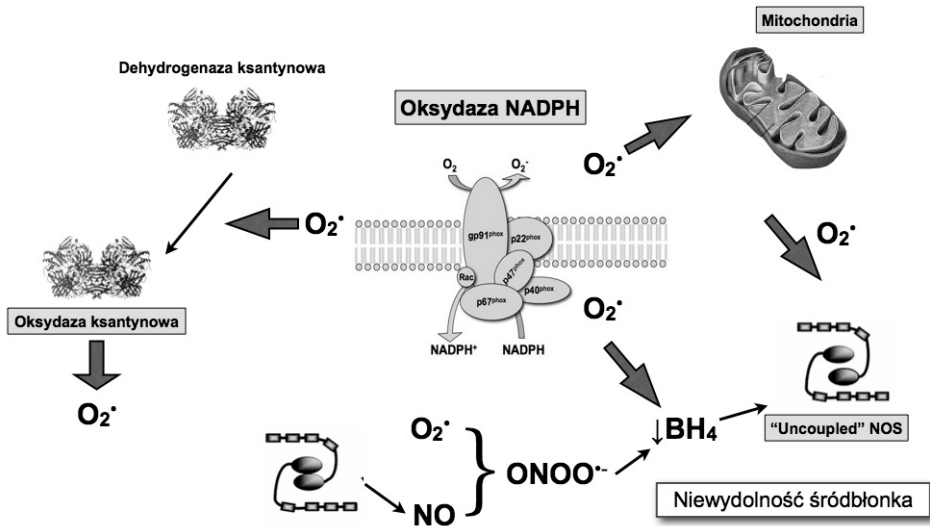
i reperfuzji. W warunkach prawidłowych, mitochondria produkują jedynie niewielkie ilości wolnych rodników, ale są one bardzo wrażliwe na uszkodzenie wynikające z ich działania [97, 129]. Wolne rodniki pochodzące z innego źródła mogą zwiększyć mitochondrialną produkcję wolnych rodników [46]. Oksydaza ksantynowa występuje na komórkach śródbłonna od strony światła naczynia i katalizuje proces przemiany hipoksantyny do moczanu. Zwykle enzym ten występuje w formie dehydrogenazy, która nie wytwarza rodnika ponadtlenkowego, ale może zostać przekształcona do oksydazy poprzez utlenienie lub enzymatyczną modyfikację. Utleniona forma enzymu wytwarza wolny rodnik ponadtlenkowy i odpowiada za zwiększenie stresu oksydacyjnego między innymi w niedokrwieniu i reperfuzji [18, 131, 132].

Syntaza tlenu azotu w normalnych warunkach produkuje tlenek azotu, ale przy niedoborze tetrahydrobiopteryny (BH_4) - kofaktora enzymu, NOS rozpada się na monomery (*uncoupled NOS*) i zaczyna produkować rodnik ponadtlenkowy zamiast tlenu azotu (proces ten nazwano *kindling radical phenomenon*) [6, 24]. W takim przypadku NOS (*uncoupled NOS*) staje się bardzo ważnym źródłem wolnych rodników i wykazano, że przyczynia się do postępu waskulopatii cukrzycowej, miażdżycy oraz rozwoju powikłań nadciśnienia tętniczego i hypercholesterolemii. Tetrahydrobiopteryna ulega degradacji pod wpływem działania rodnika ponadtlenkowego oraz nadtlendioazotynowego [109]. Wolne rodniki pochodzące z innego źródła mogą nasilać stres oksydacyjny w tym mechanizmie [18, 29, 106] (ryc. 2).

W odróżnieniu od wymienionych powyżej systemów enzymatycznych, oksydaza NADPH jest jedynym enzymem produkującym wyłącznie wolne rodniki. Oksydaza NADPH zajmuje centralne miejsce w regulacji wytwarzania wolnych rodników, ponieważ poprzez ich uwalnianie może regulować aktywność pozostałych układów zaangażowanych w ich produkcję. Oksydaza NADPH może również odpowiadać za regulację procesów apoptozy oraz indukować martwicę. Statyny oraz podwyższone stężenie cholesterolu HDL ograniczają związaną z niedokrwieniem i reperfuzją apoptozę, prawdopodobnie wpływając na regulację wydzielania wolnych rodników, poprzez zmianę ekspresji białka rac [52, 53]. Stres oksydacyjny i oksydaza NADPH mogą również pełnić istotną rolę w protekcyjnym działaniu hartowania [47, 48].

Oksydaza NADPH pełni kluczową rolę w procesie przekąźnictwa zależnego od wolnych rodników (*redox signalling*). Wykazano, że zwiększona produkcja wolnych rodników przez oksydazę NADPH przyczynia się do zaburzeń czynności śródbłonna w nadciśnieniu tętniczym, hypercholesterolemii oraz cukrzycy [27, 146, 197]. Dotychczas nie wyjaśniono, jaką rolę pełnią wolne rodniki generowane przez oksydazę NADPH w patofizjologii upośledzonej funkcji śródbłonna w niewydolności serca u ludzi. Jakkolwiek w badaniach eksperymentalnych wykazano, że niewydolność serca u zwierząt jest związana ze zwiększeniem ekspresji oksydazy NADPH w śródbłonku aorty i może być odpowiedzialna

za zaburzenia czynności śródbłónka [134, 178, 194]. Dotychczas u chorych z niewydolnością serca wykazano jedynie zwiększoną ekspresję oksydazy NADPH w myocardium [80, 123].



Ryc. 2. Wzajemne zależności pomiędzy oksydazą NADPH a innymi źródłami wolnych rodników.

$O_2^{\bullet -}$ – rodnik ponadtlenkowy, NO – tlenek azotu, NOO^{\bullet} – rodnik nadtlenoazotowy, BH_4 – tetrahydrobiopteryna, eNOS – syntaza tlenku azotu

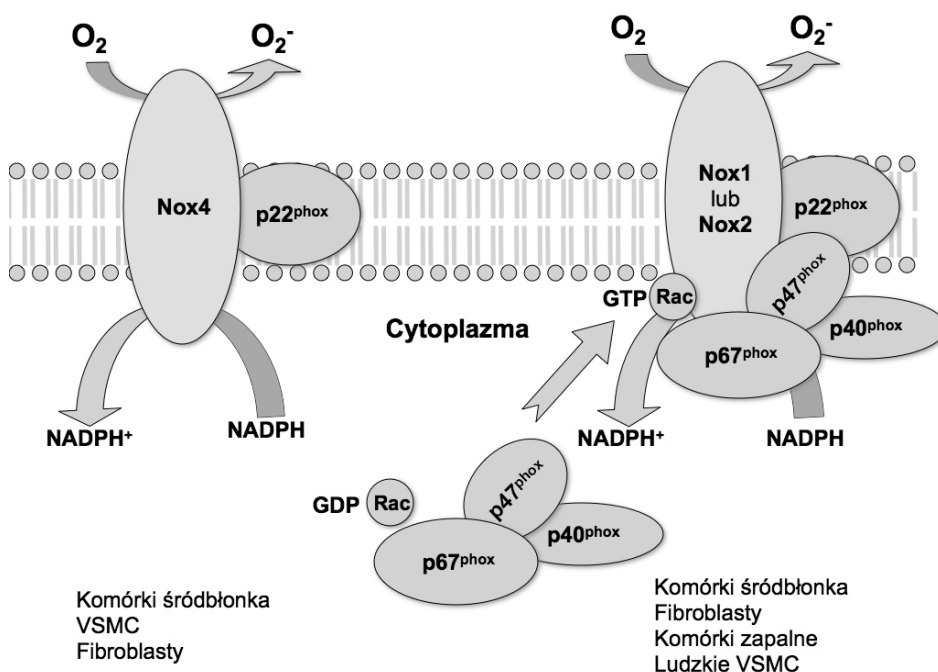
Fig. 2. Interplay between NADPH oxidase and other ROS sources.

$O_2^{\bullet -}$ – superoxide radical, NO – nitric oxide, NOO^{\bullet} – peroxynitrite, BH_4 – tetrahydrobiopterin, eNOS – nitric oxide synthase

1.5. Oksydaza NADPH

System oksydazy NADPH został opisany po raz pierwszy w komórkach fagocytarnych (neutrofilach, eozynofilach, monocytach i makrofagach), w których odpowiada za gwałtowny wyrzut wolnych rodników tlenowych [10]. Kompleks ten pełni kluczową rolę w niespecyficznej obronie przeciwbakteryjnej powodując gwałtowne wytwarzanie znacznej ilości rodnika ponadtlenowego w procesie opisywanym jako „wybuch tlenowy” [107]. System oksydaz w komórkach fagocytarnych zbudowany jest ze związanego z błoną komórkową heterodimerowego kompleksu – flawocytochromu b_{558} składającego się z podjednostki 22kDa - $p22^{phox}$ (α) oraz podjednostki $gp91^{phox}$ (β). Wzajemna interakcja pomiędzy

tymi komponentami odgrywa kluczową rolę dla stabilności całego kompleksu. Transfer elektronu z NADPH na O_2 odbywa się w obrębie podjednostki gp91^{phox}. Chociaż flawocytochrom zawiera centrum katalityczne, do jego aktywacji niezbędna jest translokacja kilku cytozolowych podjednostek regulujących, ich przyłączenie do błony komórkowej i związanie z cytochromem b₅₅₈ (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, Rac1 lub Rac2).



Ryc. 3. Schemat budowy oksydazy NADPH.

Nox1, Nox2, Nox4 – izoformy podjednostki katalitycznej; Rac, p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, p22^{phox} – podjednostki regulatorowe niezbędne do aktywacji oksydazy NADPH zawierającej Nox1 i Nox2

Fig. 3. Schematic diagram of the structure of the NADPH oxidase.

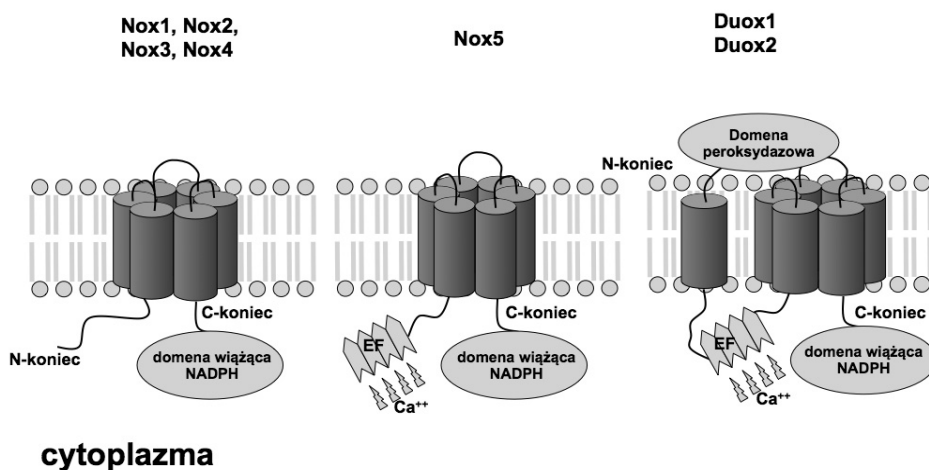
Nox1, Nox2, Nox4 – catalytic subunit isoforms; Rac, p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, p22^{phox} – regulatory subunits of NADPH oxidase containing Nox1 and Nox2

W ostatnich latach stwierdzono, że oksydaza NADPH występuje także w komórkach niefagocytowych. W układzie sercowo-naczyniowym stwierdzono obecność oksydazy NADPH w komórkach mięśni gładkich naczyń (*vascular smooth muscle cells* – VSMCs) [14], komórkach śródbłonka [144], komórkach

przydanki naczyń, fibroblastach mięśnia serca [16] oraz w kardiomiocytach [108]. Komórki te produkują wolne rodniki konstytutywnie. Dodatkowo różne bodźce mogą zwiększać produkcję wolnych rodników. Wolne rodniki wytwarzane przez oksydazę NADPH uważane są aktualnie za ważny drugi przebieżnik regulujący między innymi przerost i przebudowę serca [138].

W komórkach nie-fagocytowych oksydaza NADPH zbudowana jest z heterodimerowej domeny katalitycznej, wytwarzającej wolne rodniki poprzez transferu elektronu z NADPH, oraz podjednostki regulatorowej, o niskiej masie cząsteczkowej zwanej p22^{phox} [107]. Domena katalityczna według nowej nomenklatury zwana jest Nox (od NADPH oxydase, dawniej gp91^{phox}) i występuje w siedmiu różnych izoformach, spośród których tylko Nox1, Nox3 i Nox4 mają podobną strukturę do gp91^{phox} (Nox2 - według nowej nomenklatury). Na podstawie budowy rodzina Nox została podzielona na 3 grupy: (i) Nox1-Nox4, zawierająca 6 przezłonowych domen charakterystycznych dla wszystkich izoform Nox, oraz na C-końcu domenę wiążącą flawiny, (ii) Nox5 zbudowana na tej samej podstawowej strukturze jak Nox1-4, ale dodatkowo posiada domenę podobną do kalmoduliny wiążącą Ca²⁺ na N-końcu, (iii) Duox1 i Duox2 posiadają na N-końcu domenę peroksydazowa [27]. Różne podjednostki Nox mają podobną strukturę do Nox2. Podobieństwo to sięga 59% w przypadku Nox3 i 21% w przypadku Nox5 (ryc. 4).

Poszczególne izoformy są kodowane przez różne geny, a ich ekspresja jest specyficzna dla różnych komórek i tkanek, które mogą posiadać więcej niż jedną formę Nox. Dla przykładu Nox1 występuje w gruczole krokowym, macicy i VSMC [175, 179], Nox3 - w komórkach płodowych i w komórkach ucha środkowego [30, 31], a Nox4 w wielu tkankach ludzkich wliczając trzustkę, łożysko, serce, naczynia, jajniki, jądra, mięśnie szkieletowe oraz nerki [4]. Nox5 stwierdzano w komórkach płodowych, a u dorosłych w jądrach, śledzionie, jajnikach, łożysku i trzustce [11]. Odnośnie układu sercowo-naczyniowego Nox1 wykryto w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń (VSMC), Nox2 w komórkach śródbłonna, kardiomiocytach i fibroblastach, a Nox4 w komórkach śródbłonna naczyń, komórkach mięśni gładkich naczyń (VSMCs), kardiomiocytach i fibroblastach. Występujący w komórkach śródbłonna Nox5 reguluje proliferację komórkową i przemianę komórek śródbłonna w struktury przypominające naczynia [15, 28]. Podstawowymi izoformami regulującymi funkcję śródbłonna naczyń oraz wpływającymi na zależną od śródbłonna rozszerzenie naczyń są Nox2 oraz Nox4.



cytoplazma

Ryc. 4. Budowa izoformy domeny katalitycznej oksydazy NADPH (Nox).

Podstawę wszystkich izoform stanowi przezbłonowe sześcioheliksowe centrum katalityczne ze znajdującą się na C-końcu domeną wiążącą NADPH. Nox5 zawiera na N-końcu sekwencję wiążącą wapń, a izoformy Duox posiadają dodatkową domenę przezbłonową oraz domenę peroksydazową

Fig. 4. *Structure of Nox isoforms.*

The structure of all NADPH oxidase isoforms is based on six transmembrane α -helices catalytic core with binding site for NADPH on C-terminal. Nox 5 contains a calcium-binding sequence on N-terminal site and Duox isoforms have additional peroxidase domain

Aktywność oksydazy NADPH podlega ścisłej regulacji i może być modyfikowana w różny sposób, między innymi poprzez regulację ekspresji poszczególnych komponent kompleksu [51]. Jedynie aktywacja klasycznej formy oksydazy NADPH nie wymaga translokacji cytosolowych jednostek regulujących: $p67^{\text{phox}}$, Rac, $p47^{\text{phox}}$ i $p40^{\text{phox}}$ oraz ich związania do jednostki katalitycznej Nox [107]. Wymienione podjednostki regulujące są niezbędne do aktywacji innych izoform oksydazy NADPH. Wszystkie podjednostki oksydazy NADPH występują w komórkach śródbłonka naczyniowego [14, 71, 93, 115]. Pomimo podobnej budowy, funkcjonalnie oksydaza fagocytarna znacznie różni się od kompleksu występującego w komórkach śródbłonka. Po pierwsze komórki śródbłonka uwalniają małe ilości wolnych rodników w sposób ciągły, ale aktywność enzymu może być zwiększona w wyniku działania odpowiednich agonistów. Po drugie większość rodnika ponadtlenkowego produkowanego w komórkach śródbłonka

jest wytwarzana wewnątrzkomórkowo w przeciwieństwie do fagocytarnej oksydazy NADPH, która uwalnia rodniki do przestrzeni pozakomórkowej.

p67^{phox} zwana jest podjednostką aktywującą (*activator component*), ponieważ inicjuje transport elektronu. Translokacja p67^{phox} z cytosolu do błony komórkowej jest zależna od dwóch pozostałych podjednostek regulujących: p47^{phox} - zwanej podjednostką organizującą (*organizing component*) oraz podjednostki p40^{phox}. Uważa się, że podjednostki te stabilizują kompleks oksydazy NADPH poprzez jego zakotwiczenie do błony komórkowej oraz do podjednostki p22^{phox}. W wielu badaniach wykazano, że małe GTP-azy z nadrodziny Ras pełnią ważną funkcję w regulacji aktywności układu redox [42]. Do białek z tej rodziny należy małe białko Rac. Rac związany z GDP, ulega modyfikacji z geranylgeranyl i konwersji do aktywnego kompleksu z GTP. Aktywowany complex GTP-Rac łączy się z N-końcowa domeną p67^{phox} i w ten sposób reguluje aktywność kompleksu [19] (ryc. 3).

Regulacja aktywności cząstek regulacyjnych, oprócz zmiany ekspresji, odbywa się również poprzez posttranslacyjną modyfikację. Na przykład fosforylacja białka p47^{phox} umożliwia jego związanie z p67^{phox} oraz interakcję z p22^{phox}. Ostatnio wykryto również istnienie homologów p47^{phox} i p67^{phox}, NoxO1 (od *Nox Organizer 1*) i NoxA1 (od *Nox Activator 1*). Dodatkowo NoxO1 – homolog p47^{phox} – występuje w 4 izoformach różniących się między sobą unikalnymi N-końcowymi domenami PX powstałymi w wyniku różnego podziału mRNA. NoxO1 α , β , γ , δ występują w różnych kompartmentach wewnątrzkomórkowych, zależnie od długości domeny PX [186]. Wciąż nie jest jasne jak różne izoformy podjednostek regulujących wpływają na aktywność Nox i jaką pełnią rolę w układzie sercowo-naczyniowym.

W przeciwieństwie do Nox1 i Nox2 oksydaza NADPH zawierająca Nox4 nie wymaga do aktywacji interakcji z p47^{phox}, p67^{phox} czy Rac. Nox4 jest aktywna stale i uwalnia ROS w sposób ciągły (konstytutywny) (ryc. 3).

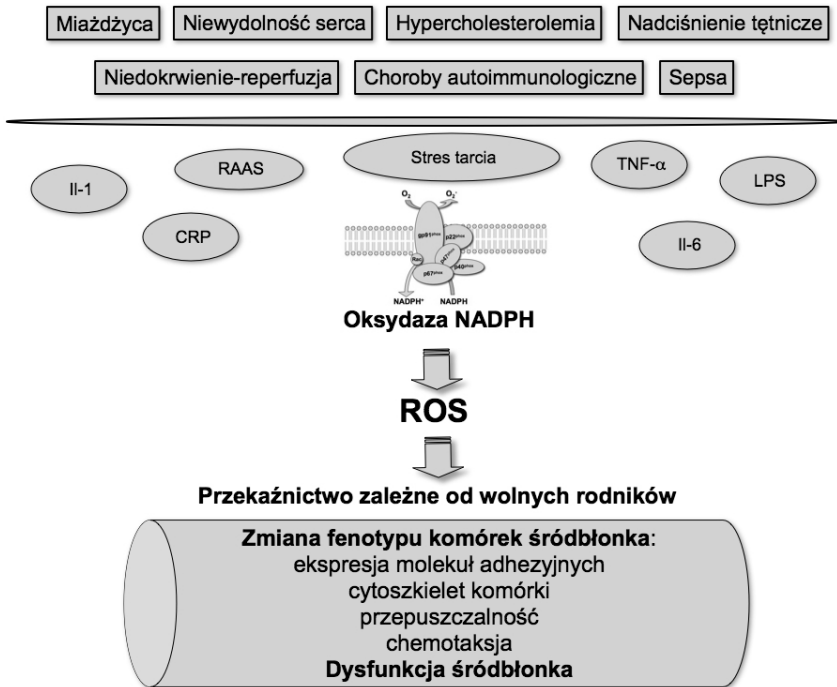
Aktywacja oksydazy NADPH odbywa się poprzez: (i) aktywację receptorów związanych z białkiem G (angiotensyna II, ET-1) [49, 120]; (ii) cytokiny np.: TNF- α (*tumor necrosis factor α*) [66]; (iii) czynniki wzrostu np. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) i insulinę [189]; (iv) czynniki metaboliczne np. podwyższone stężenie glukozy, hyperinsulinemia, ox-LDL (*Oxidase low-density lipoprotein*) [90, 98, 161, 193]; (v) niedokrwienie i reperfuzję [103] oraz (vi) bodźce mechaniczne np. stres tarcia (*oscillatory shear stress*) [87]. Zwiększona aktywność oksydazy NADPH wynika z ostrego zwiększenia aktywności kompleksu (wtórnie do posttranslacyjnej modyfikacji podjednostek regulatorowych) lub z przewlekłego zwiększenia ekspresji poszczególnych podjednostek na poziomie transkrypcji lub/i translacji.

1.6. Podsumowanie

Zwiększony stres oksydacyjny pełni ważną rolę w upośledzeniu funkcji śródbłonka naczyń w wielu stanach chorobowych. W ostatnich latach wykazano, że jednym z głównych źródeł wolnych rodników, odpowiedzialnym za zwiększenie stresu oksydacyjnego jest naczyniowa oksydaza NADPH. Wszystkie tradycyjne czynniki ryzyka miażdżycy, wliczając hypercholesterolemię, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę oraz palenie papierosów, są związane z występowaniem dysfunkcji śródbłonka, która przynajmniej częściowo jest efektem zwiększonej produkcji wolnych rodników. Analiza tkanek naczyniowych pobranych od pacjentów poddanych zabiegowi przeszłowania aortalno-więcowego wykazała, że oksydaza NADPH stanowi główne źródło wolnych rodników, nie tylko w badaniach eksperymentalnych, ale również w warunkach klinicznych [73]. Oksydaza NADPH pełni centralną rolę w regulacji poziomu stresu oksydacyjnego a wytwarzany przez nią rodnik ponadtlenkowy pobudza inne układy enzymatyczne do wytwarzania wolnych rodników [173].

Spośród czynników ryzyka miażdżycy, szczególnie silnym aktywatorem oksydazy NADPH prowadzącym do upośledzenia funkcji śródbłonka jest cukrzyca. W naczyniach pobranych od pacjentów z cukrzycą potwierdzono istotne zwiększenie aktywności oksydazy NADPH oraz zwiększenie ekspresji jej podjednostek [74].

Upośledzenie funkcji śródbłonka jest ważną cechą niewydolności serca, przyczyniającą się do zwiększonego oporu obwodowego. U podłoża niewydolności śródbłonka leży między innymi zwiększenie stresu oksydacyjnego. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że wolne rodniki produkowane przez oksydazę NADPH powodują zaburzenie czynności śródbłonka naczyń w niewydolności serca [13]. Dodatkowo rodnik ponadtlenkowy wytwarzany przez śródbłonkową oksydazę NADPH może wpływać na kurczliwość mięśnia sercowego inaktywując NO [124]. W badaniach eksperymentalnych potwierdzono, że oksydaza NADPH pełni kluczową rolę w procesie przebudowy serca, regulując przerost i włóknienie mięśnia sercowego [16, 23]. Dotychczas nie potwierdzono, jaką rolę w regulacji dysfunkcji śródbłonka u chorych z niewydolnością serca pełnią wolne rodniki wytwarzane przez oksydazę NADPH (ryc. 5).



Ryc. 5. Rola oksydazy NADPH w regulacji funkcji śródbłónka

Fig. 5. The role of NADPH oxidase in regulating function of endothelium

2. CELE PODJĘTYCH BADAŃ

Celami podjętych badań było:

1. Ocena wpływu wolnych rodników tlenowych na zaburzenia funkcji śródbłonka naczyń u chorych z niewydolnością serca.
2. Określenie roli oksydazy NADPH i jej różnych izoform w patogenezie niewydolności śródbłonka naczyń.
3. Ocena wpływu cytokin zapalnych na produkcję wolnych rodników i aktywność oksydazy NADPH.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał kliniczny

Do badania kwalifikowano pacjentów skierowanych do *Kings College Hospital* (Londyn, Anglia) na zabieg przeszłowania naczyń wieńcowych z powodu choroby wieńcowej. Badania uzyskały pozytywną opinię lokalnej Komisji Etycznej, a pacjenci wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Do badania włączono 19 chorych z rozpoznaną niewydolnością serca. Rozpoznanie niewydolności serca opierało się na konwencjonalnych kryteriach, tzn. typowe objawy kliniczne oraz echocardiograficzne cechy niewydolności skurczowej serca z frakcją wyrzutową (*ejection fraction* – EF) obniżoną poniżej 45%. Grupa kontrolna składała się z 35 pacjentów z chorobą wieńcową oraz prawidłową funkcją skurczową lewej komory (EF powyżej 50%).

Do badań wykorzystano fragmenty żyły odpiszczelowej, które nie zostały użyte do przeszłowania naczyń wieńcowych. Natychmiast po pobraniu, połowa materiału przeznaczona do badań molekularnych była umieszczana w ciekłym azocie, a następnie przechowywana w temp -80°C . Drugą część przeznaczoną do badań czynnościowych umieszczano w schłodzonym i natlenowanym roztworze Krebsa-Henseleita.

3.2. Oznaczenia markerów zapalenia

Przed zabiegiem kardiochirurgicznym pobierano krew na czczo i w lokalnym laboratorium oznaczano stężenie całkowitego cholesterolu (*total cholesterol* - TC), cholesterolu lipoprotein o dużej gęstości (*high-density lipoprotein* - HDL), cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (*low-density lipoprotein* - LDL), trójglicerydów (TG), glukozy i kreatyniny. Surowicę do oznaczeń stężenia białka C-reaktywnego (*C-reactive protein* - CRP), czynnika martwicy guza- α (*tumor necrosis factor- α* - TNF- α) oraz interleukiny 6 (IL-6) przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analizy. CRP oznaczano używając metody immunoturbidymetrycznej o wysokiej czułości (*WAKO Chemicals, Neuss, Niemcy*) oraz zestawu Cobas Mira Analyser (*Roche Diagnostics, Lewes, Wielka Brytania*). Najniższe wykrywalne stężenie CRP wynosiło 0,2 mg/l. Współczynnik zmienności w obrębie grupy wynosił 3,1% przy stężeniu 5,0 mg/l. Stężenia TNF- α i IL-6 oznaczano używając dostępnych komercyjnie testów immunoenzymatycznych ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays, R&D Systems, Minneapolis, USA*). Współczynnik zmienności dla TNF- α wynosił 9%, a dla IL-6 $<9\%$.

3.3. Ocena funkcji wazomotorycznej

Segmenty żyły odpiszczelowej do badań *in vitro* transportowano natychmiast do pracowni fizjologicznej. Po uważnym oczyszczeniu żył z otaczającej tkanki łącznej, pierścienie o szerokości 4 mm umieszczano w naczyniach do badań narządów izolowanych o pojemności 10 ml (Letica, Barcelona, Hiszpania) zawierających roztwór Krebsa-Henseleita w składzie: NaCl 119 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l, KH₂PO₄ 1,18 mmol/l, NaHCO₃ 25 mmol/l, MgSO₄ 1,19 mmol/l, CaCl₂ 2,5 mmol/l, glukoza 11,04 mmol/l. Podczas eksperymentu utrzymywano stałą temperaturę 37°C, oraz napowietrznie mieszaną 95%O₂/5%CO₂, tak aby utrzymać stałe fizjologiczne pH 7,4. Siłę skurczu mierzono używając przetwornika izometrycznego, systemu PowerLab 8/SP oraz oprogramowania Chart v 4.2.3 (ADInstruments Ltd, Chalgrove, UK).

Po 45 minutach inkubacji pierścieni naczyniowych pod stałym obciążeniem 3 g, mierzono maksymalny skurcz w odpowiedzi na 80 mmol/l KCl, a następnie konstruowano krzywe zależności efekt-dawka w odpowiedzi na kumulacyjne dawki fenylefryny (w stężeniach od 1 nmol/l do 1mmol/l). Po osiągnięciu 70% maksymalnego skurczu w odpowiedzi na fenylefrynę mierzono rozkurcz zależny od śródbłonna w odpowiedzi na kumulacyjne dawki agonisty receptorów muskarynowych - acetylocholiny (w stężeniach od 1 nmol/l do 0,01 mmol/l) oraz rozkurcz niezależny od śródbłonna w odpowiedzi na nitroprusydek sodu (SNP; w stężeniach od 0,1 nmol/l do 0,1 mmol/l). Badania czynności naczyniowskurczowej, wytwarzania wolnych rodników oraz RT-PCR były oznaczane metodą ślepej próby.

3.4. Ocena produkcji wolnych rodników

Wytwarzanie wolnych rodników oznaczano w homogenatach żył odpiszczelowych używając techniki chemiluminescencji wzmocnionej przez lucigeninę (*lucigenin-enhanced chemiluminescence*). Tkankę homogenizowano w ciepłym azocie i rozcieńczano z buforem w składzie 20 mmol/l KH₂PO₄, 1 mmol EGTA, 2 μl inhibitorów proteaz/20 mg tkanki, o pH 7,0. Tak przygotowaną zawiesinę umieszczano na 96-studzienkowej płytce dodając NADPH (300 μmol/l) oraz zaadaptowaną do ciemności lucigeninę (5 μmol/l), po czym dokonywano pomiaru chemiluminescencji. Produkcję rodnika ponadtlenkowego wyrażano w jednostkach świetlnych zarejestrowanych w czasie 20 minut, jako powierzchnię pod krzywą (*arbitrary light units* - ALU). W celu oznaczenia źródeł wolnych rodników homogenaty żył odpiszczelowych inkubowano przez 15 minut z substancjami blokującymi wytwarzanie wolnych rodników: przechodzącym przez błony komórkowe wymiataczem nadtlennym Tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid; 20 mmol/l), inhibitorem enzymów fławoproteinowych -

diphenyleneiodonium (DPI; 10 $\mu\text{mol/l}$), inhibitorem NOS L-NAME (N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester; 100 $\mu\text{mol/l}$), inhibitorem oksydazy ksantynowej - allopurynol (100 $\mu\text{mol/l}$) oraz blokerem kompleksu I łańcucha oddechowego (oksydoreduktazy dinukleotydu nikotynoadeninowego-koenzym Q) - rotenon (2 $\mu\text{mol/l}$).

3.5. Ocena ekspresji podjednostek oksydazy NADPH oraz izoform syntazy tlenu azotu metodą RT-PCR

Ekspresja podjednostek oksydazy NADPH oraz NOS była określana przy zastosowaniu techniki odwrotnej transkrypcji sprzężonej z łańcuchową reakcją polimerazową z analizą w czasie rzeczywistym (*reverse transcription-polymerase chain reaction* – RT-PCR). RNA izolowano z zamrożonych fragmentów żył odpiszczelowych używając zestawu RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen). cDNA syntezowano używając zestawu Omniscript kit (Qiagen) oraz randomicznych dekamerów.

Reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) przeprowadzono używając ABI PRISM 7700 (*Applied Biosystems*) oraz wykorzystując zestaw SYBR Green. Zestaw zawiera zoptymalizowane stężenie barwnika fluorescencyjnego mającego zdolność do wiązania się z podwójną nicią DNA i jednoczesnej emisji sygnału fluorescencji. Umożliwia to ocenę ilościową genów bez konieczności użycia specyficznej sondy fluorescencyjnej. Warunki termiczne reakcji to: początkowy cykl - odwrotna transkrypcja 50°C przez 2 min, aktywacja polimerazy 95°C przez 10 min; następnie 40 cykli obejmujących: denaturację w 95°C przez 15 s i hybrydyzację starterów z matrycą w 60°C przez 1 min. Poziom ekspresji wszystkich transkryptów oceniano używając krzywych standardowych na podstawie znanych stężeń transkryptu oraz normalizowano do beta-aktyny. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej reakcji RT-PCR zastosowano różne znane stężenia wzorca w tej samej mieszaninie reakcyjnej, której używano w badanych próbkach.

Primery do amplifikacji zaprojektowano, korzystając z programu komputerowego Primer Express TM Version 1.0, na podstawie bazy danych GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/genbank>). Użyte sekwencje primerów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Sekwencje primerów użytych do reakcji RT-PCR
Table 1. Primers sequences used for RT-PCR

Gen <i>Gene</i>	Starter F/ <i>Forwad primer</i>	Starter R/ <i>Reverse primer</i>
<i>Nox1</i>	CACAAGAAAATCCTTGGGTCAA	GACAGCAGATTGCGACACACA
<i>Nox2</i>	CAAGATGCGTGGAACCTACCTAAGAT	CCCTGCTCCCCTAACATCA
<i>Nox4</i>	CAGCAAGATACCGAGATGAGGA	GTAGAGGCTGTGATCATGAGGAATAG
<i>eNOS</i>	GAACAGCACAAAGAGTTATAAGATCCG	GCACTGTCTGTGTTACTGGACTCCT
<i>nNOS</i>	CACCCTGCGTACGAA	GCTGAAAACCTCATCGGTGTCT
<i>iNOS</i>	TGGAACATCCCAAATACGAGT	TGCCCATGTACCAGCCATT
<i>p22^{phox}</i>	GGCTCCACCATGGAGCG	CAGGAGATGCAGGACGGC
<i>p67^{phox}</i>	GCACTACAAGTACACGGTAGTCATGAA	CGAGGCCGATAGCCAGCT
<i>p47^{phox}</i>	TTCAAGGTGCGCCCTGAT	TGATGTCTGTCCGGTACTCTT
<i>β-aktyna</i>	GCGAGAAGATGACCCAGATCA	TCACCGGAGTCCATCACGAT

3.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono używając pakietu statystycznego SPSS 13 (SPSS, Inc, Chicago, Il). Dane wyrażano jako średnią \pm błąd standardowy (SE – *standard error*). Używając testu Kołmogorova-Smirnova sprawdzono, czy rozkłady analizowanych parametrów są zbliżone do normalnego. W celu porównanie podstawowej charakterystyki klinicznej pomiędzy grupami użyto testu χ^2 , dla rozkładów normalnych stosowano test t-Studenta, a dla rozkładów odbiegających od normalnego — test U Manna-Whitneya. Do porównania kilku grup używano jednostronnej ANOVA, a następnie testu Scheffe, lub w przypadkach niejednorodnej wariancji pomiędzy testowanymi grupami, testu nieparametrycznego Mann-Whitney. Do oceny jednorodności wariancji używano testu Levene. Korelację pomiędzy dwoma zmiennymi ciągłymi oceniano przy użyciu korelacji liniowej Pearson'a. Do oceny związku pomiędzy zmiennymi ciągłymi a zmiennymi porządkowymi używano modelu regresji liniowej. W celu oceny wpływu różnych zmiennych na uwalnianie wolnych rodników przeprowadzono analizę regresji logistycznej. Do analizowanego modelu wprowadzono zmienne, które potencjalnie wpływają na produkcję wolnych rodników a następnie przeprowadzono ich stopniową eliminację tak, aby osiągnąć najlepsze dopasowanie modelu. W badaniach statystycznych za poziom istotności przyjęto $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka kliniczna

Podstawowe dane kliniczne przedstawiono w tabeli 2. Pacjenci z niewydolnością serca mieli znamienne niższą frakcję wyrzutową ($37,5 \pm 1,7\%$) w porównaniu do chorych z grupy kontrolnej ($>50\%$). Obie grupy badane nie różniły się pomiędzy sobą odnośnie wieku, płci oraz czynników ryzyka choroby wieńcowej (wliczając nadciśnienie tętnicze, palenie papierosów i hypercholesterolemię). Zaawansowanie choroby wieńcowej było również podobne w obu badanych grupach: choroba dwunaczyniowa (11 vs 10%), choroba trójnaczyniowa (51% vs 63%) oraz choroba pnia lewej tętnicy wieńcowej (37 vs 26%). Zgodnie z oczekiwaniami w grupie z niewydolnością serca znamienne więcej pacjentów chorowało na cukrzycę, przeżyło zawał serca oraz miało upośledzoną funkcję nerek (zdefiniowaną jako podwyższoną kreatyninę powyżej 105 mmol/l). Poziom cholesterolu całkowitego oraz trójglicerydów był podobny w obu grupach.

Znamienne więcej pacjentów z niewydolnością serca przyjmowało inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę lub/i blokery receptora aniotensyny II (68% vs 40%, $p < 0,05$) oraz leki moczopędne (63% vs 14%, $p < 0,05$). Nie było znamiennej różnicy odnośnie stosowania innych leków: leki przeciwplatekcyjne (83% vs 89%), beta-blokery (77% vs 53%), statyny (91% vs 89%) oraz leki przeciwdławicowe (89% vs 68%).

Tabela 2. Charakterystyka kliniczna badanych grup
Table 2. Clinical characteristics of studied groups

	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=35)	Niewydolność serca <i>Heart Failure Group</i> (n=19)
Wiek w latach (średnia±SE) <i>Age in years (mean±SE)</i>	63±8	65±6
Płeć, M:K <i>Gender, M:F</i>	35:0	18:1
Czynniki ryzyka choroby wieńcowej <i>Cardiovascular risk factors</i>		
Palenie papierosów, n (%) <i>Smoking, n (%)</i>	24 (69)	15 (79)
Nadciśnienie tętnicze, n (%) <i>Hypertension, n (%)</i>	28 (80)	14 (74)
Cukrzyca, n (%) <i>Diabetes, n (%)</i>	6 (17)	8 (42)*
Hypercholesterolemia, n (%) <i>Hypercholesterolemia, n (%)</i>	28 (80)	16 (84)
Ryzyko wg Framingham Risk Score, średnia±SE <i>Framingham Risk Score, mean±SE</i>	13,7±0,5	13,5±0,6
Zespół metaboliczny, n (%) <i>Metabolic syndrome, n (%)</i>	17 (49)	8 (42)
Przebyty zawał serca, n (%) <i>Previous myocardial infarction, n (%)</i>	16 (46)	16 (84)*
Zawał serca bez załamka Q, n (%) <i>Non-Q wave myocardial infarction, n (%)</i>	11(31)	1(5)
Zawał serca z załamkiem Q, n (%) <i>Q-wave myocardial infarction, n (%)</i>	5(14)	15(79)
BMI, średnia±SE <i>BMI, mean±SE</i>	26,9±0,7	27,9±1,2
Niewydolność nerek, n (%) <i>Renal failure, n (%)</i>	1 (3)	7 (37)*
Cholesterol całkowity, mmol/l, średnia±SE <i>Total cholesterol, mmol/l, mean±SE</i>	3,4±0,1	3,1±0,2
LDL-cholesterol, mmol/l, średnia±SE <i>LDL-cholesterol, mmol/l, mean±SE</i>	1,8±0,1	1,5±0,1
HDL-cholesterol, mmol/l, średnia±SE <i>HDL-cholesterol, mmol/l, mean±SE</i>	0,95±0,05	0,93±0,06
Trójglicerydy, mmol/l, średnia±SE <i>Triglycerides, mmol/l, mean±SE</i>	1,4±0,1	1,3±0,2
Glukoza na czczo, mmol/l, średnia±SE <i>Fasting glucose, mmol/l, mean±SE</i>	6,5±0,3	7,2±0,9
Kreatynina, mmol/l, średnia±SE <i>Creatine, mmol/l, mean±SE</i>	89±2	119±18*

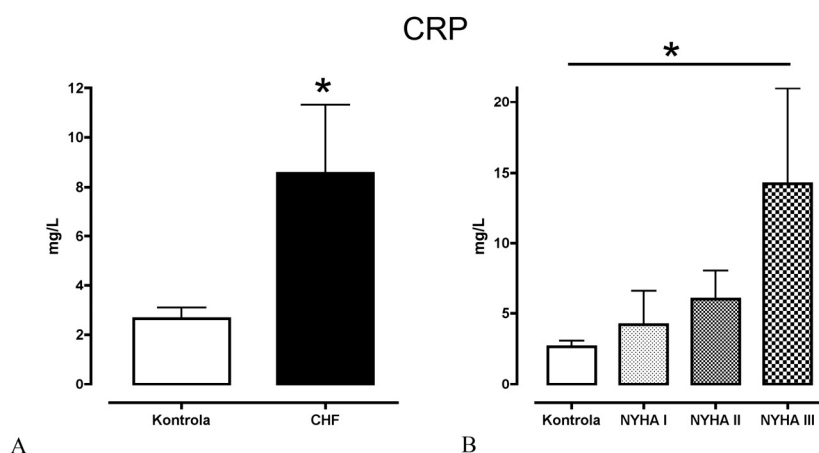
	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=35)	Niewydolność serca <i>Heart Failure Group</i> (n=19)
Skurczowe ciśnienie tętnicze, mmHg, średnia±SEM <i>Systolic blood pressure, mmHg, mean±SE</i>	143±4	129±6
Rozkurczowe ciśnienie tętnicze, mmHg, średnia±SE <i>Diastolic blood pressure, mmHg, mean±SE</i>	76±2	72±3
EF, %, średnia±SE EF, %, <i>mean±SE</i>	>50	37,5±1,7
Stosowane leki <i>Concomitant medication</i>		
Kwas acetylosalicylowy, n (%) <i>Acetylsalicylic acid, n(%)</i>	27 (77)	17 (89)
Klopidogrel, n (%) Clopidogrel, n (%)	9 (26)	1 (5)
Beta-bloker, n (%) Beta-blockers, n (%)	27 (77)	10 (53)
Statyny, n (%) Statins, n (%)	32 (91)	17 (89)
ATIIR/ACEI, n (%) ATIIR/ACEI, n (%)	14 (40)	13 (68)*
Antagoniści receptora angiotensynowego, n (%) <i>Angiotensin receptor antagonist, n (%)</i>	0 (0)	6 (31)*
ACEI, n (%) <i>ACEI, n (%)</i>	14 (40)	8 (42)
Nitraty, n (%) <i>Nitrates, n (%)</i>	24 (69)	10 (53)
Blokery kanałów wapniowych, n (%) <i>Calcium channel blockers, n (%)</i>	17 (49)	7 (37)
Insulina, n (%) <i>Insulin, n (%)</i>	1 (3)	5 (26)*
Doustne leki przeciwcukrzycowe, n (%) <i>Oral hypoglycaemic agents, n (%)</i>	1 (3)	2 (10)
Diuretyki, n (%) <i>Diuretics, n (%)</i>	5 (14)	12 (63)*

Test Chi² dla zmiennych nominalnych, *p<0,05

Test Studenta dla zmiennych ciągłych, *p<0,05

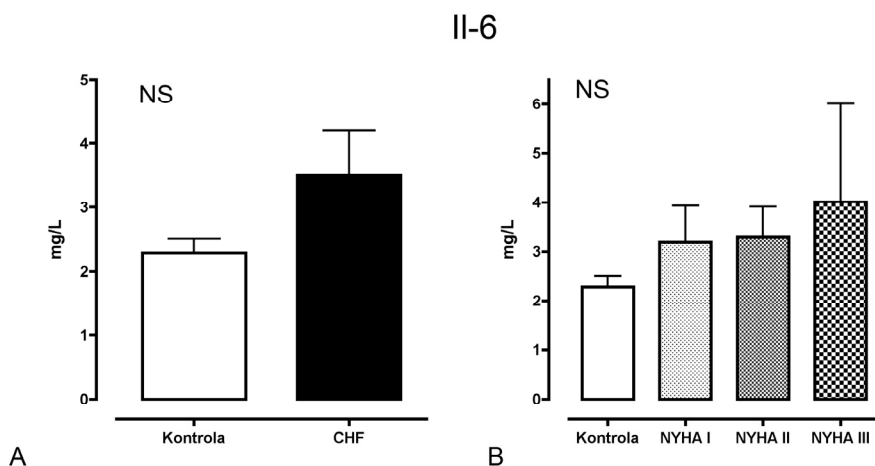
4.2. Cytokiny zapalne

Stężenie białka C-reaktywnego było znacznie wyższe u chorych z niewydolnością serca (ryc. 6A). Dodatkowo stężenie CRP dobrze korelowało z zaawansowaniem klinicznym i stopniem niewydolności serca według klasyfikacji NYHA, nawet po uwzględnieniu cukrzycy oraz niewydolności nerek (ryc. 6B). Poziomy TNF- α oraz IL-6 były wyższe, nie osiągnęły jednak znaczenia statystycznego (ryciny 7, 8). Stwierdzono znaczącą statystycznie zależność pomiędzy poziomem IL-6 oraz CRP ($r=0,627$; $p<0,0001$).



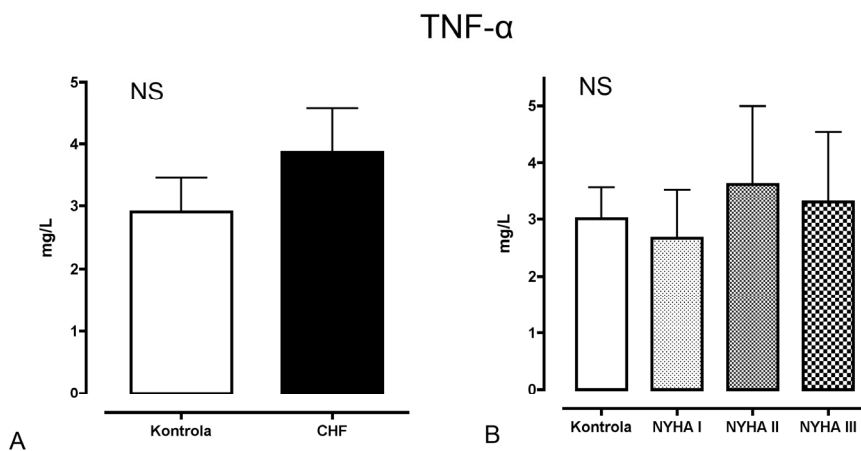
Ryc. 6. A) Stężenie CRP w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej oraz u chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, $*p<0,05$. B) Zależność pomiędzy stężeniem CRP a ciężkością niewydolności serca wg klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, $*p<0,05$

Fig. 6. A) Serum CRP levels in control and heart failure group. T-Student test, $*p<0.05$. B) CRP levels and severity of heart failure by NYHA class. Logistic regression model, $*p<0.05$



Ryc. 7. A) Stężenie II-6 w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej oraz u chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, NS - nieznamienne statystycznie. B) Zależność pomiędzy stężeniem II-6 a ciężkością niewydolności serca wg klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, NS – nieznamienne statystycznie

Fig. 7. A) Serum II-6 levels in control and heart failure group. T-Student test, NS - not significant. B) II-6 levels and severity of heart failure by NYHA class. Linear regression model, NS - not significant

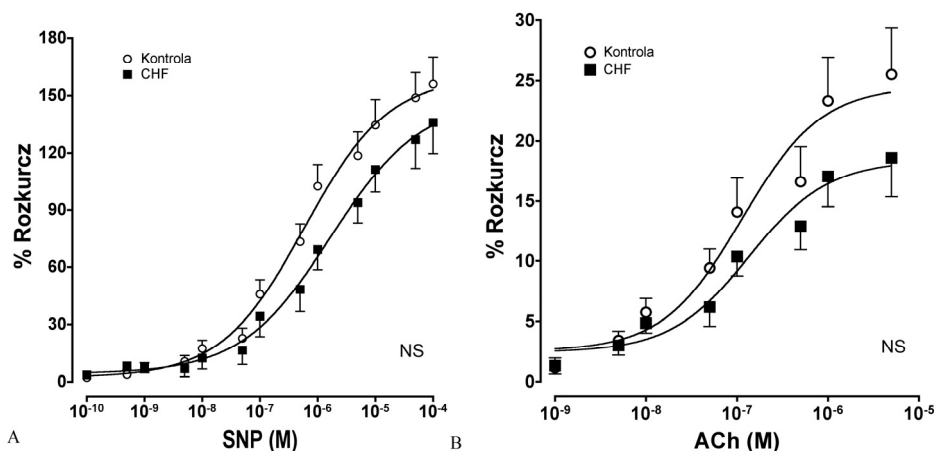


Ryc. 8. A) Stężenie TNF- α w surowicy pacjentów z grupy kontrolnej oraz u chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, NS - nieznamienne statystycznie. B) Zależność pomiędzy stężeniem TNF- α a ciężkością niewydolności serca wg klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, NS – nieznamienne statystycznie

Fig. 8. A) Serum TNF- α levels in control and heart failure group. T-Student test, NS - not significant. B) TNF- α levels and severity of heart failure by NYHA class. Linear regression model, NS - not significant

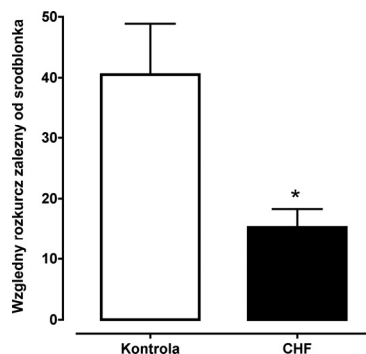
4.3. Funkcja wazomotoryczna

Odpowiedź na czynniki rozkurczające naczynia acetylocholinę i nitroprusydek sodu nie różniła się istotnie w analizie nie-liniowej regresji w całości grupy (ryc. 9), obserwowano jednak znaczną różnorodność w odpowiedzi u poszczególnych pacjentów w badanych grupach. W celu oceny zależnego od śródbłónka rozkurczu naczyń, znormalizowano maksymalną odpowiedź na acetylocholinę względem maksymalnej odpowiedzi na SNP i wynik przedstawiono jako procent rozkurczu. Na rycinie 10 przedstawiono względny rozkurcz naczyń zależny od śródbłónka (znormalizowany względem odpowiedzi na SNP). Wskaźnik ten był znacząco niższy u chorych z niewydolnością serca w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnica ta była znamienne statystycznie nawet po wykluczeniu z analizy pacjentów z cukrzycą ($37,2 \pm 8,8\%$ vs $17,0 \pm 4,7\%$, grupa kontrolna vs niewydolność krążenia; $p < 0,05$). Nie było różnicy w funkcji śródbłónka, gdy analizowano podgrupy pacjentów przyjmujących statyny oraz ACEI/ARB.



Ryc. 9. A) Krzywa zależności efekt-stężenie dla nitroprusydku sodu (SNP). Model regresji nie-liniowej, NS – nieznamienne statystycznie. B) Krzywa zależności efekt-stężenie dla acetylocholinę (ACh). Model regresji nie-liniowej, NS – nieznamienne statystycznie

Fig. 9. A) Dose-effect curve for sodium nitroprusside (SNP). Non-linear regression model, NS – not significant. B) Dose-effect curve for acetylcholine (ACh). Non-linear regression model, NS – not significant



Ryc. 10. Względny rozkurcz naczyń zależny od śródbłonka.

Test t-Studenta, * $p < 0,05$

Fig. 10. Relative endothelium-dependent vasorelaxation.

t-Student test, * $p < 0.05$

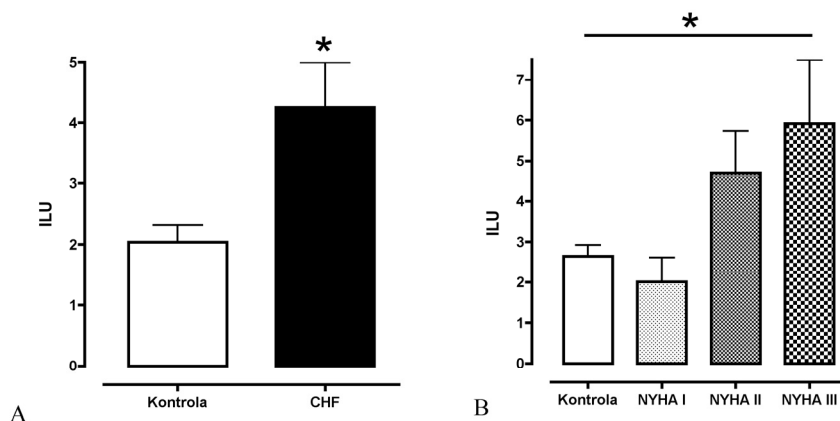
4.4. Produkcja wolnych rodników

Produkcja wolnych rodników była znamienne wyższa w segmentach żył odpiszczelowych pacjentów z niewydolnością serca w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 11A). Podobnie jak w przypadku funkcji śródbłonka ta różnica była istotna statystycznie po wyłączeniu pacjentów z cukrzycą ($2,1 \pm 0,3$ vs $4,5 \pm 0,7$ ILU, grupa kontrolna vs CHF, $p < 0,05$). Dodatkowo stwierdzono występowanie znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy ciężkością niewydolności krążenia ocenianej według klasyfikacji NYHA a poziomem wolnych rodników w modelu regresji liniowej (rycina 11B; $p = 0,0001$). Korelacja ta była niezależna od niewydolności nerek oraz cukrzycy. Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy produkcją wolnych rodników a frakcją wyrzutową. Produkcja wolnych rodników przez segmenty żył odpiszczelowych była prawie całkowicie hamowana przez DPI oraz Tiron. L-NAME, allopurinol oraz rotenone nie wpływał na produkcję wolnych rodników (ryc. 12). Wskazuje to, że głównym źródłem wolnych rodników była oksydaza NADPH.

W celu określenia potencjalnych czynników wpływających na zwiększenie produkcji wolnych rodników zastosowano model wielokrotnej logistycznej regresji, używając produkcji wolnych rodników jako zmiennej zależnej a ciężkości niewydolności serca wg klasyfikacji NYHA, CRP, niewydolności nerek, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego oraz hypercholesterolemii, jako zmiennych niezależnych. Spośród tych zmiennych tylko stopień zaawansowania niewydolności serca według NYHA oraz stężenie CRP korelowały z produkcją wolnych rodników (ryc. 13B, $p < 0,005$, $n = 32$). Na rycinie 13A przedstawiono zależność pomiędzy

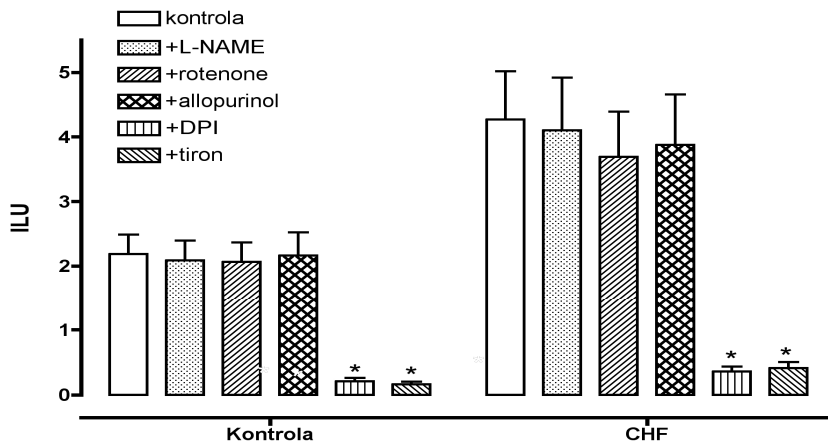
stężeniem CRP a produkcją naczyniową wolnych rodników. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy dysfunkcją śródbłonna a produkcją wolnych rodników, prawdopodobnie w związku z małą liczebnością grupy badanej.

Podobnie jak w przypadku niewydolności śródbłonna, nie stwierdzono istotnej różnicy w wytwarzaniu wolnych rodników, gdy pacjentów podzielono na podstawie przyjmowania statyn oraz ACEI/ARB.



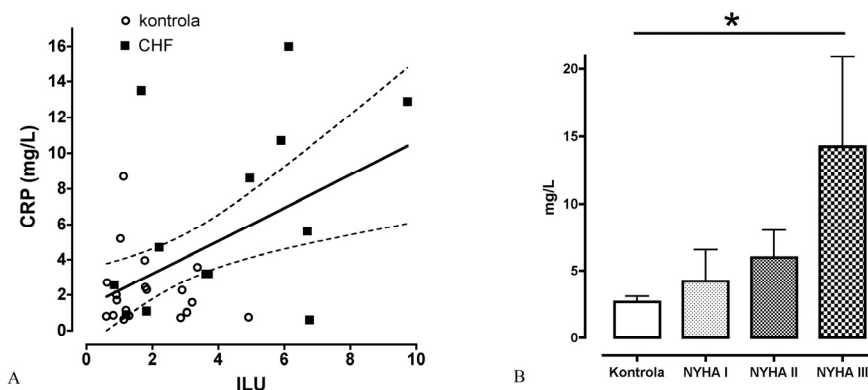
Ryc. 11. A) Naczyniowa produkcja wolnych rodników w grupie kontrolnej oraz u chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, $*p < 0,05$. B) Zależność pomiędzy naczyniową produkcją wolnych rodników a ciężkością niewydolności serca wg klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, $*p < 0,05$

Fig. 11. A) Vascular reactive oxygen species production in control and heart failure group. T-Student test, $*p < 0.05$. B) Correlation of vascular reactive oxygen species production and severity of heart failure by NYHA class. Linear regression model, $*p < 0.05$



Ryc. 12. Naczyniowa produkcja wolnych rodników w grupie kontrolnej oraz u chorych z niewydolnością serca po inkubacji z: przechodzącym przez błony komórkowe wymiataczem nadtlenkowym (Tiron), inhibitorem enzymów flavoproteinowych (DPI), inhibitorem syntazy tlenu azotu (L-NAME), inhibitorem oksydazy ksantynowej (allopurynol) oraz blokerem mitochondrialnego łańcucha oddechowego (Rotenone). ANOVA, test Scheffe, * $p < 0,05$

Fig. 12. Release of rotenon reactive oxygen species in control and heart failure after incubation with a cell-permeable superoxide (Tiron), a NADPH oxidase inhibitor (DPI), a nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME), a xanthine oxidase inhibitor (Allopurinol) and a complex I mitochondrial electron chain inhibitor (Rotenone). ANOVA followed by Scheffe test, * $p < 0.05$

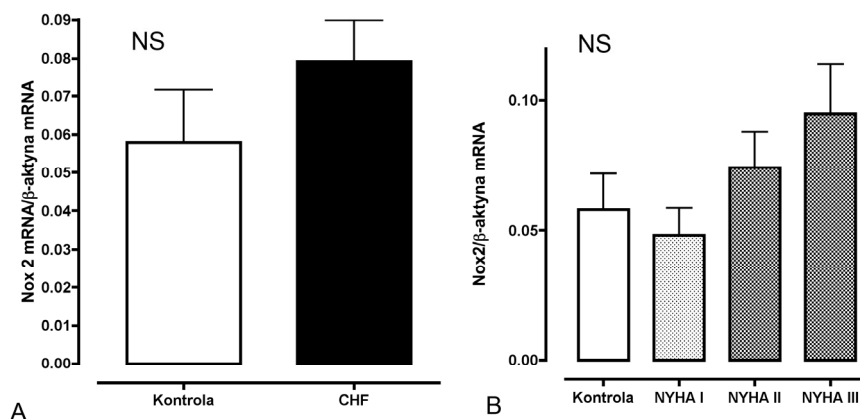


Ryc. 13. A) Korelacja pomiędzy poziomem CRP w surowicy a naczyniową produkcją wolnych rodników. Korelacja Pearsona, $p < 0,05$. B) Poziom CRP w surowicy a ciężkość niewydolności serca wg klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, * $p < 0,05$

Fig. 13. A) Correlation between serum CRP levels and vascular ROS production. Pearson correlation, $p < 0.05$. B) CRP levels and severity of heart failure by NYHA class. Linear regression model, $*p < 0.05$

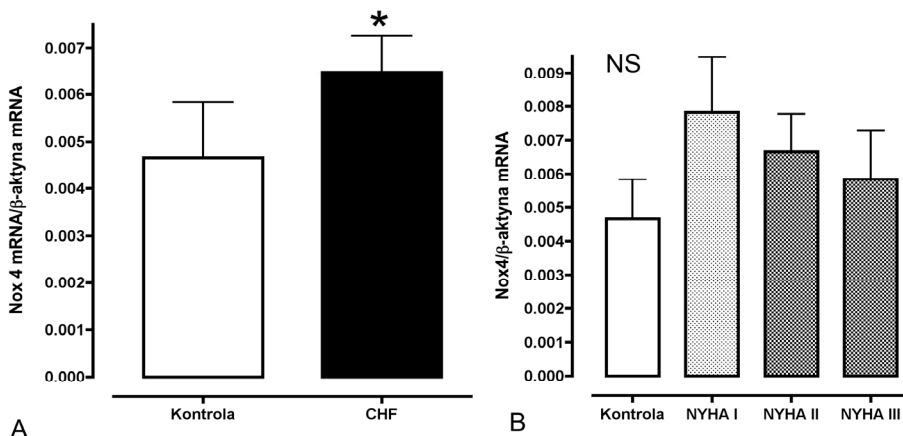
4.5. Ekspresja podjednostek oksydazy NADPH oraz izoform syntazy tlenu azotu

W celu oceny przyczyn zwiększonej aktywności oksydazy NADPH w żyłach odpiszczelowych pacjentów z niewydolnością serca oceniano ekspresję mRNA izoform podjednostki katalitycznej (Nox1, Nox2 oraz Nox4) oraz podjednostek regulatorowych (p47^{phox}, p67^{phox} oraz p22^{phox}). Ekspresja Nox4 była znamienne podwyższona u chorych z niewydolnością serca w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy poziom Nox2 był wyższy, ale nie osiągnął znamienności statystycznej (ryc. 14 i 15). Ekspresja Nox1 była poniżej poziomu wykrywalnego prawie u wszystkich pacjentów w obu badanych grupach. Odnośnie podjednostek regulacyjnych: poziom ekspresji p67^{phox} był znamienne wyższy w grupie niewydolności serca, natomiast poziomy p47^{phox} i p22^{phox} były podobne (ryc. 16). Stwierdzono znamienne korelację pomiędzy ekspresją Nox2 i p67^{phox} ($r = 0,685$; $p < 0,0005$). Odnośnie ekspresji podjednostek NOS nie stwierdzono istotnej różnicy w poziomie mRNA dla eNOS i nNOS pomiędzy badanymi grupami (ryc. 17). Poziomy iNOS było poniżej poziomu detekcyjnego. Dodatkowo stwierdzono znamienne korelację pomiędzy poziomem Nox4 a eNOS ($r = 0,491$; $p < 0,05$).



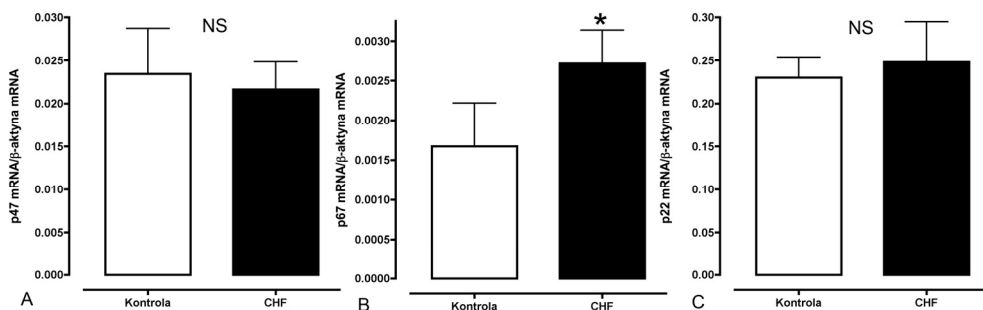
Ryc. 14. A) Ekspresja mRNA dla Nox2 w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. t-Student test, NS – nieznamienne statystycznie. B) Ekspresja mRNA dla Nox2 zależnie od ciężkości niewydolności krążenia według klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, NS – nieznamienne statystycznie

Fig. 14. A) Nox2 mRNA expression in control and heart failure group. t-Student test, NS – not significant. B) Nox2 mRNA expression by NYHA class. Linear regression model, NS – not significant



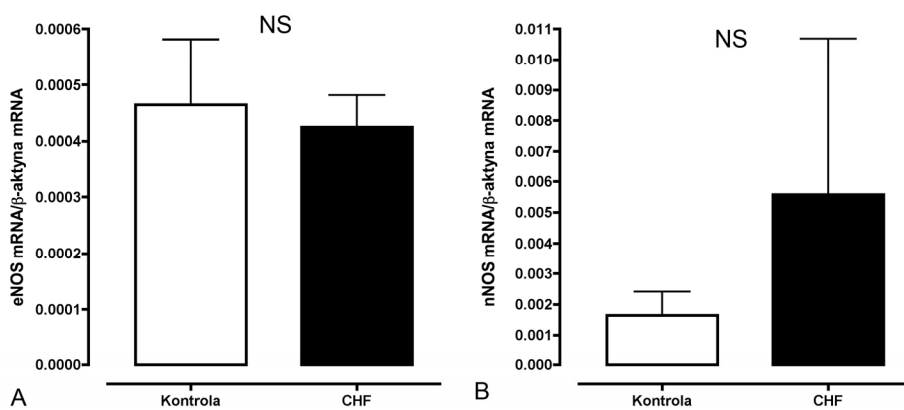
Ryc. 15. A) Ekspresja mRNA dla Nox4 w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, * $p < 0,05$. B) Ekspresja mRNA dla Nox4 zależnie od ciężkości niewydolności krążenia według klasyfikacji NYHA. Model regresji liniowej, NS- nieznamienne statystycznie

Fig. 15. A) *Nox4* mRNA expression in control and heart failure group. *t*-Student test, * $p < 0.05$. B) *Nox4* mRNA expression by NYHA class. Linear regression model, NS – not significant



Ryc. 16. A) Ekspresja mRNA dla p47^{phox} w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. B) Ekspresja mRNA dla p67^{phox} w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. C) Ekspresja mRNA dla p22^{phox} w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, * $p < 0,05$; NS – nieznamienne statystycznie

Fig. 16. A) *p47^{phox}* mRNA expression in control and heart failure group. B) *p67^{phox}* mRNA expression in control and heart failure group. C) *p22^{phox}* mRNA expression in control and heart failure group. *t*-Student test, * $p < 0.05$; NS – not significant



Ryc. 17. A) Ekspresja mRNA dla eNOS w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. B) Ekspresja mRNA dla nNOS w grupie kontrolnej i chorych z niewydolnością serca. Test t-Studenta, NS – nieznamienne statystycznie

Fig. 17. A) *eNOS mRNA expression in control and heart failure group.* B) *nNOS mRNA expression in control and heart failure group.* *t-Student test, NS – not significant*

5. OMÓWIENIE

Niewydolność śródbłonna naczyń u chorych z niewydolnością serca stwierdzano w wielu badaniach, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Niewydolność śródbłonna nie tylko przyczynia się do postępu choroby czy nasilenia objawów niewydolności serca, ale ponadto jest niezależnym czynnikiem rokowniczym [43, 110, 152]. Kluczową rolę w patologii niewydolności śródbłonna odgrywa ograniczenie biodostępności tlenu azotu związane z inaktywacją NO przez wolne rodniki. Źródło wolnych rodników tlenowych w patologii niewydolności serca pozostawało do niedawna nieokreślone.

W przedstawionej rozprawie potwierdzono, że względna, zależna od śródbłonna wazodylatacja jest upośledzona u chorych z niewydolnością serca. Zjawisko występowania upośledzonej funkcji śródbłonna oraz zaburzenia w zależnej od śródbłonna rozszerzenia naczyń u pacjentów z niewydolnością serca zostało opisano po raz pierwszy w 1992 przez Katz i wsp. [102]. Katz, mierząc inwazyjnie przepływ krwi w tętnicy udowej powierzchniowej wykazał, że u chorych z niewydolnością serca, rozkurcz naczyń tętniczych w odpowiedzi na acetylocholinę jest upośledzony. W kolejnych pracach z tego samego ośrodka wykazano, że upośledzenie zależnej od śródbłonna wazorelaksacji jest spowodowane przez zmniejszenie biodostępności NO oraz zmniejszenie reaktywności mięśni gładkich naczyń [100]. Katz i wsp. opisał również zależność pomiędzy zwiększonym stężeniem TNF- α a zmianami przepływu krwi na przedramieniu w odpowiedzi na acetylocholinę i nitroglicerynę u chorych z niewydolnością serca [99].

W niniejszej rozprawie wykazano, że upośledzenie funkcji śródbłonna jest związane ze zwiększeniem produkcji wolnych rodników przez oksydazę NADPH. Do niedawna uważano, że wolne rodniki powodują jedynie uszkodzenie białek strukturalnych komórki, materiału genetycznego oraz enzymów zaangażowanych w produkcję energii a efektem ich działania jest martwica lub apoptozy [70]. Aktualnie uważa się, że takie działanie wolnych rodników ma istotne znaczenie jedynie w zaawansowanej niewydolności serca oraz niedokrwieniu i reperfuzji. Wydaje się, że na wczesnym etapie rozwoju niewydolności serca względnie niewielkie ilości wolnych rodników pełnią istotne funkcje regulacyjne, modulując aktywność wielu molekuł oraz wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych [60]. Dodatkowo, niektóre wolne rodniki, tak jak rodnik ponadtlenkowy, mogą wchodzić w interakcję NO i poprzez zmniejszenie biodostępności NO wpływają na reaktywność naczyń tętniczych i żylnych oraz na kurczliwość lewej komory [142]. W ostatnich latach opublikowano wiele prac dowodzących istotnej rolę stresu oksydacyjnego w regulacji procesów przerostu i przebudowy serca. Wykazano, że w wyniku działania α -agonistów, aniotensyny II, endotheliny,

TNF- α czy czynników mechanicznych dochodzi do zwiększenia wydzielania wolnych rodniki, które jako przekaźnik wewnątrzkomórkowy są zaangażowane w regulację przerostu kardiomyocytów [83, 139, 151]. Dodatkowo wykazano, że zwiększona produkcja wolnych rodników, poprzez wpływ na system metaloproteinaz, aktywuje włóknienie śródmiąższowe oraz okołonaczyniowe [32, 91, 171].

Potencjalnymi źródłami wolnych rodników odpowiedzialnymi za zaburzenia czynności śródbłónka w niewydolności serca mogą być: mitochondria, oksydaza ksantynowa, NOS oraz oksydaza NADPH. Dotychczas jedynie w badaniach eksperymentalnych wykazywano, że zwiększone uwolnienie wolnych rodników przez oksydazę NADPH odgrywa podstawową rolę w rozwoju niewydolności śródbłónka [117, 136] oraz może mieć istotne znaczenie w patofizjologii niewydolności serca [134, 178, 194]. Rolę oksydazy NADPH w niewydolności serca wiązano głównie z regulacją procesów przebudowy mięśnia sercowego [138], nie było natomiast prac oceniających wpływ wolnych rodników uwalnianych przez oksydazę NADPH na funkcję śródbłónka naczyniowego oraz funkcję mięśnia sercowego. Początkowo w badaniach eksperymentalnych, następnie w badaniach klinicznych wykazano, że przerost mięśnia sercowego jest regulowany przez wolne rodniki uwalniane przez oksydazę NADPH. W patologii ludzkiej niewydolności serca stwierdzano zwiększoną ekspresję podjednostek oksydazy NADPH i jej aktywność jedynie w myocardium pobranym od chorych [80, 123]. Na podstawie badań na zwierzętach przypuszczano, że rodzina oksydazy NADPH jest ważnym źródłem wolnych rodników i może brać udział w regulacji funkcji śródbłónka. W wielu pracach wykazywano, że rodnik ponadtlenkowy pełni ważne funkcje regulujące i jako „drugi przekaźnik” może regulować zmiany fenotypu komórek śródbłónka [50].

Rola wolnych rodników uwalnianych przez oksydazę NADPH w regulacji funkcji śródbłónka naczyniowego u chorych z niewydolnością serca pozostawała do niedawna nieokreślona. W prezentowanej pracy wykazano, że wolne rodniki uwalniane przez oksydazę NAPDH odgrywają ważną rolę w regulacji funkcji śródbłónka u chorych z niewydolnością serca. Kolejnym ważnym wynikiem prezentowanych badań jest wykazanie zwiększenia ekspresji izoforny Nox4 oraz podjednostki regulacyjnej p67^{phox}, jako potencjalnych przyczyn zwiększonej aktywności oksydazy NADPH.

Ide i wsp. w serii prac wykazali, że mitochondria mogą być istotnym źródłem wolnych rodników w eksperymentalnym modelu niewydolności serca [88, 89]. W obu badaniach wolnym rodnikiem był głównie rodnik hydroksylowy, a dodatkowo ilość wolnych rodników dobrze korelowała z poziomem niewydolności serca. Ta sama grupa badaczy stwierdziła również na hodowlach kardiomiocytów, że TNF- α zwiększa produkcję wolnych rodników i uszkodzenie mitochondrialnego DNA [174]. We wszystkich tych pracach nie analizowano wpływu oksydazy NADPH na mitochondrialną produkcję ROS. Jak dotychczas

nie ma badań potwierdzających istotną rolę wolnych rodników uwalnianych jedynie przez mitochondria na funkcję śródbłonna u chorych z niewydolnością serca.

Kolejnym ważnym potencjalnym źródłem wolnych rodników jest oksydaza ksantynowa. Zwiększenie ekspresji oraz aktywności oksydazy ksantynowej stwierdzano zarówno u chorych z niewydolnością serca jak i w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach [25, 54, 187]. Dodatkowo wykazano, że długotrwałe podawanie allopurinolu wpływa na przebudowę po eksperymentalnym zawale serca [56]. W dwóch badaniach opublikowanych ostatnio wykazano, że wolne rodniki produkowane przez oksydazę ksantynową przyczyniają się do niewydolności śródbłonna u chorych z niewydolnością serca [57, 110]. Należy jednak podkreślić, że podobnie jak w badaniach dotyczących mitochondrialnego ROS, w pracach tych nie oceniano wolnych rodników uwalnianych przez oksydazę NADPH. Dopiero od niedawna znany jest fakt, że wolne rodniki uwalniane przez kompleks oksydazy NADPH mogą aktywować pozostałe systemy wytwarzające ROS. We wstępie niniejszej rozprawy szczegółowo opisano udział wolnego rodnika ponadtlenkowego w konwersji dehydrogenazy ksantynowej do oksydazy ksantynowej, zwiększeniu mitochondrialnej produkcji ROS, degradacji kofaktora dla syntazy tlenu azotu – czterowodorobiopteryny i aktywacji NOS do produkcji wolnych rodników (*uncoupled NOS*) [109]. Oksydaza NADPH może więc nie tylko powodować niewydolność śródbłonna bezpośrednio, ale także pośrednio poprzez aktywację innych systemów enzymatycznych. Ostatnio opublikowane prace potwierdzają tezę, że kluczową rolę w regulacji stresu oksydacyjnego odgrywają wolne rodniki uwalniane przez oksydazę NADPH.

W prezentowanej rozprawie przedstawiono dowody na istotną rolę wolnych rodników uwalnianych przez oksydazę NADPH w patofizjologii niewydolności śródbłonna u chorych z niewydolnością serca. Wytwarzanie wolnych rodników w badanym materiale było hamowane tylko przez substancje blokujące oksydazę NADPH a nie przez inhibitory innych układów wytwarzających wolne rodniki, wliczając NOS, oksydazę ksantynową oraz enzymy mitochondrialnego kompleksu I. Dowodzi to jednoznacznie, że oksydaza NADPH stanowiła główne źródło wolnych rodników w badanym materiale.

Oksydaza NADPH została po raz pierwszy opisana w granulocytach obojętnochłonnych. Neutrofile zawierają podjednostkę Nox2 (zwaną gp91^{phox}), która transportuje elektron z NADPH na cząsteczkę O₂, a wynikiem tej reakcji jest rodnik ponadtlenkowy [9]. Jak wspomniano we wstępie aktywna forma oksydazy NADPH to kompleks enzymatyczny składający się nie tylko z podjednostki katalitycznej (Nox), ale także z podjednostki stabilizującej kompleks (p22^{phox}), oraz z kilku podjednostek regulatorowych (p47^{phox}, p67^{phox}, Rac). Podjednostka p67^{phox} jest niezbędna do aktywacji oksydazy NADPH zawierającej Nox2.

W wielu badaniach potwierdzono występowanie oksydazy NADPH zawierającej Nox2 poza granulocytami, np. w komórkach śródbłonna, fibroblastach, czy komórkach zapalnych [28]. W ostatnich latach wykazano, że izoformy podjednostki katalitycznej są kodowane przez odrębne geny a ich ekspresja jest różna w zależności od rodzaju komórek i tkanek. Spośród izoform podjednostki katalitycznej, szczególnie ważną funkcję w regulacji funkcji naczyń pełnią Nox2 i Nox4 [107]. Nox2 występuje w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń, a Nox4 w komórkach śródbłonna naczyń [2], komórkach mięśniówki gładkiej naczyń [35] oraz fibroblastach [38]. Obie izoformy, Nox2 i Nox4 występują w komórkach naczyń u ludzi, a dodatkowo jak wykazano w niniejszej rozprawie, ekspresja mRNA dla Nox4 jest znamienne wyższa u chorych z niewydolnością serca. W poprzednich pracach potwierdzono, że aktywność podjednostki katalitycznej Nox4 oksydazy NADPH jest regulowana na poziomie transkrypcji [4, 126, 167]. Zwiększona aktywność oksydazy NADPH i zwiększona produkcja wolnych rodników u chorych z niewydolnością serca może wynikać ze zwiększonej ekspresji Nox4. Aktywność oksydazy zawierającej Nox4 jest również regulowana przez bodźce zapalne, takie jak lipopolisacharydy [148, 149].

W przeciwieństwie do Nox4, aktywność oksydazy zawierającej Nox2 podlega ściślejszej regulacji przez podjednostki regulacyjne p47^{phox} oraz p67^{phox}. Podjednostki regulatorowe bezpośrednio wpływają na stopień aktywności jednostki katalitycznej Nox2 [28]. W przedstawianej pracy wykazano znamienne wzrost ekspresji podjednostki p67^{phox}, która zwiększa aktywność Nox2. Poziomy Nox2 były także wyższe, choć nie znamienne statystycznie. Na podstawie prezentowanych danych Nox1 nie odgrywa istotnej roli w dysfunkcji śródbłonna u chorych z niewydolnością serca, jako że ekspresja mRNA dla Nox1 była bardzo niska w obu badanych grupach.

W wielu badaniach eksperymentalnych *in vivo* wykazano, że w stanach promiażdżycowych, takich jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca i hypercholesterolemia, ekspresja i aktywność Nox2 są zwiększone, natomiast ekspresja Nox4 pozostaje niezmienną [17, 135, 147]. Podobnie w tętnicach wieńcowych u ludzi podstawowym źródłem wolnych rodników jest oksydaza NADPH zawierająca Nox2 [76]. W badaniach na myszach *knockout* nie zawierających Nox1 i Nox2 wykazano, że zwiększenie ekspresji tych izoform podjednostki katalitycznej enzymu oksydazy NADPH, nie jest tylko objawem, ale odgrywa ważną, aktywną rolę w patologii naczyniowej. Dla przykładu podanie angiotensyny II powoduje wzrost ciśnienia tętniczego i pogrubienie warstwy środkowej aorty, które jest powiązane ze zwiększeniem produkcji wolnych rodników [192]. U zwierząt *knockout* nie posiadających genu dla Nox2 podanie angiotensyny II powodowało jedynie wzrost ciśnienia tętniczego. Angiotensyna II nie powodowała wzrostu wytwarzania wolnych rodników u myszy Nox2^{-/-} i nie obserwowano przebudowy naczyniowej. Podobne obserwacje poczynił Jung i wsp. odnośnie zależnej od śródbłonna wazorelaksacji w badaniach na modelu nadciśnienia nerkopochodnego

u myszy [95]. Usunięcie Nox1 skutkowało w upośledzeniu produkcji wolnych rodników i zależnej od śródbłonka wazorelaksacji w odpowiedzi na angiotensynę II, ale nie wpływało na procesy przebudowy naczynia, takie jak proliferacja mięśni gładkich naczyń (VSMC) [68, 69]. W prezentowanej rozprawie wykazano, że zarówno Nox4, jak i Nox2 mogą stanowić źródło wolnych rodników w niewydolności serca u ludzi.

Poprzednie badania dotyczące roli oksydazy NADPH w regulacji funkcji śródbłonka przeprowadzono jedynie u chorych z chorobą wieńcową i cukrzycą. Stwierdzono związek pomiędzy czynnikami ryzyka choroby wieńcowej, cukrzycą a aktywnością oksydazy NADPH [73, 74, 173]. W omawianej pracy wszyscy chorzy mieli rozpoznaną chorobę wieńcową oraz przynajmniej jeden czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego. Obie badane grupy nie różniły się istotnie odnośnie czynników ryzyka miażdżycy (wyłączając cukrzycę) oraz zaawansowania choroby wieńcowej. W grupie chorych z niewydolnością serca znamienne częściej stwierdzano występowanie cukrzycy oraz przebyty zawał serca. Korelacja pomiędzy produkcją wolnych rodników a niewydolnością serca była niezależna od cukrzycy. Różnica w produkcji wolnych rodników oraz dysfunkcji śródbłonka pomiędzy grupą z niewydolnością serca a grupą kontrolną była znamienna nawet po wyłączeniu z analizy chorych z cukrzycą. W analizie regresji wielokrotnej wykazano, że CRP oraz klasa NYHA są niezależnymi czynnikami korelującymi z produkcją wolnych rodników. Różnica pomiędzy grupami była istotna statystycznie nawet pomimo faktu, że większość badanych chorych otrzymywała leki hamujące wytwarzanie wolnych rodników przez oksydazę NADPH, takich jak statyny oraz antagoniści układu renina-angiotensyna-aldosteron [28]. Wydaje się więc, że poziomy wolnych rodników oraz niewydolność śródbłonka mogłyby być znamienne wyższe, gdyby nie stosowane leczenie.

Nadciśnienie tętnicze i cukrzyca znamienne częściej występują wśród rasy czarnej niż u rasy białej [22]. Używając komórek hodowli komórkowej HUVEC, Kalinowski i wsp. wykazali zmniejszoną biodostępność tlenu azotu wśród rasy czarnej, głównie w wyniku zwiększonej produkcji rodnika ponadtlenowego, biodegradacji tlenu azotu oraz zwiększonego wytwarzania peroksynitritu. Autorzy wykazali, że do zwiększonej degradacji tlenu azotu dochodzi w wyniku reakcji z wolnymi rodnikami tlenowymi produkowanymi przez oksydazę NADPH [96]. W omawianej pracy wszyscy chorzy byli rasy kaukaskiej i nie badano potencjalnego wpływu rasy, a zwiększona produkcja wolnych rodników była związana jedynie z obecnością niewydolności serca.

W niniejszej pracy potwierdzono fakt, że niewydolność śródbłonka dobrze koreluje z ciężkością niewydolności serca według klasyfikacji NYHA [61, 101]. Dodatkowo po raz pierwszy wykazano występowanie podobnej korelacji z aktywnością oksydazy NADPH.

Jedną z ważniejszych substancji produkowanych przez śródbłonek jest NO, który nie tylko odgrywa kluczową rolę w regulacji napięcia naczyniowego, ale ponadto hamuje agregację płytek i wzrost komórek mięśni gładkich naczyń [8, 156]. Myszy *knockout* nieposiadające eNOS mają istotnie podwyższone ciśnienie tętnicze, tendencję do zakrzepic, nadmierną agregację leukocytów oraz przyspieszony rozwój miażdżycy [65, 85, 104], ale z drugiej strony nieobecność genu eNOS zapobiega wystąpieniu wstrząsu anafilaktycznego [26]. Tlenek azotu aktywuje cyklazę gaunylową i powoduje zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego cyklicznego-3',5'-guanozynomonofosforanu (cGMP). cGMP z kolei poprzez kinazę białkową G (PKG) defosforyluje miozynę komórek mięśni gładkich naczyń i powoduje ich rozkurcz [137]. NO wpływa również na kurczliwość mięśnia sercowego. Dobrze znany jest fakt, że stymulacja uwalniania tlenu azotu przez eNOS w śródbłonku naczyń wieńcowych powoduje zaburzenia relaksacji oraz zwiększenie zużycia tlenu przez mięsień sercowy [127]. Tlenek azotu może modulować również podstawową kurczliwość mięśnia serca, odpowiedź na stymulację adrenergiczną oraz wpływać na wewnątrz-sercowe mechanizmy regulujące inotropizm (takie jak zależność siła-częstość – *force-frequency relationship*) [169]. Przebudowa mięśnia sercowego po zawale serca jest w znacznym stopniu regulowana przez tlenek azotu uwalniany przez eNOS [13]. Jones i wsp. stosując model transgenicznymy wykazali, że zwiększona ekspresja eNOS poprawia rokowanie i funkcję po eksperymentalnym zawale serca [94]. Jak wspomniano wcześniej, zmniejszona biodostępność tlenu azotu może być wynikiem zmniejszonego wytwarzania NO lub jego zwiększonej degradacji. W prezentowanym badaniu nie stwierdzono zwiększenia ekspresji eNOS oraz iNOS, co sugeruje, że zmniejszenie wytwarzania tlenu azotu jest wynikiem degradacji kofaktora dla NOS (BH_4), albo inaktywacji tlenu azotu przez wolne rodniki uwalniane przez oksydazę NADPH. Wolny rodnik ponadtlenkowy reaguje z tlenkiem azotu a wynikiem tej reakcji jest wysoce reaktywny peroksynitryt [143]. Tak więc zmniejszenie biodostępności tlenu azotu może występować, pomimo normalnej lub nawet zwiększonej produkcji NO przy współistniejącym zwiększeniu produkcji wolnych rodników [13]. Zwiększone uwalnianie wolnych rodników u chorych z niewydolnością serca i ich wpływ na zmniejszoną biodostępność NO zostały opisane [7, 12], natomiast do tej pory nie zidentyfikowano oksydazy NADPH jako źródła wolnych rodników.

Wyjaśnienie mechanizmów aktywujących syntazę NADPH jest ważne, aby zrozumieć patofizjologię niewydolności śródbłonka u chorych niewydolnością serca. Jak wspomniano we wstępie, niewydolność serca charakteryzuje się ogólnoustrojowym procesem zapalnym. U chorych z niewydolnością serca stwierdza się zwiększone poziomy szeregu cytokin prozapalnych, wśród nich CRP, IL-6 i TNF- α . Stężenia markerów zapalenia dobrze korelują z zaawansowaniem niewydolności serca według klasyfikacji NYHA, częstością hospitalizacji oraz rokowaniem [3, 125, 196]. Cytokiny zapalne, takie jak TNF- α mogą wpływać na

niewydolność śródbłonna na wielu poziomach [153, 185]. Czynniki prozapalne, oprócz wpływu na ekspresję różnych podjednostek oksydazy NADPH dodatkowo mogą modulować aktywność enzymu. Dla przykładu przedłużone poddawanie komórek śródbłonna (HUVEC) działaniu angiotensyny II nie tylko powoduje wzrost poziomu mRNA dla Nox2, ale równocześnie skutkuje 3–4-krotnym wzrostem produkcji wolnych rodników [160]. Krótkotrwałe podawanie angiotensyny II również powoduje zwiększenie wytwarzania wolnych rodników przez kompleks oksydazy NADPH w wyniku aktywacji fosforylacji podjednostek regulatorowych, głównie p47^{phox}, pozostaje jednak bez wpływu na ekspresję mRNA [116].

Wykazano, że TNF- α moduluje funkcję śródbłonna poprzez regulację produkcji tlenu azotu [184]. Dodatkowo stwierdzono, że cytokiny prozapalne są silnymi aktywatorami oksydazy NADPH w endothelium i komórkach mięśni gładkich naczyń [66, 119, 122]. Tak więc, TNF- α może zmniejszać biodostępność tlenu azotu pośrednio przez zwiększenie wytwarzania wolnych rodników.

TNF- α aktywuje śródbłonkową produkcję wolnych rodników poprzez fosforylację podjednostki p47^{phox}, wpływa na interakcję pomiędzy kinazą białkową C (PKC) oraz podjednostką p47^{phox} poprzez czynnik powiązany z receptorem dla TNF (TRAF4) [66, 118]. Ufosforylowana podjednostka p47^{phox} stabilizuje kompleks oksydazy NADPH i umożliwia przyłączenie pozostałych elementów niezbędnych do aktywacji podjednostki katalitycznej - Nox2. W przedstawianej pracy obserwowano związek pomiędzy poziomem uwalnianych wolnych rodników a stężeniem TNF- α , który nie osiągnął jednak znamienności statystycznej. Może to wynikać przede wszystkim z małej liczebności badanej grupy.

Stężenie CRP w surowicy jest dobrym wskaźnikiem ogólnoustrojowego procesu zapalnego a dodatkowo krążące CRP bezpośrednio wpływa na funkcję śródbłonna naczyniowego. Qamirani i wsp. wykazali, że CRP hamuje zależną od śródbłonna wazodylatację poprzez zmniejszenie biodostępności tlenu azotu w wyniku bezpośredniego pobudzenia wytwarzania wolnych rodników przez oksydazę NADPH [152]. W prezentowanej rozprawie potwierdzono również, że stężenie CRP było znamienne podwyższone u chorych z niewydolnością serca. Podobne obserwacje dotyczyły innych cytokin prozapalnych, których stężenia oznaczano, tzn. Il-6 i TNF- α , aczkolwiek różnice te nie osiągnęły znamienności statystycznej. Dodatkowo wykazano silną korelację pomiędzy stężeniem CRP a aktywnością oksydazy NADPH, co sugeruje, że zapalenie odgrywa istotną rolę w regulacji wydzielania wolnych rodników przez oksydazę NADPH w niewydolności serca.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie wykazano, że zwiększona aktywność oksydazy NADPH, związana z ogólnoustrojowym zapaleniem, przyczynia się do zwiększonej produkcji wolnych rodników i upośledzenia funkcji śródbłonna naczyniowego u chorych z niewydolnością serca. Badanie przeprowadzono na żyłach odpiszczelowych, dlatego trudno odnieść jego wyniki do układu tętniczego.

W innych badaniach wykazywano dobrą korelację pomiędzy ekspresją różnych podjednostek oksydazy NADPH oraz izoform podjednostki katalitycznej w układzie tętniczym i żylnym [75]. Guzik i wsp. sugerowali, że to powyższe podobieństwo jest związane z ogólnoustrojowymi mechanizmami regulującymi ekspresję i aktywność oksydazy NADPH. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że mediatory zapalne pełnią ważną funkcję w regulacji aktywności oksydazy NADPH. Choć nie można bezpośrednio wypowiedzieć się o czynności tętnic, niewydolność śródbłonna naczyń żylnych odgrywa równie istotną rolę w patofizjologii niewydolności serca, regulując pojemność łożyska naczyniowego, powrót żylny oraz obciążenie wstępne [141].

6. WNIOSKI

1. Wolne rodniki uwalniane przez oksydazę NADPH powodują upośledzenie funkcji śródbłonna naczyń u chorych z niewydolnością serca.
2. Aktywacja oksydazy NADPH składającej się z podjednostki Nox2 i Nox4, jest przyczyną zwiększonego stresu oksydacyjnego w niewydolności serca.
3. Ogólnoustrojowe zapalenie, którego przejawem jest zwiększone stężenie wielu cytokin pozapalnych (CRP, Il-6, TNF- α), pełni kluczową rolę w regulacji aktywności oksydazy NADPH.

7. STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy było określenie roli stresu oksydacyjnego, a zwłaszcza udziału wolnych rodników (ROS) produkowanych przez oksydazę NADPH, na funkcję śródbłonka naczyniowego u chorych z niewydolnością serca. Niewydolność śródbłonka występuje u chorych z niewydolnością serca i przyczynia się do zwiększenia oporu naczyniowego, ograniczenia tolerancji wysiłku, zaburzenia regulacji pojemności łożyska żylnego oraz zwiększenia obciążenia wstępnego. Spośród wielu źródeł wolnych rodników, kompleks oksydazy NADPH stanowi podstawowe źródło ROS oraz pełni kluczową rolę w regulacji ich wydzielania przez inne systemy. Rola oksydazy NADPH w regulacji funkcji śródbłonka naczyniowego u ludzi z niewydolnością serca pozostawała do niedawna nieokreślona. W niniejszej rozprawie badano funkcję śródbłonka *in vitro*, używając żył odpiszczelowych pobranych od pacjentów z niewydolnością serca (n=19) oraz pacjentów z grupy kontrolnej (n=35). Wytwarzanie wolnych rodników oceniano wykorzystując techniki chemiluminesencji wzmocnionej lucigeniną. W pobranym materiale, stosując RT-PCR oznaczano ekspresję mRNA dla różnych podjednostek oksydazy NADPH (p67^{phox}, p47^{phox}, p22^{phox}), izoform podjednostki katalitycznej (Nox1, Nox2, Nox4) oraz izoform NOS (eNOS, iNOS, nNOS). Dodatkowo w surowicy chorych oznaczano stężenie markerów zapalenia, takich jak CRP, TNF- α oraz Il-6, które następnie korelowano z ciężkością niewydolności serca oraz poziomem stresu oksydacyjnego. Pacjenci z niewydolnością serca cechowali się znacznie upośledzoną funkcją śródbłonka w porównaniu do chorych z grupy kontrolnej wyrażoną redukcją względnego rozkurczu (15,2 \pm 3% vs 40,5 \pm 8,4%; p<0,05), podwyższonym stężeniem markerów zapalenia, głównie CRP (8,6 \pm 2,7 vs 2,6 \pm 0,4 mg/l; p<0,05), podwyższeniem produkcji wolnych rodników przez oksydazę NADPH (p<0,05), oraz zwiększoną ekspresją podjednostki Nox4 i p67^{phox}. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji izoform syntazy tlenu azotu pomiędzy analizowanymi grupami. Aktywność oksydazy NADPH korelowała ze stopniem nasilenia niewydolności serca według klasyfikacji NYHA (r=0,684, p<0,05) oraz stężeniem CRP (r=0,501, p<0,005). W rozprawie tej wykazano, że niewydolność śródbłonka występująca u chorych z niewydolnością serca, jest związana ze zwiększeniem produkcji wolnych rodników. W procesie tym kluczową rolę pełni oksydaza NADPH, zawierająca Nox4 oraz prawdopodobnie Nox2. Dodatkowo stwierdzono, że zapalenie odgrywa istotną rolę w regulacji funkcji oksydazy NADPH i produkcji wolnych rodników.

8. SUMMARY

The aim of this study was to investigate the role of oxidative stress and NADPH oxidase in endothelial dysfunction in human heart failure. Vascular endothelial dysfunction in human heart failure contributes to increased tone, exercise limitation, and dysregulation of venous capacitance and vascular volume. Among various sources of reactive oxygen species, complex of NADPH oxidase is an important source of oxidative stress and it plays a key role in regulating release of ROS from other sources. The role of NADPH oxidase in the endothelial dysfunction of human heart failure remains unknown. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation were assessed in saphenous vein segments obtained from consecutive patients with heart failure (n=19) or normal left ventricular function (control, n=35) undergoing CABG. Saphenous vein superoxide production was measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence and mRNA expression of NADPH oxidase subunits (p47^{phox}, p67^{phox}, p22^{phox}), isoforms of catalytic subunit (Nox1, Nox2, Nox4) and NOS isoforms (eNOS, iNOS, nNOS) were quantified by real-time PCR. In addition various markers of inflammation, including CRP, TNF- α and Il-6, were measured and correlated with indices of oxidative stress. Heart failure patients had significantly worse endothelial function than controls (15.2 \pm 3% vs 40.5 \pm 8.4% relative relaxation; P<0.05), elevated CRP levels (8.6 \pm 2.7 vs 2.6 \pm 0.4 mg/l; P<0.05), over 2-fold higher NADPH-dependent superoxide generation (P<0.05), and significantly higher expression of the NADPH oxidase isoform Nox4 and regulatory subunit p67^{phox}. There was no difference in expression of NOS isoforms. Superoxide levels were positively correlated with heart failure NYHA class (r=0.684, P<0.05) and CRP (r=0.501, P<0.005, n=32). This study confirmed the presence of venous endothelial dysfunction in human heart failure and showed that this is associated with increased NADPH oxidase-derived superoxide generation, containing Nox4 and probably Nox2 catalytic subunit. In addition it was shown that inflammatory mechanisms may be involved in the increased reactive oxygen species (ROS) generation.

9. PIŚMIENICTWO

1. Adams K.F., Jr.: Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2004, 61 Suppl 2, S4-13.
2. Ago T., Kitazono T., Kuroda J., Kumai Y., Kamouchi M., Ooboshi H., Wakisaka M., Kawahara T., Rokutan K., Ibayashi S., Iida M.: NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* 2005, 36, 5, 1040-6.
3. Alonso-Martinez J.L., Llorente-Diez B., Echegaray-Agara M., Olaz-Preciado F., Urbieto-Echezarreta M., Gonzalez-Arencibia C.: C-reactive protein as a predictor of improvement and readmission in heart failure. *Eur. J. Heart. Fail.* 2002, 4, 3, 331-6.
4. Ambasta R.K., Kumar P., Griendling K.K., Schmidt H.H., Busse R., Brandes R.P.: Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 44, 45935-41.
5. Anand I.S., Latini R., Florea V.G., Kuskowski M.A., Rector T., Masson S., Signorini S., Mocarelli P., Hester A., Glazer R., Cohn J.N.: C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation* 2005, 112, 10, 1428-34.
6. Antoniades C., Shirodaria C., Warrick N., Cai S., de Bono J., Lee J., Leeson P., Neubauer S., Ratnatunga C., Pillai R., Refsum H., Channon K.M.: 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* 2006, 114, 11, 1193-201.
7. Arimura K., Egashira K., Nakamura R., Ide T., Tsutsui H., Shimokawa H., Takeshita A.: Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001, 280, 1, H68-75.
8. Azuma H., Ishikawa M., Sekizaki S.: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* 1986, 88, 2, 411-5.
9. Babior B.M.: NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 2004, 16, 1, 42-7.
10. Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W.: The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, 397, 2, 342-4.

11. Banfi B., Tirone F., Durussel I., Knisz J., Moskwa P., Molnar G.Z., Krause K.H., Cox J.A.: Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 18, 18583-91.
12. Bauersachs J., Bouloumie A., Fraccarollo D., Hu K., Busse R., Ertl G.: Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 1999, 100, 3, 292-8.
13. Bauersachs J., Fleming I., Fraccarollo D., Busse R., Ertl G.: Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc. Res.* 2001, 51, 2, 344-50.
14. Bayraktutan U., Blayney L., Shah A.M.: Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20, 8, 1903-11.
15. Belaiba R.S., Djordjevic T., Petry A., Diemer K., Bonello S., Banfi B., Hess J., Pogrebniak A., Bickel C., Gorlach A.: NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 42, 4, 446-59.
16. Bendall J.K., Cave A.C., Heymes C., Gall N., Shah A.M.: Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2002, 105, 3, 293-6.
17. Bengtsson S.H., Gulluyan L.M., Dusting G.J., Drummond G.R.: Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2003, 30, 11, 849-54.
18. Beresewicz A., Maczewski M., Duda M.: Effect of classic preconditioning and diazoxide on endothelial function and O₂⁻ and NO generation in the post-ischemic guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.* 2004, 63, 1, 118-29.
19. Bokoch G.M., Zhao T.: Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 9-10, 1533-48.
20. Braunwald E.: Biomarkers in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 20, 2148-59.
21. Bristow M.R., Krause-Steinrauf H., Nuzzo R., Liang C.S., Lindenfeld J., Lowes B.D., Hattler B., Abraham W.T., Olson L., Krueger S., Thaneemit-Chen S., Hare J.M., Loeb H.S., Domanski M.J., Eichhorn E.J., Zelis R., Lavori P.: Effect of baseline or changes in adrenergic activity on clinical outcomes in the beta-blocker evaluation of survival trial. *Circulation* 2004, 110, 11, 1437-42.

22. Burt V.L., Whelton P., Roccella E.J., Brown C., Cutler J.A., Higgins M., Horan M.J., Labarthe D.: Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995, 25, 3, 305-13.
23. Byrne J.A., Grieve D.J., Bendall J.K., Li J.M., Gove C., Lambeth J.D., Cave A.C., Shah A.M.: Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2003, 93, 9, 802-5.
24. Cai H., Harrison D.G.: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000, 87, 10, 840-4.
25. Cappola T.P., Kass D.A., Nelson G.S., Berger R.D., Rosas G.O., Kobeissi Z.A., Marban E., Hare J.M.: Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2001, 104, 20, 2407-11.
26. Cauwels A., Janssen B., Buys E., Sips P., Brouckaert P.: Anaphylactic shock depends on PI3K and eNOS-derived NO. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 8, 2244-51.
27. Cave A., Grieve D., Johar S., Zhang M., Shah A.M.: NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2005, 360, 1464, 2327-34.
28. Cave A.C., Brewer A.C., Narayanapanicker A., Ray R., Grieve D.J., Walker S., Shah A.M.: NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 5-6, 691-728.
29. Channon K.M., Guzik T.J.: Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002, 53, 4 Pt 1, 515-24.
30. Cheng G., Cao Z., Xu X., van Meir E.G., Lambeth J.D.: Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001, 269, 1-2, 131-40.
31. Cheng G., Lambeth J.D.: NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 6, 4737-42.
32. Cheng T.H., Cheng P.Y., Shih N.L., Chen I.B., Wang D.L., Chen J.J.: Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 42, 10, 1845-54.
33. Cheng T.H., Shih N.L., Chen C.H., Lin H., Liu J.C., Chao H.H., Liou J.Y., Chen Y.L., Tsai H.W., Chen Y.S., Cheng C.F., Chen J.J.: Role of

- mitogen-activated protein kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1-induced beta-myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biomed. Sci.* 2005, 12, 1, 123-33.
34. Chidsey C.A., Harrison D.C., Braunwald E.: Augmentation of the plasma nor-epinephrine response to exercise in patients with congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1962, 267, 650-4.
 35. Clempus R.E., Sorescu D., Dikalova A.E., Pounkova L., Jo P., Sorescu G.P., Schmidt H.H., Lassegue B., Griendling K.K.: Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007, 27, 1, 42-8.
 36. Cohen-Solal A., Beauvais F., Logeart D.: Heart failure and diabetes mellitus: epidemiology and management of an alarming association. *J. Card. Fail.* 2008, 14, 7, 615-25.
 37. Cohn J.N., Levine T.B., Olivari M.T., Garberg V., Lura D., Francis G.S., Simon A.B., Rector T.: Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1984, 311, 13, 819-23.
 38. Cucoranu I., Clempus R., Dikalova A., Phelan P.J., Ariyan S., Dikalov S., Sorescu D.: NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ. Res.* 2005, 97, 9, 900-7.
 39. De Keulenaer G.W., Alexander R.W., Ushio-Fukai M., Ishizaka N., Griendling K.K.: Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998, 329 (Pt 3), 653-7.
 40. Deswal A., Petersen N.J., Feldman A.M., Young J.B., White B.G., Mann D.L.: Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001, 103, 16, 2055-9.
 41. Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T.: Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 2000, 18, 6, 655-73.
 42. Diebold B.A., Fowler B., Lu J., Dinauer M.C., Bokoch G.M.: Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2004, 279, 27, 28136-42.
 43. Drexler H.: Endothelial function in heart failure: some unsolved issues. *Eur. Heart J.* 1996, 17, 12, 1775-7.

44. Drexler H., Hayoz D., Munzel T., Hornig B., Just H., Brunner H.R., Zelis R.: Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1992, 69, 19, 1596-601.
45. Droge W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002, 82, 1, 47-95.
46. Duchon M.R.: Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* 2004, 25, 4, 365-451.
47. Duda M., Czarnowska E., Kurzelewski M., Konior A., Beresewicz A.: Ischemic preconditioning prevents endothelial dysfunction, P-selectin expression, and neutrophil adhesion by preventing endothelin and O₂-generation in the post-ischemic guinea-pig heart. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006, 57, 4, 553-69.
48. Duda M., Konior A., Klemenska E., Beresewicz A.: Preconditioning protects endothelium by preventing ET-1-induced activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase in post-ischemic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007, 42, 2, 400-10.
49. Duerschmidt N., Wippich N., Goettsch W., Broemme H.J., Morawietz H.: Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 269, 3, 713-7.
50. Dworakowski R., Alom-Ruiz S.P., Shah A.M.: NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. *Pharmacological reports : PR* 2008, 60, 1, 21-8.
51. Dworakowski R., Anilkumar N., Zhang M., Shah A.M.: Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.* 2006, 34, Pt 5, 960-4.
52. Dworakowski R., Dworakowska D., Kocic I., Wirth T., Gruchala M., Kaminski M., Petruszewicz J., Yla-Herttuala S., Rynkiewicz A.: Cerivastatin and hypercholesterolemia reduce apoptosis of cardiomyocytes in guinea pig papillary muscle subjected to hypoxia/reoxygenation. *Pharmacol. Rep.* 2006, 58, 3, 420-6.
53. Dworakowski R., Dworakowska D., Kocic I., Wirth T., Gruchala M., Kaminski M., Ray R., Petruszewicz J., Yla-Herttuala S., Rynkiewicz A.: Experimental hyperlipidaemia does not prevent preconditioning and it reduces ischemia-induced apoptosis. *Int. J. Cardiol.* 2008, 126, 1, 62-7.
54. Ekelund U.E., Harrison R.W., Shokek O., Thakkar R.N., Tunin R.S., Senzaki H., Kass D.A., Marban E., Hare J.M.: Intravenous allopurinol decreases myocardial oxygen consumption and increases mechanical efficiency in dogs with pacing-induced heart failure. *Circ. Res.* 1999, 85, 5, 437-45.

55. Elster S.K., Braunwald E., Wood H.F.: A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure. *Am. Heart J.* 1956, 51, 4, 533-41.
56. Engberding N., Spiekermann S., Schaefer A., Heineke A., Wiencke A., Muller M., Fuchs M., Hilfiker-Kleiner D., Hornig B., Drexler H., Landmesser U.: Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug? *Circulation* 2004, 110, 15, 2175-9.
57. Farquharson C.A., Butler R., Hill A., Belch J.J., Struthers A.D.: Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* 2002, 106, 2, 221-6.
58. Ferrari R., Agnoletti L., Comini L., Gaia G., Bachetti T., Cargnoni A., Ceconi C., Curello S., Visioli O.: Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur. Heart J.* 1998, 19 Suppl B, B2-11.
59. Finkel M.S., Oddis C.V., Jacob T.D., Watkins S.C., Hattler B.G., Simmons R.L.: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992, 257, 5068, 387-9.
60. Finkel T.: Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003, 15, 2, 247-54.
61. Fischer D., Rossa S., Landmesser U., Spiekermann S., Engberding N., Hornig B., Drexler H.: Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur. Heart J.* 2005, 26, 1, 65-9.
62. Floras J.S.: Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993, 22, 4 Suppl A, 72A-84A.
63. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H.: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994, 23, 6 Pt 2, 1121-31.
64. Francis G.S., Benedict C., Johnstone D.E., Kirlin P.C., Nicklas J., Liang C.S., Kubo S.H., Rudin-Toretsky E., Yusuf S.: Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 1990, 82, 5, 1724-9.
65. Freedman J.E., Sauter R., Battinelli E.M., Ault K., Knowles C., Huang P.L., Loscalzo J.: Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ. Res.* 1999, 84, 12, 1416-21.

66. Frey R.S., Rahman A., Kefer J.C., Minshall R.D., Malik A.B.: PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ. Res.* 2002, 90, 9, 1012-9.
67. Gao W.D., Liu Y., Mellgren R., Marban E.: Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis? *Circ. Res.* 1996, 78, 3, 455-65.
68. Gavazzi G., Banfi B., Deffert C., Fiette L., Schappi M., Herrmann F., Krause K.H.: Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett.* 2006, 580, 2, 497-504.
69. Gavazzi G., Deffert C., Trocme C., Schappi M., Herrmann F.R., Krause K.H.: NOX1 deficiency protects from aortic dissection in response to angiotensin II. *Hypertension* 2007, 50, 1, 189-96.
70. Giordano F.J.: Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 3, 500-8.
71. Gorlach A., Brandes R.P., Nguyen K., Amidi M., Dehghani F., Busse R.: A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ. Res.* 2000, 87, 1, 26-32.
72. Gryglewski R.J.: Pharmacology of vascular endothelium. Delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *Febs. J.* 2005, 272, 12, 2956-67.
73. Guzik T.J., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M.: Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002, 105, 14, 1656-62.
74. Guzik T.J., Sadowski J., Guzik B., Jopek A., Kapelak B., Przybylowski P., Wierzbicki K., Korbut R., Harrison D.G., Channon K.M.: Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26, 2, 333-9.
75. Guzik T.J., Sadowski J., Kapelak B., Jopek A., Rudzinski P., Pillai R., Korbut R., Channon K.M.: Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 9, 1614-20.
76. Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M.: Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase:

- association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 2000, 86, 9, E85-90.
77. Halcox J.P., Schenke W.H., Zalos G., Mincemoyer R., Prasad A., Waclawiw M.A., Nour K.R., Quyyumi A.A.: Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002, 106, 6, 653-8.
 78. Haywood G.A., Tsao P.S., von der Leyen H.E., Mann M.J., Keeling P.J., Trindade P.T., Lewis N.P., Byrne C.D., Rickenbacher P.R., Bishopric N.H., Cooke J.P., McKenna W.J., Fowler M.B.: Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996, 93, 6, 1087-94.
 79. Heitzer T., Baldus S., von Kodolitsch Y., Rudolph V., Meinertz T.: Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25, 6, 1174-9.
 80. Heymes C., Bendall J.K., Ratajczak P., Cave A.C., Samuel J.L., Hasenfuss G., Shah A.M.: Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 41, 12, 2164-71.
 81. Hirooka Y., Imaizumi T., Tagawa T., Shiramoto M., Endo T., Ando S., Takeshita A.: Effects of L-arginine on impaired acetylcholine-induced and ischemic vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation* 1994, 90, 2, 658-68.
 82. Hirota H., Yoshida K., Kishimoto T., Taga T.: Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 11, 4862-6.
 83. Hirotani S., Otsu K., Nishida K., Higuchi Y., Morita T., Nakayama H., Yamaguchi O., Mano T., Matsumura Y., Ueno H., Tada M., Hori M.: Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation* 2002, 105, 4, 509-15.
 84. Hornig B., Arakawa N., Kohler C., Drexler H.: Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998, 97, 4, 363-8.
 85. Huang P.L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A., Fishman M.C.: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995, 377, 6546, 239-42.

86. Hulsmann M., Stanek B., Frey B., Sturm B., Putz D., Kos T., Berger R., Woloszczuk W., Maurer G., Pacher R.: Value of cardiopulmonary exercise testing and big endothelin plasma levels to predict short-term prognosis of patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998, 32, 6, 1695-700.
87. Hwang J., Ing M.H., Salazar A., Lassegue B., Griendling K., Navab M., Sevanian A., Hsiai T.K.: Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ. Res.* 2003, 93, 12, 1225-32.
88. Ide T., Tsutsui H., Hayashidani S., Kang D., Suematsu N., Nakamura K., Utsumi H., Hamasaki N., Takeshita A.: Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ. Res.* 2001, 88, 5, 529-35.
89. Ide T., Tsutsui H., Kinugawa S., Suematsu N., Hayashidani S., Ichikawa K., Utsumi H., Machida Y., Egashira K., Takeshita A.: Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ. Res.* 2000, 86, 2, 152-7.
90. Inoguchi T., Li P., Umeda F., Yu H.Y., Kakimoto M., Imamura M., Aoki T., Etoh T., Hashimoto T., Naruse M., Sano H., Utsumi H., Nawata H.: High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000, 49, 11, 1939-45.
91. Irani K., Xia Y., Zweier J.L., Sollott S.J., Der C.J., Fearon E.R., Sundaresan M., Finkel T., Goldschmidt-Clermont P.J.: Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997, 275, 5306, 1649-52.
92. Johar S., Cave A.C., Narayanapanicker A., Grieve D.J., Shah A.M.: Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *Faseb J.* 2006, 20, 9, 1546-8.
93. Jones S.A., O'Donnell V.B., Wood J.D., Broughton J.P., Hughes E.J., Jones O.T.: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1996, 271, 4 Pt 2, H1626-34.
94. Jones S.P., Greer J.J., van Haperen R., Duncker D.J., de Crom R., Lefler D.J.: Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 8, 4891-6.
95. Jung O., Schreiber J.G., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P.: gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 2004, 109, 14, 1795-801.

96. Kalinowski L., Dobrucki I.T., Malinski T.: Race-specific differences in endothelial function: predisposition of African Americans to vascular diseases. *Circulation* 2004, 109, 21, 2511-7.
97. Karbowski M., Kurono C., Wozniak M., Ostrowski M., Teranishi M., Nishizawa Y., Usukura J., Soji T., Wakabayashi T.: Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 3-4, 396-409.
98. Kashiwagi A., Shinozaki K., Nishio Y., Maegawa H., Maeno Y., Kanazawa A., Kojima H., Haneda M., Hidaka H., Yasuda H., Kikkawa R.: Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats. *Am. J. Physiol.* 1999, 277, 6 Pt 1, E976-83.
99. Katz S.D., Biasucci L., Sabba C., Strom J.A., Jondeau G., Galvao M., Solomon S., Nikolic S.D., Forman R., LeJemtel T.H.: Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992, 19, 5, 918-25.
100. Katz S.D., Hryniewicz K., Hriljac I., Balidemaj K., Dimayuga C., Hudaihed A., Yasskiy A.: Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005, 111, 3, 310-4.
101. Katz S.D., Rao R., Berman J.W., Schwarz M., Demopoulos L., Bijou R., LeJemtel T.H.: Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation* 1994, 90, 1, 12-6.
102. Katz S.D., Schwarz M., Yuen J., LeJemtel T.H.: Impaired acetylcholine-mediated vasodilation in patients with congestive heart failure. Role of endothelium-derived vasodilating and vasoconstricting factors. *Circulation* 1993, 88, 1, 55-61.
103. Kim K.S., Takeda K., Sethi R., Pracyk J.B., Tanaka K., Zhou Y.F., Yu Z.X., Ferrans V.J., Bruder J.T., Kovesdi I., Irani K., Goldschmidt-Clermont P., Finkel T.: Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 9, 1821-6.
104. Knowles J.W., Reddick R.L., Jennette J.C., Shesely E.G., Smithies O., Maeda N.: Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, 4, 451-8.

105. Kocic I., Dworakowska D., Dworakowski R., Petruszewicz J.: CGP 41251, a new potential anticancer drug, improves contractility of rat isolated cardiac muscle subjected to hypoxia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001, 37, 6, 734-41.
106. Kurzelewski M., Czarnowska E., Beresewicz A.: Superoxide- and nitric oxide-derived species mediate endothelial dysfunction, endothelial glycocalyx disruption, and enhanced neutrophil adhesion in the post-ischemic guinea-pig heart. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 56, 2, 163-78.
107. Lambeth J.D.: NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004, 4, 3, 181-9.
108. Lambeth J.D., Cheng G., Arnold R.S., Edens W.A.: Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem. Sci.* 2000, 25, 10, 459-61.
109. Landmesser U., Dikalov S., Price S.R., McCann L., Fukai T., Holland S.M., Mitch W.E., Harrison D.G.: Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 8, 1201-9.
110. Landmesser U., Spiekermann S., Dikalov S., Tatge H., Wilke R., Kohler C., Harrison D.G., Hornig B., Drexler H.: Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002, 106, 24, 3073-8.
111. Latini R., Masson S., Anand I., Salio M., Hester A., Judd D., Barlera S., Maggioni A.P., Tognoni G., Cohn J.N.: The comparative prognostic value of plasma neurohormones at baseline in patients with heart failure enrolled in Val-HeFT. *Eur. Heart J.* 2004, 25, 4, 292-9.
112. Lehotsky J., Kaplan P., Matejovicova M., Murin R., Racay P., Raeymaekers L.: Ion transport systems as targets of free radicals during ischemia reperfusion injury. *Gen. Physiol. Biophys.* 2002, 21, 1, 31-7.
113. Lemarie C.A., Paradis P., Schiffrin E.L.: New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone. *J. Mol. Med.* 2008, 86, 6, 673-8.
114. Levine B., Kalman J., Mayer L., Fillit H.M., Packer M.: Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323, 4, 236-41.
115. Li J.M., Fan L.M., Christie M.R., Shah A.M.: Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 6, 2320-30.

116. Li J.M., Mullen A.M., Yun S., Wientjes F., Brouns G.Y., Thrasher A.J., Shah A.M.: Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Circ. Res.* 2002, 90, 2, 143-50.
117. Li J.M., Shah A.M.: Differential NADPH- versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* 2001, 52, 3, 477-86.
118. Li J.M., Shah A.M.: Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004, 287, 5, R1014-30.
119. Li J.M., Shah A.M.: Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 14, 12094-100.
120. Li L., Watts S.W., Banes A.K., Galligan J.J., Fink G.D., Chen A.F.: NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 2003, 42, 3, 316-21.
121. Lijnen P., Petrov V.: Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000, 32, 6, 865-79.
122. Lin S.J., Shyue S.K., Hung Y.Y., Chen Y.H., Ku H.H., Chen J.W., Tam K.B., Chen Y.L.: Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 2, 334-40.
123. Maack C., Kartes T., Kilter H., Schafers H.J., Nickenig G., Bohm M., Laufs U.: Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 2003, 108, 13, 1567-74.
124. MacCarthy P.A., Grieve D.J., Li J.M., Dunster C., Kelly F.J., Shah A.M.: Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation* 2001, 104, 24, 2967-74.
125. MacGowan G.A., Mann D.L., Kormos R.L., Feldman A.M., Murali S.: Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am. J. Cardiol.* 1997, 79, 8, 1128-31.

126. Martyn K.D., Frederick L.M., von Loehneysen K., Dinauer M.C., Knaus U.G.: Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*. 2006, 18, 1, 69-82.
127. Massion P.B., Feron O., Dessy C., Balligand J.L.: Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res*. 2003, 93, 5, 388-98.
128. Masson S., Latini R., Anand I.S., Barlera S., Judd D., Salio M., Perticone F., Perini G., Tognoni G., Cohn J.N., investigators V.-H.: The prognostic value of big endothelin-1 in more than 2,300 patients with heart failure enrolled in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *J. Card. Fail*. 2006, 12, 5, 375-80.
129. Matsubashi T., Liu X., Karbowski M., Wozniak M., Antosiewicz J., Wakabayashi T.: Role of free radicals in the mechanism of the hydrazine-induced formation of megamitochondria. *Free Radic. Biol. Med*. 1997, 23, 2, 285-93.
130. McEwan P.E., Gray G.A., Sherry L., Webb D.J., Kenyon C.J.: Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* 1998, 98, 24, 2765-73.
131. McNally J.S., Davis M.E., Giddens D.P., Saha A., Hwang J., Dikalov S., Jo H., Harrison D.G.: Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2003, 285, 6, H2290-7.
132. Meneshian A., Bulkley G.B.: The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002, 9, 3, 161-75.
133. Mohri M., Egashira K., Tagawa T., Kuga T., Tagawa H., Harasawa Y., Shimokawa H., Takeshita A.: Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure. *Hypertension* 1997, 30, 1 Pt 1, 50-6.
134. Mollnau H., Oelze M., August M., Wendt M., Daiber A., Schulz E., Baldus S., Kleschyov A.L., Materne A., Wenzel P., Hink U., Nickenig G., Fleming I., Munzel T.: Mechanisms of increased vascular superoxide production in an experimental model of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005, 25, 12, 2554-9.
135. Mollnau H., Wendt M., Szocs K., Lassegue B., Schulz E., Oelze M., Li H., Bodenschatz M., August M., Kleschyov A.L., Tsilimingas N., Walter U., Forstermann U., Meinertz T., Griendling K., Munzel T.: Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ. Res*. 2002, 90, 4, E58-65.

136. Mueller C.F., Laude K., McNally J.S., Harrison D.G.: ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25, 2, 274-8.
137. Murad F.: Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355, 19, 2003-11.
138. Murdoch C.E., Zhang M., Cave A.C., Shah A.M.: NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc. Res.* 2006.
139. Nakamura K., Fushimi K., Kouchi H., Mihara K., Miyazaki M., Ohe T., Namba M.: Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation* 1998, 98, 8, 794-9.
140. Nightingale A.K., Blackman D.J., Ellis G.R., Schmitt M., Morris-Thurgood J.A., Jones E.A., Frenneaux M.P.: Preservation of venous endothelial function in the forearm venous capacitance bed of patients with chronic heart failure despite arterial endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001, 37, 4, 1062-8.
141. Ogilvie R.I., Zborowska-Sluis D.: Effect of chronic rapid ventricular pacing on total vascular capacitance. *Circulation* 1992, 85, 4, 1524-30.
142. Pacher P., Schulz R., Liaudet L., Szabo C.: Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005, 26, 6, 302-10.
143. Padmaja S., Huie R.E.: The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 195, 2, 539-44.
144. Pagano P.J., Chanock S.J., Siwik D.A., Colucci W.S., Clark J.K.: Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension* 1998, 32, 2, 331-7.
145. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987, 327, 6122, 524-6.
146. Paravicini T.M., Gulluyan L.M., Dusting G.J., Drummond G.R.: Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ. Res.* 2002, 91, 1, 54-61.
147. Paravicini T.M., Touyz R.M.: Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2006, 71, 2, 247-58.

-
148. Park H.S., Chun J.N., Jung H.Y., Choi C., Bae Y.S.: Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2006, 72, 3, 447-55.
 149. Park H.S., Jung H.Y., Park E.Y., Kim J., Lee W.J., Bae Y.S.: Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 2004, 173, 6, 3589-93.
 150. Pfeffer M.A., Braunwald E.: Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990, 81, 4, 1161-72.
 151. Pimentel D.R., Amin J.K., Xiao L., Miller T., Viereck J., Oliver-Krasinski J., Baliga R., Wang J., Siwik D.A., Singh K., Pagano P., Colucci W.S., Sawyer D.B.: Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2001, 89, 5, 453-60.
 152. Qamirani E., Ren Y., Kuo L., Hein T.W.: C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25, 5, 995-1001.
 153. Ramachandran S., Rong R., Parthasarathy S.: Oxidants and antioxidants affect the expression of glycodelin. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 34, 7, 818-23.
 154. Ray R., Shah A.M.: NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin. Sci. (Lond)* 2005, 109, 3, 217-26.
 155. Rector T.S., Cohn J.N.: Prognosis in congestive heart failure. *Annu. Rev. Med.* 1994, 45, 341-50.
 156. Rees D.D., Palmer R.M., Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989, 86, 9, 3375-8.
 157. Renke M., Tylicki L., Knap N., Rutkowski P., Neuwelt A., Petranyuk A., Larczynski W., Wozniak M., Rutkowski B.: High-dose angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008.
 158. Rosado J.A., Gonzalez A., Salido G.M., Pariente J.A.: Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal.* 2002, 14, 6, 547-56.

159. Rosolova H., Cech J., Simon J., Spinar J., Jandova R., Widimský sen J., Holubec L., Topolcan O.: Short to long term mortality of patients hospitalised with heart failure in the Czech Republic--a report from the EuroHeart Failure Survey. *Eur. J. Heart Fail.* 2005, 7, 5, 780-3.
160. Rueckschloss U., Galle J., Holtz J., Zerkowski H.R., Morawietz H.: Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 2001, 104, 15, 1767-72.
161. Rueckschloss U., Quinn M.T., Holtz J., Morawietz H.: Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 11, 1845-51.
162. Sadoshima J., Izumo S.: Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* 1993, 73, 3, 413-23.
163. Schafer A., Fraccarollo D., Hildemann S.K., Tas P., Ertl G., Bauersachs J.: Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 2003, 58, 3, 655-62.
164. Scherrer-Crosbie M., Ullrich R., Bloch K.D., Nakajima H., Nasserri B., Aretz H.T., Lindsey M.L., Vancon A.C., Huang P.L., Lee R.T., Zapol W.M., Picard M.H.: Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2001, 104, 11, 1286-91.
165. Schrier R.W.: Water and sodium retention in edematous disorders: role of vasopressin and aldosterone. *Am. J. Med.* 2006, 119, 7 Suppl 1, S47-53.
166. Schrier R.W., Abraham W.T.: Hormones and hemodynamics in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341, 8, 577-85.
167. Serrander L., Cartier L., Bedard K., Banfi B., Lardy B., Plastre O., Sienkiewicz A., Forro L., Schlegel W., Krause K.H.: NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J.* 2007, 406, 1, 105-14.
168. Seta Y., Shan K., Bozkurt B., Oral H., Mann D.L.: Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J. Card. Fail.* 1996, 2, 3, 243-9.

169. Shah A.M., MacCarthy P.A.: Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol. Ther.* 2000, 86, 1, 49-86.
170. Siwik D.A., Colucci W.S.: Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail. Rev.* 2004, 9, 1, 43-51.
171. Siwik D.A., Pagano P.J., Colucci W.S.: Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001, 280, 1, C53-60.
172. Spallarossa P., Altieri P., Garibaldi S., Ghigliotti G., Barisione C., Manca V., Fabbi P., Ballestrero A., Brunelli C., Barsotti A.: Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc. Res.* 2006, 69, 3, 736-45.
173. Spiekermann S., Landmesser U., Dikalov S., Brecht M., Gamez G., Tatge H., Reepschlager N., Hornig B., Drexler H., Harrison D.G.: Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2003, 107, 10, 1383-9.
174. Suematsu N., Tsutsui H., Wen J., Kang D., Ikeuchi M., Ide T., Hayashidani S., Shiomi T., Kubota T., Hamasaki N., Takeshita A.: Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 2003, 107, 10, 1418-23.
175. Suh Y.A., Arnold R.S., Lassegue B., Shi J., Xu X., Sorescu D., Chung A.B., Griendling K.K., Lambeth J.D.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999, 401, 6748, 79-82.
176. Swedberg K., Eneroth P., Kjeksbus J., Wilhelmsen L.: Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990, 82, 5, 1730-6.
177. Tadel-Kocjancic S., Zorman S., Jazbec A., Gorjup V., Zorman D., Noc M.: Effectiveness of primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction from a 5-year single-center experience. *Am. J. Cardiol.* 2008, 101, 2, 162-8.
178. Takayama T., Wada A., Tsutamoto T., Ohnishi M., Fujii M., Isono T., Horie M.: Contribution of vascular NAD(P)H oxidase to endothelial dysfunction in heart failure and the therapeutic effects of HMG-CoA reductase inhibitor. *Circ. J.* 2004, 68, 11, 1067-75.

179. Takeya R., Ueno N., Kami K., Taura M., Kohjima M., Izaki T., Nunoi H., Sumimoto H.: Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 27, 25234-46.
180. Tanaka Y., Makiyama Y., Mitsui Y.: Endothelin-1 is involved in the growth promotion of vascular smooth muscle cells by hyaluronic acid. *Int. J. Cardiol.* 2000, 76, 1, 39-47.
181. Teerlink J.R.: Endothelins: pathophysiology and treatment implications in chronic heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2005, 2, 4, 191-7.
182. Thomas S.R., Witting P.K., Drummond G.R.: Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2008, 10, 10, 1713-65.
183. Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C., Oral H., Young J.B., Mann D.L.: Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996, 27, 5, 1201-6.
184. Tousoulis D., Charakida M., Stefanadis C.: Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart* 2006, 92, 4, 441-4.
185. Tsutamoto T., Hisanaga T., Wada A., Maeda K., Ohnishi M., Fukai D., Mabuchi N., Sawaki M., Kinoshita M.: Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998, 31, 2, 391-8.
186. Ueyama T., Lekstrom K., Tsujibe S., Saito N., Leto T.L.: Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 42, 2, 180-90.
187. Ukai T., Cheng C.P., Tachibana H., Igawa A., Zhang Z.S., Cheng H.J., Little W.C.: Allopurinol enhances the contractile response to dobutamine and exercise in dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation* 2001, 103, 5, 750-5.
188. Ungureanu-Longrois D., Balligand J.L., Simmons W.W., Okada I., Kobzik L., Lowenstein C.J., Kunkel S.L., Michel T., Kelly R.A., Smith T.W.: Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to beta-adrenergic agonists. *Circ. Res.* 1995, 77, 3, 494-502.

-
189. Ushio-Fukai M., Tang Y., Fukai T., Dikalov S.I., Ma Y., Fujimoto M., Quinn M.T., Pagano P.J., Johnson C., Alexander R.W.: Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ. Res.* 2002, 91, 12, 1160-7.
 190. Vasani R.S., Sullivan L.M., Roubenoff R., Dinarello C.A., Harris T., Benjamin E.J., Sawyer D.B., Levy D., Wilson P.W., D'Agostino R.B.: Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003, 107, 11, 1486-91.
 191. Venugopal S.K., Devaraj S., Jialal I.: Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2005, 14, 1, 33-7.
 192. Wang H.D., Xu S., Johns D.G., Du Y., Quinn M.T., Cayatte A.J., Cohen R.A.: Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circ. Res.* 2001, 88, 9, 947-53.
 193. Wautier M.P., Chappey O., Corda S., Stern D.M., Schmidt A.M., Wautier J.L.: Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001, 280, 5, E685-94.
 194. Widder J., Behr T., Fraccarollo D., Hu K., Galuppo P., Tas P., Angermann C.E., Ertl G., Bauersachs J.: Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent. *Cardiovasc. Res.* 2004, 63, 1, 161-7.
 195. Wong M., Staszewsky L., Carretta E., Barlera S., Latini R., Chiang Y.T., Glazer R.D., Cohn J.N.: Signs and symptoms in chronic heart failure: relevance of clinical trial results to point of care-data from Val-HeFT. *Eur. J. Heart Fail.* 2006, 8, 5, 502-8.
 196. Yndestad A., Damas J.K., Oie E., Ueland T., Gullestad L., Aukrust P.: Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores. *Heart Fail. Rev.* 2006, 11, 1, 83-92.
 197. Zalba G., San Jose G., Moreno M.U., Fortuno M.A., Fortuno A., Beaumont F.J., Diez J.: Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001, 38, 6, 1395-9.