

**ANNALES  
ACADEMIAE MEDICAE  
GEDANENSIS  
TOM XXXVII  
2007  
SUPPLEMENT 4**



AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Tomasz Henryk Wierzba

**WPLYW OGRANICZENIA MECHANIZMÓW  
WOLNORODNIKOWYCH NA REGULACJĘ UKŁADU  
KRAŻENIA I WYDOLNOŚĆ FIZYCZNĄ  
U SZCZURÓW Z NADCIŚNIENIEM TĘTNICZYM**

*EFFECT OF FREE-RADICAL SUPPRESSION  
ON CARDIOVASCULAR REGULATION  
AND ENDURANCE CAPACITY IN HYPERTENSIVE RATS*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Fizjologii  
Kierownik: prof. dr hab. Witold Juzwa

GDAŃSK 2007

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY  
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD  
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](mailto: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

*Moim Najbliższym*



*Składam serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Witoldowi Juzwie kierownikowi Katedry i Zakładu Fizjologii AM w Gdańsku za wszechstronne wsparcie i nieustającą zachętę w czasie tworzenia tej pracy.*

*Zespołowi Katedry Bioenergetyki Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku, a szczególnie Doktorowi Wiesławowi Ziółkowskiemu, Doktorowi Jackowi Kaczorowi, Profesorowi Jędrzejowi Antosiewiczowi i Doktorowi Robertowi Olkowi chciałbym gorąco podziękować za wszechstronną pomoc w badaniach doświadczalnych, a w szczególności za umożliwienie wykonania pod Ich kierownictwem oznaczeń aktywności mitochondriów.*

*Pragnąłbym wspomnieć Śp. Profesora Jerzego Popinigisa, wieloletniego kierownika Katedry, który mnie zainspirował do podjęcia badań stanowiących przedmiot niniejszej pracy, wykazał przy tym ogromną życzliwość i zrozumienie, otwierając przede mną swoje laboratorium naukowe.*

*Serdecznie dziękuję Doktorowi Jerzemu Nowakowi i Doktorowi Bartłomiejowi Ciesielskiemu, z Katedry i Zakładu Fizyki i Biofizyki AMG, którzy poszerzyli moje horyzonty badawcze o metodykę oznaczeń z wykorzystaniem spektroskopii EPR oraz kierownikowi Katedry Panu Profesorowi Bartłomiejowi Kwiatkowskiemu za życzliwość i zachętę przy tworzeniu pracy.*

*Składam serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Michałowi Woźniakowi, kierownikowi Katedry i Zakładu Chemii Medycznej AMG za zainteresowanie mnie tematyką rodników tlenowych i za pasjonujące dyskusje naukowe.*

*Moim Najbliższym dziękuję za cierpliwość, wyrozumiałość i wszechstronne wsparcie podczas realizacji pracy.*





## Spis treści

<b>1. WSTĘP I PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA .....</b>	<b>13</b>
1.1. Nadciśnienie tętnicze jako problem epidemiologiczny o złożonej patogenezie. ....	13
1.2. Reaktywne postaci tlenu (ROS) w układach biologicznych .....	14
1.3. Powstawanie reaktywnych postaci tlenu <i>in vivo</i> .....	15
1.4. Typy reakcji wolnorodnikowych w żywych organizmach .....	19
1.5. Biologiczna rola ROS .....	19
1.6. Mechanizmy obrony antyoksydacyjnej .....	21
1.7. ROS jako czynniki chorobotwórcze .....	23
1.8. ROS jako niezbędny element życia .....	27
1.9. ROS w komórkowych mechanizmach regulacyjnych .....	28
1.10. Znaczenie ROS w ogólnoustrojowych mechanizmach regulacyjnych .....	30
1.11. Udział ROS w mechanizmach adaptacji organizmu do zmian środowiska zewnętrznego .....	33
1.12. Poszukiwania roli ROS w układzie krążenia .....	34
1.13. Postulowany udział ROS w rozwoju nadciśnienia tętniczego .....	35
1.14. Nadciśnienie tętnicze jako konsekwencja zaburzenia równowagi czynnościowej między endogennymi oksydantami i mechanizmami obrony antyoksydacyjnej .....	35
1.15. Zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i nitroksylowych znaczników spinowych w eksperymentalnych modelach nadciśnienia tętniczego .....	36
1.16. Niepowodzenia praktycznego stosowania antyoksydantów .....	39
<b>2. CEL BADAŃ: .....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>42</b>
3.1. Biodystrybucja i kinetyka zaniku tempola .....	43

3.1.1. Zanik tempola w krwiobiegu po jednorazowej dawce dożylny.....	43
3.1.2. Występowanie tempola w tkankach po podaniu doustnym .....	45
3.1.3. Rozmieszczenie tempola w wybranych tkankach po podaniu dootrzewnowym.....	46
3.2. Ocena wpływu tempola na ciśnienie tętnicze i czynność serca .....	47
3.2.1. Materiał.....	47
3.2.2. Metodyka eksperymentalna .....	47
3.3. Doświadczenia na układzie izolowanych tętnic krezkowych .....	59
3.3.1. Materiał.....	59
3.3.2. Metodyka eksperymentalna .....	61
3.3.3. Oznaczanie czynności oddechowej mitochondriów .....	69
3.3.5. Odczynniki.....	72
3.3.5. Metody analizy statystycznej.....	72
<b>4. WYNIKI.....</b>	<b>74</b>
4.1. Biodystrybucja tempola i jego zanik w tkankach .....	74
4.1.1. Dawkowanie dożylny.....	74
4.1.2. Dawkowanie doustne.....	76
4.1.3. Dawkowanie dootrzewnowe.....	78
4.2. Wpływ tempola na ciśnienie tętnicze i czynność serca .....	79
4.2.1. Przebieg krzywych dawka – odpowiedź po podaniu dożylnym.....	79
4.2.2. Wpływ 14-dniowego podawania tempola na ciśnienie tętnicze i częstość akcji serca.....	79
4.2.3 Wpływ przewlekłego podawania tempola na ciśnienie tętnicze skurczowe (SBP), częstość akcji serca (HR) i adaptację do wysiłku.....	81
4.3. Wpływ podawania tempola na czynność izolowanego serca poddanego ischemii i reperfuzji.....	86

4.4. Preparat izolowanych tętnic kręzkowych szczura .....	92
4.4.1. Wpływ tempola na przebieg zależności między napięciem bodźca elektrycznego i odpowiedzią naczyniokurczącą.....	92
4.4.2. Wpływ eliminacji anionorodnika ponadtlenkowego na próg pobudliwości i odpowiedzi naczyniokurczące preparatów kręzkowych na stymulację elektryczną.....	97
4.5. Wpływ tempola na charakterystykę fali ciśnieniowej w aorcie.....	128
4.6. Ocena wpływu tempola na odruch z baroreceptorów tętnicznych .....	132
4.7. Wpływ tempola na zmienność rytmu serca i odpowiedzi układu krążenia na hipoksję hipobaryczną.....	140
4.8. Wpływ tempola czynność mitochondriów u szczurów z nadciśnieniem tętniczym poddanych treningowi biegowemu.....	149
<b>5. DYSKUSJA .....</b>	<b>155</b>
5.1 Odmienna charakterystyka czynnościowa szczurów z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym genetycznie (SHR) i indukowanym przez przytłumienie syntezy endogennego NO.....	155
5.2. Wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego w naczyniach tętnicznych wyizolowanych od szczurów z nadciśnieniem tętniczym.....	166
5.3 Biodostępność tempola .....	168
5.4 Efekt hipotensyjny tempola .....	171
5.5. Efekty tempola w izolowanym układzie naczyń tętnicznych .....	174
5.6. Wpływ tempola na serce izolowane.....	176
5.7. Regulacyjne aspekty supresji ROS przy użyciu tempola.....	177
5.8. Wpływ tempola na wydolność fizyczną i przemiany energetyczne.....	180
5.9. Podsumowanie ważniejszych wyników badań .....	182

<b>6. WNIOSKI .....</b>	<b>185</b>
<b>7. STRESZCZENIE .....</b>	<b>186</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>187</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>188</b>

# 1. WSTĘP I PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

## 1.1. Nadciśnienie tętnicze jako problem epidemiologiczny o złożonej patogenezie

W ostatnim półwieczu nadciśnienie tętnicze stało się jednym najważniejszych problemów epidemiologicznych współczesnej cywilizacji<sup>1-3</sup>. Dane statystyczne ujawniły, że w wielu krajach, w tym: w Polsce, Rosji, Finlandii, krajach nadbałtyckich, Czechach, Niemczech, Szkocji, Irlandii, na Węgrzech, a w szczególności w Ameryce Łacińskiej i wśród mieszkańców rasy czarnej w USA i Wielkiej Brytanii ponad 30% dorosłej populacji choruje na nadciśnienie tętnicze<sup>4-8</sup>. Przyjmuje się, że w Polsce problem ten dotyczy około 8 do 9 milionów osób, przy czym nadciśnienie tętnicze występuje u około 40-50% populacji powyżej 50 roku życia<sup>9</sup>. Szacuje się, jedynie u 8 do 12% chorych udaje się obniżyć ciśnienie tętnicze do wartości przyjętych za prawidłowe<sup>10,11</sup>, przy czym odsetek ten nie różni się znacząco od wyników leczenia w innych krajach<sup>12,13</sup>. Zastanawiające są przesłanki niskiej skuteczności leczenia. Obok niedostatecznej świadomości społecznej i powodów socjoekonomicznych istotną przeszkodą efektywnej terapii jest złożona i jedynie częściowo zrozumiana etiopatogeneza choroby, co uniemożliwia zastosowanie celowanego algorytmu leczenia<sup>14</sup>.

W myśl powszechnie akceptowanej teorii mozaikowej sformułowanej w 1949 roku przez Page'a<sup>15</sup> ciśnienie tętnicze jest wypadkową wzajemnie powiązanych czynników: neurogennych, hemodynamicznych, humoralnych i nefrogennych, które tworzą wzajemnie uzupełniający się system dynamicznej równowagi. W swojej koncepcji Page wyodrębnił kilka do kilkunastu szczegółowych czynników w każdej kategorii, w tym: jako czynniki neurogenne: uszkodzenie włókien nerwowych odpowiadających za odruch z baroreceptorów tętniczych i uszkodzenie pnia mózgu i wzrost ciśnienia śródczaszkowego; jako czynniki sercowo-naczyniowe: niewydolność krążenia, zwężenie aorty, przetoki tętniczo-żylnie i stwardnienie ścian tętnic; jako czynniki endokryne m. in.: gruczolaka przysadki mózgowej, guzy rdzenia i kory nadnerczy, hiperadrenalinemię i hiperkortyzolemie; jako czynniki nefrogenne: zapalenia nerek, utrudnienie w swobodnym odpływie moczu, uszkodzenia nerek pourazowe oraz zwężenie naczyń nerkowych. Intensywne badania prowadzone w następnych latach znacznie poszerzyły pierwotną mozaikę Page'a o kolejne czynniki: takie jak, m. in: wiek<sup>16,17</sup>, masa ciała<sup>18,19</sup>, płeć<sup>20</sup>, palenie tytoniu<sup>21</sup> predyspozycje genetyczne<sup>22-24</sup>, zwiększony udział komponenty współczulnej w ośrodkowej regulacji krążenia<sup>25-27</sup>, zaburzenia elektrolitowe związane z nieprawidłowym transportem jonów przez błony biologiczne<sup>28-31</sup>, insulinę<sup>32,33</sup>, czynniki wzrostu<sup>34,35</sup>, czynniki zapalne<sup>36,37</sup> i mechanizmy immunologiczne<sup>38</sup>, śródbłonek naczyniowy<sup>39</sup>, nieprawidłową budowę ścian naczyń tętniczych<sup>40,41</sup>, zaburzenia lokalnego uwalniania substancji wazoaktywnych<sup>42-45</sup>, zaburzenia przemian metabolicznych, w tym lipidów i glukozy<sup>33,46</sup> zaburzenia hemostazy<sup>47-49</sup>, cechy osobowości i podatność na stres<sup>50</sup>, a także przebieg ciąży i masę urodzeniową ciała<sup>51-55</sup>. W rezultacie całościowe zrozumienie systemu, a także ocena wpływu wyłączenia, lub nadekspresji jednego z czynników regulacyjnych na całościowe funkcjonowanie układu, stały się coraz trudniejsze<sup>56</sup>.

Pod koniec lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia dwie grupy badaczy: japońska<sup>57</sup> i rosyjska<sup>58</sup> opublikowały wyniki badań doświadczalnych, sugerujące związek reaktywnych postaci tlenu (ROS) z nadciśnieniem tętniczym. Jakkolwiek prace obu zespołów początkowo nie wywołały szerokiego echa w środowisku naukowym, to można przyjąć,

że otworzyły drogę do sformułowania koncepcji o znaczącej roli endogennych procesów utleniania w rozwoju nadciśnienia tętniczego.

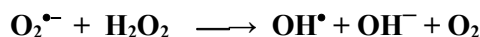
## 1.2. Reaktywne postaci tlenu (ROS) w układach biologicznych

Udział tlenu w przemianach metabolicznych i w rozwoju procesów chorobowych wzbudza narastające zainteresowanie badaczy od jego odkrycia przez Priestleya w 1774 roku, u którego oddychanie czystym tlenem wywoływało przyjemne doznania. Priestley przeprowadził pierwsze eksperymenty na zwierzętach z użyciem czystego tlenu i wynioskował, jak się później okazało niesłusznie, że oddychanie czystym tlenem wydłuża czas życia myszy. Szczególną uwagę skupiają ROS, których powstawanie w reakcjach biologicznych po raz pierwszy wykazał Chance i wsp. w 1950 roku, analizując przemiany zachodzące u bakterii przy udziale katalazy<sup>59,60</sup>, zaś Commoner wykrył ich obecność w próbkach biologicznych<sup>61</sup>. Tlen jest uniwersalnym akceptorem elektronów, umożliwiającym organizmom aerobowym wykorzystanie energii zawartej w substratach pokarmowych: węglowodanach, tłuszczach i białkach. ROS wykazują większą zdolność przyłączania elektronów niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym ( $O_2$ ). Tlen w stanie podstawowym jest pierwiastkiem stosunkowo mało reaktywnym, ze względu na swoistą konfigurację elektronów, z których dwa krążą na prostopadłych względem siebie orbitalach p, a ich spiny (kierunek obrotu wokół własnej osi) są równoległe. Nietypowość konfiguracji elektronowej w cząsteczce tlenu polega na tym, że oba te elektrony nie są sparowane, tzn. nie posiadają wzajemnego odpowiednika o spinie odwrotnym. Wysoka reaktywność większości rodników tlenowych wynika z obecności niesparowanego elektronu walencyjnego na ostatniej powłoce elektronowej. W praktyce powszechnie określa się rodniki tlenowe jako "wolne rodniki tlenowe" (WRT; oxygen free radical - OFR), chociaż dopełnienie "wolny", wprowadzone jako charakteryzujące molekułę zdolną do samoistnego istnienia, bez koniecznego związania z innymi atomami/cząsteczkami, nie ma większego sensu, ponieważ w praktyce nie są używane terminy alternatywne, jak np. "rodnik związany", lub "rodnik zależny"<sup>62</sup>. Cząsteczka tlenu w stanie podstawowym ( $O_2$ ) jest dwurodnikiem, gdyż jako rodniki tlenowe określa się postaci tlenu posiadające przynajmniej jeden niesparowany elektron. Względnie mała reaktywność podstawowej formy tlenu wynika z zasad mechaniki kwantowej, zgodnie z którymi może ona reagować jedynie z cząsteczką posiadającą dokładnie dwa niesparowane elektrony, o spinach równoległych, skierowanych przeciwnie względem elektronów w cząsteczce  $O_2$ <sup>63</sup>. Większość występujących w przyrodzie molekuł ma sparowane elektrony i dlatego nie reaguje z tlenem w stanie podstawowym. ROS nie stanowią jednorodnej klasy molekuł. Do ROS należą m.in.: nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), anion podchlorynowy ( $^-\text{OCl}$ ), nadtlenoazotyn ( $^-\text{ONOO}$ ), ozon ( $O_3$ ), które nie są rodnikami, a także cząsteczki, w których w wyniku absorpcji energii doszło do przegrupowania elektronów na orbitale o podwyższonej energii. Ich przedstawicielem jest tlen singletowy  $^1O_2$ , a ponadto liczne rodniki takie jak np.: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), rodniki nadtlenkowe ( $ROO^{\bullet}$ ), rodnik wodorotlenowy ( $OH^{\bullet}$ ). ROS reagują z większą ilością substratów i zwykle znacznie szybciej, niż standardowa cząsteczka tlenu -  $O_2$ . Cząsteczka tlenu w stanie podstawowym ulega najczęściej całkowitej redukcji, poprzez przyłączenie 4 elektronów ( $O_2^{2-}$ ), w reakcji, której produktem jest woda.

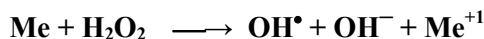


Niekiedy jednak w przebiegu reakcji chemicznych cząsteczka tlenu ulega jedynie częściowej redukcji, przyłączając jeden, dwa, lub trzy elektrony. Klasycznym produktami z tych przemian są: przy jednoelektronowej redukcji cząsteczki  $O_2$  - anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), dwuelektronowej – nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), zaś trójelektronowej - rodnik wodorotlenowy ( $OH^{\bullet}$ ).

Spośród OFR rodnik wodorotlenowy wykazuje największą reaktywność i zapewne najmniejszą specyficzność działania. Jego potencjał oksydacyjny jest tak duży, że o możliwości zaistnienia reakcji z jego udziałem nie decyduje konieczność pokonania bariery aktywacyjnej przy zetknięciu z partnerem reakcji, ale jedynie prawdopodobieństwo napotkania cząsteczki, z którą może przereagować. Oznacza to, że w warunkach biologicznych szybkość reakcji rodnika hydroksylowego jest kontrolowana przez jego dyfuzję. Rodnik wodorotlenowy powstaje zasadniczo w wyniku reakcji innych rodników. W warunkach fizjologicznych niewielka ilość rodnika  $OH^{\bullet}$  powstaje w wyniku bezpośredniej, niezbyt szybko przebiegającej reakcji anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, nazwanej od imienia odkrywców reakcją Habera-Weissa<sup>64</sup>:



Wielokrotnie szybszym i przez to efektywnym źródłem rodnika hydroksylowego jest reakcja Fentona zachodząca pomiędzy zredukowaną postacią metalu przejściowego (Me), głównie  $Fe^{2+}$  i  $Cu^+$ , z nadtlaniem wodoru:



Fenton odkrył silnie utleniające właściwości mieszaniny soli  $Fe^{2+}$  i nadtlenu wodoru w 1876 roku, a przez następnie 20 lat bezskutecznie poszukiwał jej istoty. Przebieg reakcji opisali Haber i Weiss niemal 40 lat później<sup>64</sup>.

Ostatnio wyodrębnioną grupą ROS są reaktywne postaci azotu (RNS, reactive nitrogen species), do których zalicza się tlenek azotu, aniony azotanowe i azotanowe, a także nadtlenoazotyn ( $ONOO^-$ ) i powstałe przy jego udziale produkty nitrowania o właściwościach rodników, S-nitrozotiole, które są produktami nitrozylacji, polegającej na przyłączeniu NO do grup tiolowych białek i aminokwasów oraz inne rodniki organiczne powstałe na bazie NO. Tlenek azotu i dwutlenek azotu ( $NO_2$ ) są rodnikami, gdyż posiadają niesparowany elektron ( $NO^{\bullet}$ ,  $NO_2^{\bullet}$ ). W wyniku reakcji ROS, lub RNS z cząsteczkami organicznymi powstają wolne rodniki związków organicznych, które z kolei mogą inicjować dalsze reakcje utleniania.

### 1.3. Powstawanie reaktywnych postaci tlenu *in vivo*

Na przełomie piątej i szóstej dekady ubiegłego stulecia udało się wykazać, że ROS są wytwarzane wewnątrzkomórkowo w przebiegu procesów metabolicznych<sup>65,66</sup>, a punktem zwrotnym badań nad udziałem przemian wolnorodnikowych w układach biologicznych było odkrycie generowania nadtlenu wodoru przez mitochondria<sup>67</sup>. W 1956 roku Harman postulował, że ROS stanowią produkt uboczny przemian zachodzących *in vivo*, przy udziale enzymów, opisując ROS jako destruktywne czynniki starzenia, uszkadzające komórki<sup>68</sup> i od tego czasu w opisie zjawisk wolnorodnikowych zachodzących w układach biologicznych dominuje słownictwo militarne.

Tab. 1 Podstawowe źródła ROS w organizmach żywych  
*Tab. 1 Principal sources of ROS in living organisms*

1. Mitochondrium	➤ reakcje pośredniczące przy przepływie elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego
2. Peroksysomy	➤ oksydazy: flawinowe, ksantynowa, moczanowa ➤ łańcuch transportu elektronów z udziałem cytochromu b <sub>5</sub>
3. Mikrosomy	➤ mikrosomalny łańcuch transportu elektronów z udziałem cytochromu P-450
4. Błona komórkowa	➤ peroksydacja lipidów ➤ synteza prostaglandyn
5. Białka oddechowe	➤ utlenianie hemoglobiny i mioglobiny
6. Enzymy oksydacyjne: oksydazy, oksydoreduktazy, peroksydazy	➤ oksydaza NAD(P)H ➤ oksydaza ksantynowa ➤ oksydazy flawinowe ➤ syntaza tlenku azotu (NOS)
7. Związki drobnocząsteczkowe	➤ zredukowane nukleotydy flawinowe ➤ tiole ➤ jony metali przejściowych ➤ aminy katecholowe ➤ cukry redukujące
8. Aktywacja fagocytów	➤ oksydaza NAPH ➤ mieloperoksydaza, chloroperoksydaza
9. Czynniki środowiskowe	➤ promieniowanie: jonizujące, UV, świetlne ➤ promieniowanie mikrofalowe ➤ skażenie środowiska ➤ ksenobiotyki

Według potocznego schematu wolne rodniki atakują i niszczą, czemu przeciwdziałają mechanizmy obronne organizmu i każdej z jego komórek. ROS powstają w ustroju w wyniku działania różnorodnych czynników i mechanizmów (tab. 1 wg.<sup>63,69</sup>). Podstawowym mechanizmem generującym anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru są reakcje utleniania i redukcji zachodzące w mitochondriach podczas przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy, w którym rodnik  $O_2^{\bullet-}$  jest pośredniczącym produktem



reakcji enzymatycznych. Szacuje się, że ponad 98% tlenu zaabsorbowanego przez organizm przenika do mitochondriów, gdzie, w zależności od warunków, od 0,5% do 5% całej jego puli ulega niepełnej redukcji z wytworzeniem ROS<sup>63,70,71</sup>. U człowieka, podobnie jak u innych organizmów wyższych, anionorodnik ponadtlenkowy jest wytwarzany w największych ilościach spośród wszystkich OFR. W środowisku wodnym anionorodnik  $O_2^{\bullet-}$  znajduje się w równowadze czynnościowej ze swoją uprotonowaną formą, rodnikiem wodoronadtlenkowym  $HO_2^{\bullet-}$ , która ma silniejsze właściwości utleniające, szczególnie w stosunku do anionów, łatwiej przenika przez błony komórkowe i wykazuje większą lipofilność<sup>63</sup>. W większości komórek i struktur wewnątrzkomórkowych w układzie  $O_2^{\bullet-} / HO_2^{\bullet-}$  zdecydowanie dominuje anionorodnik ponadtlenkowy, gdyż z obliczeń wynika, że przy pH = 7,4 jedynie 0,24% rodników ponadtlenkowych występuje w formie uprotonowanej<sup>63</sup>. Natomiast w środowisku kwaśnym, zwłaszcza wewnątrz lizosomów i w pobliżu błon komórkowych, znaczenie rodnika wodoronadtlenkowego jest znacznie większe. Wykazano, że anionorodnik ponadtlenkowy powstaje na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej, po obu stronach błony wewnętrznej i w macierzy mitochondrium<sup>72</sup>, przy czym znacząca część anionów  $O_2^{\bullet-}$  wytwarzanych w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów jest przenoszona do cytoplazmy przez kanały anionowe potencjało-zależne<sup>73</sup>. Powstawaniu  $O_2^{\bullet-}$  sprzyja nasilona redukcja składników łańcucha oddechowego mitochondriów, wywołana np. przez hipoksję<sup>74,75</sup>, a także znaczna hiperoksja<sup>76,77</sup>. Istotny wpływ na generację anionorodnika ponadtlenkowego ma aktywność oddechowa mitochondriów. W stanie oddechowym 3, aktywnego oddychania, gdy ADP i substraty oddechowe są dostępne, stosunkowo niewielki odsetek tlenu ulega niepełnej redukcji, zaś przy niedoborze ADP (stan oddechowy 4), wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  wielokrotnie wzrasta<sup>78</sup>. Przy braku ADP ustaje ruch jonów  $H^+$  w poprzek błony mitochondrialnej przez syntazę ATP i potencjał elektryczny mitochondriów  $\Psi$  wzrasta, co dodatkowo sprzyja zwiększonej generacji  $O_2^{\bullet-}$ . Anionorodnik ponadtlenkowy jest wytwarzany przede wszystkim w wyniku reakcji katalizowanych przez kompleksy I i III łańcucha oddechowego<sup>72,79-81</sup>, mniejsze znaczenie odgrywiają kompleksy II i IV<sup>82,83</sup>. W kompleksie I zidentyfikowano klastry żelazowo-siarkowe (N-1 $\alpha$  i N-2) jako miejsca tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego<sup>84,85</sup>, zaś w kompleksie III większość rodnika powstaje na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej w następstwie autooksydacji ubisemichinonu<sup>72</sup>. Kompleks I wydaje się generować największą ilość anionu  $O_2^{\bullet-}$  w mózgu<sup>86</sup>, zaś w sercu i płucach większe znaczenie ma wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  w obrębie kompleksu III<sup>87,88</sup>. Przy braku ADP elektrony oderwane od utlenionego bursztynianu mogą przepływać z powrotem do kompleksu I łańcucha oddechowego i redukować  $NAD^+$  do  $NADH$ <sup>89,90</sup>. Ten odwrócony transport elektronów przyczynia się do zwiększonej generacji ROS<sup>91</sup>. Szybkość generowania anionu  $O_2^{\bullet-}$  wzrasta wraz ze zwolnieniem przepływu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego i przy zwiększonej prężności tlenu<sup>92</sup>. Nadtlenek wodoru powstaje w mitochondriach podczas dwuelektronowej redukcji tlenu w obrębie cytochromu c, w wyniku reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z dinukleotydem nikotynoamidoadeninowym związanym z enzymem, np. z dehydrogenazą mleczanową (LDH-NADH)<sup>63</sup> i w znacznej mierze poprzez reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, katalizowaną przez dysmutazę ponadtlenkową (MnSOD), przebiegającą według schematu:



Reakcja dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego może również zachodzić samistnie, choć ze znacznie mniejszą szybkością.

Ostatnie badania wskazują na kluczową rolę białek regulacyjnych, w tym białka p66<sup>Shc</sup> w wytwarzaniu anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru w mitochondriach, na istotną rolę tych białek w regulacji czynności mitochondriów, w tym w indukcji, lub hamowaniu apoptozy:

Różnorodne drobnocząsteczkowe składniki komórek przyczyniają się do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego, w tym: zredukowane nukleotydy flawinowe<sup>63,93</sup>, zredukowana ryboflawina<sup>63,94</sup>, glukoza i inne cukry redukujące<sup>63,95</sup>, związki tiolowe<sup>96,97</sup>, aminy katecholowe<sup>98,99</sup>, podczas ich autooksydacji zachodzącej spontanicznie, lub katalizowanej przez jony metali przejściowych: żelaza, miedzi i cynku, manganu, molibdenu, kobaltu, według schematu:

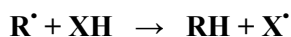


ROS powstają ponadto jako produkt przejściowy przy utlenianiu hemoglobiny i mioglobiny<sup>100,101</sup> oraz pod wpływem enzymów utleniających m.in: oksydazy ksantynowej<sup>102-104</sup>, oksydazy NAD(P)H<sup>105</sup>, cyklooksygenazy<sup>106</sup>, lipooksygenazy<sup>107</sup>, oksydazy aldehydowej<sup>108</sup>, a także syntazy tlenu azotu (NOS)<sup>109</sup>. Wytwarzanie anionów O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i ONOO<sup>-</sup> jest w ostatnich latach przedmiotem szczególnego zainteresowania. NOS jest enzymem, zawierającym nukleotydy flawinowe FAD i FMN, który w obecności kofaktora - tetrahydrobiopteryny, katalizuje reakcję przekształcenia argininy do cytruliny z uwolnieniem tlenu azotu (NO). Reakcja ma przebieg złożony, a do jej prawidłowego przebiegu wymagane jest 0,1 do 1 mM stężenie argininy w sąsiedztwie enzymu. Przy oksydacyjnym uszkodzeniu enzymu, niedostatecznym wysyceniu NOS przez tetrahydrobiopterynę, lub argininę, dwie podjednostki tworzące enzym ulegają rozprężeniu i w efekcie enzym nie działa na standardowy substrat - argininę, natomiast jego domena reduktazowa zachowuje się jak oksydaza NADPH, przyłączając do cząsteczki tlenu jeden elektron, co prowadzi do tworzenia O<sub>2</sub><sup>•-</sup><sup>63,110,111</sup>. W sytuacji, gdzie sąsiadujące cząsteczki NOS są wysyczone tetrahydrobiopteryną w sposób nierównomierny, w taki sposób, że jedna z nich wytwarza NO, druga zaś anionorodnik ponadtlenkowy, dochodzi do równoczesnego powstawania NO i O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, które w spontanicznej przebiegającej reakcji tworzą niemal natychmiast nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>). Przy nadmiarze ROS dochodzi do utleniania tetrahydrobiopteryny związanej z NOS, co przyczynia się do rozprężenia enzymu i do zwiększonej generacji O<sub>2</sub><sup>•-</sup><sup>112</sup>. Jest to jeden z mechanizmów, przez który nadmiar oksydantów promuje ich dalsze zwiększone wytwarzanie na zasadzie błędnego koła. Pewna ilość ROS jest wytwarzana podczas transportu elektronów w mikrosomach i peroksy-somach, przy udziale cytochromu P-450 i cytochromu b<sub>5</sub>, szczególnie podczas reakcji z niektórymi ksenobiotykami<sup>63</sup>. Badania ostatnich lat wykazały, że ROS powstają w nieenzymatycznych reakcjach przyłączania cukrów do białek, określanych mianem glikacji, szczególnie w trakcie utleniania, dehydratacji produktów pośrednich glikacji oraz w wyniku przegrupowań wewnątrzcząsteczkowych<sup>63,113</sup>. Znaczące ilości anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylogowego oraz rodników alkilowych i alkoksylogowych są generowane w reakcjach cukrów prostych: glukozy, fruktozy, zachodzących przy udziale oksydazy ksantynowej w obecności jonów Fe<sup>2+</sup><sup>114</sup>. Efektywnym źródłem ROS, od którego rozpoczęły się badania wolnorodnikowe w układach biologicznych jest promieniowanie jonizujące, co stanowi jedną z podstawowych barier dla eksploracji kosmosu i stanowi wyzwanie dla personelu latającego i pasażerów często przemieszczających

się samolotami<sup>115</sup>. ROS powstają ponadto pod wpływem mikrofal<sup>116</sup> oraz promieniowania świetlnego w zakresie ultrafioletu<sup>117</sup>, a niekiedy w zakresie pasma widzialnego<sup>118</sup>. Interesującym generatorem ROS są fagocyty, które w stanie pobudzenia, określanego mianem "wybuchu oddechowego", wytwarzają przez oksydazę NADPH ogromne ilości anionorodnika ponadtlenkowego<sup>119,120</sup>, a także anion podchlorynowy ( $\text{OCl}^-$ ) przez mieloperoksydazę znajdującą się w granulocytach obojętnochłonnych<sup>121,122</sup>, i przez chloroperoksydazę, która jest enzymem granulocytów kwasochłonnych<sup>63,123</sup>. Winterbourn i wsp. obliczyli<sup>122</sup>, że mieloperoksydaza stanowi około 5% suchej masy tych krwinek, co umożliwia generowanie ilości ROS niespotykanych w innych komórkach.

#### 1.4. Typy reakcji wolnorodnikowych w żywych organizmach

ROS wykazują szerokie spektrum działania. Reakcje ROS można podzielić na trzy typy<sup>63</sup>. W reakcjach typu inicjacji dochodzi do tworzenia rodników z cząsteczek, które nie są rodnikami. Praktyczne znaczenie w warunkach fizjologicznych mają reakcje wywołane wzbudzeniem cząsteczek przez ultradźwięki oraz promieniowanie świetlne i jonizujące, a także przez jednoelektronowe reakcje typu redoks o schematycznym przebiegu:



gdzie  $\mathbf{R^{\bullet}}$  jest rodnikiem tlenowym inicjującym reakcję.

Reakcje prolongacji, lub według innej nomenklatury propagacji, odnoszą się do cząsteczek, które są nośnikami wolnego elektronu, zaś liczba zaangażowanych rodników nie zmienia się. W różnych wariantach tych reakcji dochodzi do: a) oderwania od cząsteczki macierzystej atomu, lub grupy atomów; b) przyłączenia rodnika do cząsteczki. Szczególne znaczenie odgrywają reakcje addycji rodników do wiązań podwójnych w nienasyconych kwasach tłuszczowych i kwasów nukleinowych.; c) rozerwania wiązania w stabilnej cząsteczce przekształcanej w rodnik; d) reakcji redoks w przebiegu jednoelektronowej redukcji, które mogą zachodzić w sposób kaskadowy; e) przegrupowania elektronów wewnątrz cząsteczki, lub grupy funkcyjnej, co prowadzi do powstania mniej stabilnych, ale za to bardziej reaktywnych rodników.

Terminacja następuje wtedy, gdy dochodzi do reakcji między dwoma rodnikami, przy czym jako produkty powstają cząsteczki, które nie są rodnikami.

#### 1.5. Biologiczna rola ROS

Większość reakcji wolnorodnikowych prowadzi do uszkodzenia, bądź zniszczenia cząsteczek docelowych. Efekty większości ROS są z reguły niespecyficzne, a ich spektrum działania jest tym szersze, im potencjał oksydacyjny rodnika jest większy. W tab.2 wyszczególniono w sposób uproszczony główne kierunki działania ROS u Eukaryota. Reakcje wolnorodnikowe zachodzą z udziałem związków drobnocząsteczkowych, lipidów, białek, nici DNA i towarzyszącym im histonów, jak również w reakcjach węglowodanów z aminokwasami, białkami i zasadami tworzącymi DNA.

Tab. 2 Zestawienie najważniejszych efektów ROS w komórkach, (na podstawie <sup>63,124,125</sup>)  
Tab. 2 The major cellular effects of ROS (base on <sup>63,124,125</sup>)

<p>1. Peroksydacja lipidów</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ usztywnienie i reorganizacja błon, tworzenie domen micellarnych</li><li>➤ zmiany przepuszczalności błon i sygnałowania przezbłonowego</li></ul> <p>2. Utlenianie i denaturacja białek, utlenianie grup funkcyjnych aminokwasów</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ inaktywacja enzymów</li><li>➤ uszkodzenie białek transportowych</li><li>➤ zaburzenie przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego</li><li>➤ usztywnienie cytoszkieletu</li><li>➤ zaburzenia odporności swoistej i nieswoistej, m.in.: chemotaksji, adhezji, uwalniania cytokin, uszkodzenia białek układu dopełniacza i immunoglobulin</li><li>➤ depolimeryzacja i degradacja włókien kolagenowych</li><li>➤ utlenienie hemoglobiny i mioglobiny</li></ul> <p>3. Uszkodzenia kwasów nukleinowych</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ utlenianie zasad DNA</li><li>➤ pęknięcia nici DNA</li><li>➤ zwiększenie immunogenności DNA z wytworzeniem autoprzeciwciał</li><li>➤ mutageneza, transformacje nowotworowe</li><li>➤ uszkodzenia chromosomów</li></ul> <p>4. Utlenienie węglowodanów</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ glikacja i jej konsekwencje:<ul style="list-style-type: none"><li>- zaburzenia syntezy i struktury proteoglikanów</li><li>- depolimeryzacja kwasu hialuronowego</li><li>- uszkodzenie glikoprotein na powierzchni komórek</li><li>- uszkodzenie białek, w tym tworzenie produktów zaawansowanej glikacji białek (AGE) w nadmiarze, lub o zmienionej strukturze, zmiana konformacji przestrzennej glikowanych białek, ich sieciowanie i odkładanie w postaci złogów AGE</li><li>- uszkodzenie zasad DNA</li></ul></li></ul> <p>5. Inne, nieswoiste efekty</p> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ zaburzenie metabolizmu energetycznego: zahamowanie glikolizy, fosforylacji oksydacyjnej i obniżenie stężenia ATP</li><li>➤ utlenianie związków drobnocząsteczkowych: glutation, askorbinian, nukleotydy nikotynoamidoadeninowe</li><li>➤ dysfunkcja komórek wywołana wewnątrzkomórkowym nadmiarem jonów Ca<sup>2+</sup></li><li>➤ apoptoza i nekroza</li></ul>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

. .Efekty czynnościowe uszkodzenia białek są najbardziej niejednorodne z uwagi na ich wielopostaciowość i zróżnicowaną lokalizację w ustroju i w komórce<sup>63,107,124-126</sup>. W

przebiegu wolnorodnikowej destrukcji białek dochodzi do modyfikacji niektórych reszt aminokwasowych oraz do fragmentacji i agregacji białek.

Efektom wolnorodnikowych uszkodzeń DNA są doraźne, lub trwale zakodowane zmiany metabolizmu komórki. DNA mitochondrialne jest znacznie bardziej podatne na uszkodzenia, niż jądrowe, z uwagi na stosunkowo nieduży rozmiar i brak ochronnego otoczenia histonów, czego wykładnikiem jest kilkunastokrotnie większe lokalne stężenie 8-hydroksyguaniny, która jest produktem utlenienia guaniny<sup>127</sup>. Uwzględniając fakt, że w mitochondrialnym DNA znajdują się geny kodujące syntezę wielu kluczowych pod względem czynnościowym białek, w tym: siedmiu podjednostek I kompleksu łańcucha oddechowego (oksydoreduktaza NADH-CoQ), podjednostki cytochromu b zawartego w kompleksie III łańcucha oddechowego, trzech podjednostek kompleksu IV (oksydaza cytochromu C) i dwóch podjednostek syntazy ATP<sup>128</sup>, jego defekty łatwo prowadzą do zaburzenia przemian energetycznych komórki i jej dysfunkcji<sup>129</sup>.

## 1.6. Mechanizmy obrony antyoksydacyjnej

Organizmy posiadają wielowarstwowe i uzupełniające się systemy zabezpieczające przed nadmiernym utlenianiem, zwane zwyczajowo mechanizmami obrony antyoksydacyjnej. Gdyby, jak pisał Rattan<sup>130</sup>, "...antyoksydanty były w stu procentach skuteczne to zginęlibyśmy w ciągu kilku sekund". Pomiedzy całkowitą destrukcją zależną od niepożądanego utleniania, a śmiercią wynikającą z braku oksydantów, co w praktyce oznacza brak tlenu, rozciąga się szerokie spectrum przemian fizjologicznych, w których zachodzą wolnorodnikowe reakcje utleniania i redukcji. ROS i mechanizmy ochrony przed nimi tworzą delikatną równowagę dynamiczną na każdym poziomie żywego organizmu, która dostosowuje się do zmieniających się warunków otoczenia. Naruszenie tej równowagi, z przewagą ROS, prowadzącą do potencjalnych uszkodzeń, Sies określił jako stres oksydacyjny<sup>131</sup>.

Organizmy żyjące w środowisku tlenowym wykształciły bogaty arsenał środków zabezpieczających przed niekorzystnym działaniem ROS, wśród których można wyróżnić enzymatyczne i nieenzymatyczne systemy obronne. Z punktu widzenia czynnościowego mechanizmy obrony antyoksydacyjnej można podzielić na trzy grupy<sup>63</sup>: 1) mechanizmy prewencyjne, których istotą jest niedopuszczenie do reakcji ROS ze związkami biologicznie ważnymi, 2) interwencyjne, w wyniku których dochodzi do terminacji (przerwania) niepożądanych reakcji utleniania, w tym łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych oraz 3) eliminujące i naprawcze, polegające na usuwaniu niepożądanych skutków reakcji wolnorodnikowych.

Wśród czynników pierwszej linii obrony znaczącą rolę odgrywają enzymy. Dismutaza ponadtlenkowa (SOD) usuwa ze swojego otoczenia anionorodnik ponadtlenkowy. Nadtlenek wodoru jest redukowany do wody przez katalazę i peroksydazę, w tym peroksydazę glutationu (GPx) i peroksydazę cytochromu c. Zadaniem występującej m.in. u drożdży peroksydazy cytochromu c jest usuwanie nadtlenu wodoru wytworzonego przez mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową (mtSOD) z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Kluczową rolę w usuwaniu jonów metali przejściowych, katalizujących powstawanie niezwykle reaktywnego rodnika hydroksylowego (OH<sup>\*</sup>) w reakcji Fentona, mają białka wiążące żelazo: ferrytyna, transferyna, laktoferyna oraz haptoglobulina wiążąca wolną hemoglobinę i hemopeksyna wiążąca hem. Wewnątrz komórki istotną rolę przypisuje się białkom regulującym metabolizm żelaza (*iron binding prote-*

ins: IRP1 i IRP2), które w sposób odwracalny wiążą żelazo<sup>132</sup>, przyczyniają się do zwiększenia syntezy i zmniejszenia ekspresji receptora transferrytyny oraz białkom transportującym jony miedzi: ATP7A i ATP7B<sup>133,134</sup>. Interesującym białkiem jest ceruloplazmina, która wiąże jony miedzi i katalizuje reakcję utleniania jonów Fe<sup>2+</sup> do Fe<sup>3+</sup>, przeprowadzając pełną redukcję tlenu do wody. Z kolei metalotioneiny wychwytyują jony metali ciężkich, m. in. kadmu, rtęci, cynku, miedzi i niezwykle szybko - w sposób preferencyjny reagują z rodnikami OH• i O<sub>2</sub><sup>•-</sup><sup>63,135</sup>. U człowieka biosynteza metalotionein, które występują w czterech izoformach, jest indukowana przez stres oksydacyjny<sup>136</sup>. Spośród białek osocza niekwestionowaną rolę odgrywają albuminy, które nie tylko silnie wiążą jony miedzi i w mniejszym stopniu żelaza, ale także wiążą potencjalne substraty peroksydacji lipidów i reagują poprzez swoje grupy tiolowe z rodnikami tlenowymi, nadtlenkami i podchlorynem<sup>63</sup>. Z kolei haptoglobulina, która wiąże hemoglobinę i mioglobinę oraz hemopeksyna, wiążąca hem, zapobiegają katalitycznej peroksydacji lipidów<sup>137,138</sup>. Niektóre białka enzymatyczne, np. reduktazy i hydroksylazy wykazują działanie wielokierunkowe. Reduktaza methemoglobiny z jednej strony bierze udział w przeniesieniu tlenu przez hemoglobinę, współuczestnicząc w redukcji rodników nadferylowego Fe=O<sup>3+</sup> i ferylowego Fe=O<sup>2+</sup> hemoglobiny, z drugiej zaś redukuje flawiny uprzednio utlenione przez hemoproteiny, pełniąc funkcję naprawczą<sup>139</sup>. Z kolei białka szoku termicznego (HSP), które stanowią jedną z najstarszych i najlepiej ewolucyjnie zakonserwowanych białek, tworzą wewnątrzkomórkową sieć chroniącą polipeptydy, białka i inne makrocząsteczki przed ich nadmiernym utlenianiem, jak również przyczyniają się do odtworzenia konformacji przestrzennej uprzednio uszkodzonych białek<sup>140,141</sup>.

Drobnocząsteczkowe antyoksydanty, które wykazują zazwyczaj mniejszą specyfikę działania od enzymów, pełnią funkcje jako prewencyjne i interwencyjne czynniki protekcyjne. W środowisku wodnym organizmu największe znaczenie odgrywają kwas askorbinowy, znany powszechnie jako witamina C i glutation, zaś głównymi antyoksydantami o właściwościach hydrofobowych są tokoferole, wchodzące w skład witaminy E oraz karotenoidy o strukturze podobnej do trans-retinolu, współtworzące witaminę A. Wśród czynników, które pełnią funkcję antyutleniaczy zarówno w środowisku wodnym, jak i lipidowym na szczególną uwagę zasługują melatonina<sup>142</sup> i kwas liponowy<sup>143,144</sup>, które wykazują właściwości neuroprotektcyjne. Ponadto w systemie powiązań antyoksydacyjnych uczestniczą w znaczącym stopniu: kwas moczowy, kreatynina, aminokwasy takie jak: cysteina i histydyna wraz drobnocząsteczkowymi peptydami zawierającymi cysteinę, bądź histydynę, a także  $\alpha$ -ketokwasy: kwas pirogronowy i kwas  $\alpha$ -ketoglutazarowy. Pulę endogennych czynników antyoksydacyjnych uzupełniają komponenty uzyskane z diety, m. in.: flawonoidy, antocyjaniny, karotenoidy i pochodne estrogenów<sup>63</sup>.

Złożony i nie w pełni poznany system mechanizmów antyoksydacyjnych funkcjonuje w głównym miejscu generowania ROS - w mitochondriach<sup>145</sup>. Oksydaza cytochromu c wykazuje wysokie powinowactwo do tlenu, skutecznie wymiatając tlen ze swojego otoczenia. Niska prężność tlenu w sąsiedztwie cytochromu c jest czynnikiem limitującym wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego. Jako drugi w kolejności czynnik ochraniający mitochondrium Skulachev<sup>145</sup> wymienia czynniki prowadzące do niewielkiego rozkojarzenia mitochondriów, głównie wolne kwasy tłuszczowe, co powoduje utrzymanie potencjału elektrochemicznego mitochondriów poniżej progu zwiększenia wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego przez kompleksy oddechowe I i III. Skuteczne usuwanie anionorodnika nadadtlenkowego z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów może zapewniać cytochrom c uwolniony do tej przestrzeni z zewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej mitochondrium. Znaczący wpływ mają enzymy: mito-

chondriaL-NNA dysmutaza ponadtlenkowa (mtSOD), która przekształca anion  $O_2^{\bullet-}$  do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ). Nadtlenek wodoru znacznie lepiej przenika przez błony mitochondrialne niż  $O_2^{\bullet-}$ , co umożliwia usuwanie znacznej puli ROS poza mitochondrium. Inne enzymy: peroksydaza glutationu i katalaza, której obecność stwierdzono w mitochondriach wyizolowanych z serc ludzkich, rozkładają  $H_2O_2$  w macierzy mitochondrium. Do istotnych czynników zabezpieczających mitochondria należą: tokoferol, kwas askorbinowy, zredukowany koenzym Q ( $CoQH_2$ ), białka szoku termicznego ochraniające I kompleks oddechowy oraz peptydy zawierające prolinę i betainę, które zabezpieczają kompleks II<sup>140</sup>.

## 1.7. ROS jako czynniki chorobotwórcze

W warunkach prawidłowych aktywność procesów przeciwdziałających utlenianiu jest dostosowana do powstających ROS. Nadmierne wytwarzanie ROS, lub niedostateczny potencjał układów antyoksydacyjnych, jest czynnikiem destabilizującym homeostazę, prowadzącym do uszkodzeń strukturalnych i czynnościowych i do przesterowania przemian metabolicznych w kierunku patologii. Z uwagi na krótki czas istnienia *in vivo* wielu rodników tlenowych udowodnienie udziału ROS w rozwoju zjawisk chorobowych stwarza zasadnicze trudności. Stąd też postulowane związki przyczynowe między ROS, a poszczególnymi chorobami jest najczęściej oparte na przesłankach pośrednich, wynikających z oznaczeń nadmiernej obecności produktów przemian wolnorodnikowych w badanym materiale biologicznym. Dotychczas ROS przypisano udział w rozwoju conajmniej kilkuset chorób i zjawisk chorobowych i lista ta co roku się powiększa<sup>107,146,147</sup>.

Bez wątpienia ROS przyczyniają się do rozwoju szeregu chorób metabolicznych: m. in. miażdżycy, cukrzycy<sup>95</sup>, dny moczanowej<sup>148</sup>, alkaptonurii<sup>149</sup>, hemochromatozy<sup>150</sup>, porfirii<sup>151</sup>, nadczynności tarczycy<sup>152</sup>. W patomechanizmie miażdżycy ROS są obecne na wielu poziomach jej rozwoju<sup>153-156</sup>. Są czynnikiem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, uczestniczą w przebiegu odczynu zapalnego w ścianie naczyniowej z udziałem zaktywowanych płytek krwi, monocytów i makrofagów. Przyczyniają się do powstania komórek piankowatych zawierających utlenione lipidy. Powodują utlenianie lipoprotein osocza o niskiej gęstości (LDL) i uszkodzenie receptorów dla LDL. Przedmiotem narastającego zainteresowania badaczy są przemiany metaboliczne zachodzące w mięśniach szkieletowych pod wpływem wysiłku. Zwiększone zużycie tlenu przez pracujące mięśnie, przy często niewystarczającej jego podaży, przyczynia się zmiany profilu metabolicznego mięśnia. Wynika to nie tylko z niedoboru ATP i postępującego ubytku własnych substratów energetycznych mięśnia, ale także z nagromadzenia produktów przemiany materii, takich jak: kwas mlekowy i amoniak oraz ze znacznie zwiększonej generacji ROS. Przyjmuje się, że lokalny stres oksydacyjny leży u podłoża urazów mechanicznych mięśni i ścięgien wywołanych wysiłkiem fizycznym oraz powysiłkowymi objawami przeciążenia układu mięśniowo-stawowego.

ROS są uznanym czynnikiem chorób neurodegeneracyjnych<sup>157-159</sup>, takich jak: choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, płasawica Huntingtona, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne, a także uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego wywołanych przez zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz udary i urazy<sup>160-162</sup>. Wykazano obecność uszkodzeń wolnorodnikowych w przebiegu chorób narządu wzroku: w retinopatiach<sup>163</sup>, zaćmie<sup>164,165</sup>; i w jaskrze<sup>166</sup>.

ROS uczestniczą w rozwoju niedokrwistości w przebiegu wrodzonych nieprawidłowości metabolizmu krwinek czerwonych: w anemii sierpowatokrwinkowej<sup>167</sup>, anemii Fanconiego<sup>168</sup>, talasemii<sup>169</sup> i anemii hemolitycznej związanej z niedoborem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (fawizm)<sup>170</sup>. ROS są czynnikiem chorób, których nieodłączną cechą jest występowanie odczynu zapalnego: infekcyjnych, takich jak: pospolite infekcje typu grypowego<sup>171</sup>, AIDS<sup>63</sup>, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych<sup>172</sup>, zapalenie nerek<sup>173</sup>, trzustki<sup>174</sup>, wątroby<sup>175</sup>, a także chorób o podłożu autoimmunologicznym: tocznia rumieniowatego<sup>176</sup>, reumatoidalnego zapalenia stawów<sup>177</sup>, kłębkowego zapalenia nerek<sup>178</sup>, zapalenia naczyń krwionośnych<sup>179</sup>, choroby Gravesa-Basedowa<sup>180</sup>, neurogennych miopatii, takich jak zespół sztywności uogólnionej (stiff-man syndrome)<sup>181</sup>. Ważnym elementem chorób o podłożu autoimmunologicznym, a także onkogenezy jest powstawanie oksydacyjnie zmodyfikowanego DNA, które może indukować skierowaną przeciw sobie odpowiedź odpornościową<sup>182</sup>.

Rodniki tlenowe są zaangażowane w chorobach układu oddechowego<sup>183,184</sup>: w reakcjach skurczowych mięśniówki gładkiej oskrzeli w przebiegu astmy i zapalenia oskrzeli z odczynem spastycznym, w rozedmie płuc i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, w zespole błon szklistych i w mukowiscydozie. Zakres czynników środowiskowych, zawartych w wodzie, powietrzu, pokarmach, zdolnych do wywoływania patologicznych reakcji wolnorodnikowych wydaje się w praktyce niemal nieograniczony. Oparzenia, choroba popromienna i wywołane promieniowaniem jonizującym mutacje genowe sprzyjające kancerogenezie i teratogenezie są przykładami zaburzeń wywoływanych czynnikami fizycznymi z udziałem rodników tlenowych<sup>185-187</sup>. ROS uczestniczą w przemianach metabolicznych rozmaitych związków egzogennych, przyczyniając się do ich toksyczności. W zatruciach glinem i tytanem oraz metalami ciężkimi: kadmem, ołowiem, niklem, arsenem i rtęcią dochodzi do destrukcyjnego utleniania białek i lipidów<sup>107,188,189</sup>. Rodniki tlenowe przyczyniają się do wielokierunkowych uszkodzeń wywołanych szeroką gamą związków organicznych, w tym trójchlorku i czterochlorku węgla<sup>190,191</sup>, związkami fosforoorganicznymi i herbicydami stosowanymi do ochrony roślin<sup>107</sup> oraz benzenem i jego pochodnymi<sup>107,192</sup>.

W ostatnich kilkunastu latach przedmiotem wzrastającego zainteresowania badaczy są mechanizmy prowadzące do unicestwienia komórki, przy czym szczególną uwagę skupiają ROS. Rozróżniane są dwa typy śmierci komórkowej. Nekroza, jest z punktu widzenia komórki, procesem przypadkowym, indukowanym przez czynniki wywodzące się z poza komórki, często niezależne od jej dotychczasowego metabolizmu. W przebiegu nekrozy dochodzi do drastycznej redukcji komórkowych zasobów ATP oraz uszkodzenia organelli komórkowych i błony komórkowej. Apoptoza jest zjawiskiem zaprogramowanym, w którym w zorganizowany i hierarchiczny sposób dochodzi do rozpadu komórki, na otoczone błoną komórkową ciała apoptotyczne, które są następnie fagocytowane przez komórki sąsiadujące<sup>193-195</sup>. Nekroza obejmuje zwykle całe obszary tkanki, zaś procesy apoptozy mają najczęściej charakter rozsianych ubytków komórkowych w obrębie tkanki. Nekroza jest zwykle zjawiskiem dla organizmu niekorzystnym, jak np. martwica komórek wątrobowych w przebiegu zapalenia wątroby, lub ostrych zatruc. Z drugiej jednak strony nekroza w obrębie tkanki nowotworowej jest pożądanym celem terapii nowotworowej. Istotne znaczenie w przebiegu nekrozy przypisuje się ROS, głównie nadtlenkowi wodoru i rodnikowi hydroksylowemu, generowanym w znacznym nadmiarze, wskutek załamania metabolizmu energetycznego komórki<sup>196</sup>. Powstawaniu rodnika OH• sprzyjają czynniki zwiększające dostępność jonów Fe<sup>2+</sup>, które katalizują reakcję Fentona<sup>197</sup>. Liczne publikacje z ostatnich pięciu lat wskazują na decydujący udział ROS w indukcji apoptozy oraz na udział przemian wolnorodnikowych w jej ko-



lejnycy fazach<sup>198</sup>. Wykazano, że antyoksydanty, takie jak: N-acetylocysteina, jak również zwiększona ekspresja mtSOD hamują apoptozę. Kluczowe znaczenie w rozwoju apoptozy ma zwiększenie wytwarzania ROS przez mitochondria wskutek zaburzeń w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego. W rezultacie dochodzi do uwolnienia cytochromu c z błony wewnętrznej mitochondriów do cytoplazmy<sup>199</sup>, zwiększenia przepuszczalności megakanałów w błonie mitochondrialnej, uwolnienia do cytoplazmy kolejnych czynników: prokaspaz, czynnika indukującego apoptozę (AIF), apoptotycznego czynnika aktywującego proteazy (APAF-1), co ostatecznie prowadzi do aktywacji kaspaz i destrukcji białek komórkowych. Z kolei biogeneza mitochondriów i stabilność mitochondrialnego genomu, zależy od skoordynowania ekspresji genów w jądrze komórkowym i w mitochondriach. Wyniki najnowszych badań sugerują, że ROS pełnią funkcję sygnałową i regulującą wzajemne powiązania czynnościowe jądra komórkowego i mitochondrium<sup>198</sup>. Stres oksydacyjny może z jednej strony prowadzić do dysfunkcji mitochondriów i do zaburzeń integralności mtDNA, z drugiej zaś może przyczyniać się do zaburzeń strukturalnych jądra komórkowego, przejawiających się w postaci kondensacji chromatyny. Wskutek nadmiaru ROS dochodzi do wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie, co z kolei aktywuje nukleazy trawiące DNA i destrukcję jądra komórkowego<sup>200</sup>. Apoptoza jest zjawiskiem niekorzystnym tylko w szczególnych sytuacjach, jak np.: w rozwoju niewydolności krążenia w niedokrwionym sercu, lub po zawale mięśnia sercowego<sup>201,202</sup>, przy zanikach mięśniowych wywołanych odciążeniem, lub bezruchem<sup>203</sup>, a także ostrym przeciążeniem<sup>204</sup>. Powysiłkowy stres oksydacyjny może także wyzwaląć niepożądaną apoptozę w narządach bezpośrednio niezaangażowanych w pracę, np. w nerkach<sup>205</sup>. W warunkach fizjologicznych apoptoza jest warunkiem prawidłowego funkcjonowania ustroju, gdyż umożliwia zachowanie równowagi między starzejącymi się, lub patologicznie zmienionymi komórkami, a proliferacją nowych<sup>206</sup>. Zahamowanie apoptozy zmutowanych komórek jest hipotetycznym czynnikiem rozwoju nowotworów. Apoptoza odgrywa także pozytywną rolę w adaptacji narządów do zmienionych warunków czynnościowych: umożliwia przebudowę przeciążonego i niedokrwionego serca, zapewniającą jego dłuższe funkcjonowanie w krytycznych warunkach, a także jest czynnikiem przebudowy mięśnia szkieletowego podczas treningu fizycznego. Kluczowa rola ROS w procesach apoptozy wskazuje, że są one nieodzownym składnikiem homeostazy. Doświadczenia *in vitro* wskazują, że ROS mogą inicjować cykl komórkowy, lub aktywować jego promotory, stymulować ekspresję protoonkogenów, takich jak: c-fos, c-myc, H-ras, mogą też bezpośrednio uszkadzać DNA<sup>63,207</sup>. Badania kliniczne ujawniły zwiększenie markerów stresu oksydacyjnego, m.in.: metabolitów oksydacyjnego uszkodzenia DNA<sup>208</sup>, produktów utleniania lipidów<sup>209</sup> i prostaglandyn<sup>210</sup>, metalotioneiny<sup>211</sup>, obniżenie ilości grup tiolowych w białkach<sup>212</sup> u pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową. Stąd też ROS są uznawane za podstawowy czynnik rozwoju nowotworów.

Problemem z pogranicza zdrowia i choroby jest starzenie, w którym ROS odgrywają istotną rolę. Zgodnie ze współczesną definicją Harmana<sup>213</sup>, starzenie jest procesem, którego istotą jest stopniowa kumulacja różnorodnych niekorzystnych zmian zachodzących w komórkach i tkankach wraz wiekiem, powodującym zwiększenie ryzyka choroby i śmierci. Wyrazem starzenia jest postępujący spadek wydolności większości narządów, którego kulminacją jest niezdolność ustroju do sprostania wymaganiom środowiska zewnętrznego, co zgodnie z II zasadą termodynamiki jest warunkiem *sine qua non* niezależnego istnienia. Aktualnie obowiązują dwie, wzajemnie zalegające się teorie starzenia. Według koncepcji genetycznej, starzenie jest procesem, w którym dochodzi do stopniowego narastania zaburzeń czynnościowych w ustroju, zgodnie z zaprogramowaną sekwencją, która jest zakodowana genetycznie. Zgodnie z ogólnie akceptowaną teorią

wolnorodnikową, sformułowaną w 1956 roku przez Harmana<sup>68</sup> i ostatnio przemianowaną na teorię oksydacyjną (z uwagi na fakt, że nie wszystkie oksydanty są rodnikami), starzenie jest pochodną akumulacji w organizmie cząsteczek uszkodzonych przez ROS. Istotnym argumentem przemawiającym za udziałem ROS było ujawnienie, że z wiekiem wzrasta stężenie tkankowe i osoczowe produktów utleniania lipidów, kwasów nukleinowych, białek, cukrów i steroidów<sup>214</sup>. Hipotezę, która łączy klasyczną teorię Harmana z koncepcją genetyczną jest punkt widzenia zaproponowany w latach 1998-2000 przez Dukana i Nyströma<sup>215,216</sup>, którzy zaobserwowali, że postępujące z wiekiem oksydacyjne uszkodzenia białek, zależą w większym stopniu od ich zwiększonej podatności na utlenianie przez ROS niż od zaburzenia równowagi między endogennymi oksydantami i mechanizmami obrony antyoksydacyjnej. Z kolei zwiększona podatność białek na uszkodzenia wolnorodnikowe jest pochodną nieprecyzyjnego odwzorowania pierwotnie zakodowanego przekazu genetycznego. W wyniku błędów podczas transkrypcji i translacji, a także wskutek mutacji genowych dochodzi do syntezy i akumulacji zmodyfikowanych białek, których konformacja sprzyja ich utlenianiu. Szczególny udział w indukowaniu starzenia przypisuje się mitochondriom, które nie tylko wytwarzają zdecydowaną większość ROS w ustroju, ale także ulegają wolnorodnikowej destrukcji. Uszkodzenia oksydacyjne, w tym mutacje mitochondrialnego DNA (mtDNA), zachodzą znacznie częściej niż DNA chromosomalnego<sup>217</sup>. Linnane wraz ze współpracownikami z zespołu badawczego Tanaki zaproponował koncepcję, w myśl której wzrastająca z wiekiem liczba mutacji w genomie mitochondrialnym jest zasadniczą przyczyną chorób związanych ze starzeniem<sup>217</sup>. Stopniowa kumulacja punktowych mutacji w genomie mitochondriów, powoduje, że po przekroczeniu pewnego progu krytycznego, dochodzi do nieodwracalnego przesterowania metabolizmu komórki, czego efektem jest akumulacja licznych nieprawidłowych i utlenionych białek i indukcja apoptozy<sup>218,219</sup>. W zespołach chorobowych związanych z przedwczesnym starzeniem wykazano zwiększoną destrukcję DNA, w tym mtDNA oraz upośledzenie wewnątrzkomórkowych mechanizmów regenerujących uszkodzone białka i DNA<sup>220,221</sup>.

ROS są postrzegane jako kluczowy czynnik zaburzeń czynnościowych i strukturalnych wywołanych niedokrwieniem narządów. Uszkodzenia ischemiczne dotyczą przede wszystkim serca i mózgu, ale występują również w innych narządach, np. w nerce, jelitach, kończynach, siatkówce oka, w których samoistnie, lub w następstwie urazu, zatrucia, lub zabiegu chirurgicznego, dopływ utlenowanej krwi do narządu ustaje, lub jest upośledzony w stopniu niewystarczającym do zaspokojenia jego potrzeb metabolicznych. Podczas niedokrwienia przemiany metaboliczne zostają w znacznej mierze przekierowane na tory beztlenowe, a wytwarzanie i zasoby ATP ulegają dramatycznej redukcji. Po nagłym przywróceniu prawidłowego ukrwienia narządu (reperfuzja) dochodzi zwykle do zwiększonej generacji rodników tlenowych, co przyczynia się do dalszej destrukcji. Podstawową przyczyną wystąpienia oksydacyjnych zaburzeń w trakcie reperfuzy są wewnątrzkomórkowe zmiany zachodzące podczas ischemii<sup>222,223</sup>. Przywrócenie podaży tlenu do mitochondriów, w których kluczowe składniki łańcucha oddechowego są niemal całkowicie zredukowane, jest wzorcowym podłożem do niepełnej redukcji tlenu i generowania w nadmiarze jego reaktywnych postaci. Ponadto, podczas ischemii dochodzi do proteolitycznego przekształcenia dehydrogenazy ksantynowej w oksydazę ksantynową, która generuje anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, szczególnie w naczyniach krwionośnych. Wzmoczony katabolizm ATP zapewnia podczas ischemii zwiększoną dostępność substratu dla reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową<sup>224,225</sup>. Udział ROS w zaburzeniach czynności serca wywołanych jego niedokrwieniem był postulowany już w latach 70-tych ubiegłego stulecia<sup>226</sup>, ale uznana koncepcję o

kluczowej roli rodników tlenowych w niedokrwieniu serca sformułował McCord w 1985 roku<sup>102</sup>. Rok wcześniej Peterson<sup>227</sup> zaliczył ROS do czynników etiologicznych zastoinowej niewydolności krążenia, co potwierdził w 2000 roku Ide i wsp., dokonując bezpośrednich pomiarów zwiększonej generacji rodnika hydroksylowego w niewydolnym sercu<sup>228</sup>. Niedawno wykazano, że do zwiększonej generacji wolnych rodników tlenowych dochodzi podczas zawału mięśnia sercowego<sup>229,230</sup> oraz w rozwoju kardiomiopatii<sup>231,232</sup>. Badania ostatniej dekady wskazują na udział ROS w zaburzeniach rytmu serca<sup>233,234</sup> i na znaczenie śródoperacyjnego stresu oksydacyjnego w rekonwalescencji po zabiegach kardiochirurgicznych<sup>235,236</sup>. Reakcje wolnorodnikowe wydają się odgrywać kluczową rolę w zabiegach transplantacji serca<sup>237,238</sup>.

## 1.8. ROS jako niezbędny element życia

Różnokierunkowe zagrożenia ze strony ROS są oczywiste. Praktycznie każdy rodzaj cząsteczki organicznej, narząd, tkanka, komórka, lub jej fragmenty stoją przed wyzwaniem ataku wolnorodnikowego. Jednakże jak zauważył R.J. Williams<sup>239</sup> w 1985 roku: "Gdyby rodniki były aż tak niebezpieczne, to z pewnością w procesie ewolucji udałoby się ich unikać. W rzeczywistości są one wykorzystywane przez komórki i są w biologii potrzebne i pożądane."

Tab. 3 Niezbędne dla życia procesy ustrojowe, w których zaangażowane są ROS.

*Tab 3 Vital processes inevitable for life in which ROS are involved*

1. Synteza niezbędnych czynników endogennych
2. Reakcje kataboliczne, w tym w przemiany metaboliczne ksenobiotyków.
3. Zapłodnienie i rozmnażanie
4. Protekcja przed inwazją patogenów i ich eliminacja
5. Przekazywanie sygnałów metabolicznych
6. Regulacja przemian energetycznych, w tym dostępności substratów energetycznych i tlenu
7. Regulacja czynnościowa na poziomie subkomórkowym, komórkowym, tkankowym i ogólnoustrojowym.
8. Zjawiska przerostu, proliferacji oraz apoptozy.

W tab. 3 zestawiono niezbędne dla przeżycia kierunki działań ROS w układach biologicznych. Substratami reakcji prowadzącej do biosyntezy hormonu tarczycy - tyroksyny są: tyronina, aniony jodkowe i nadtlenek wodoru. Koniecznym elementem powstawania prostaglandyn, troboksanu i leukotrienów są nadtlenki lipidów, powstające jako produkty pośrednie syntezy prostanoidów<sup>63</sup>. Nadtlenek wodoru i nadtlenki lipidów modulują aktywność cyklooksygenaz, decydujących o tworzeniu prostaglandyn PGG<sub>2</sub> i

PGH<sub>2</sub> i o wzajemnych proporcjach między nimi<sup>240</sup>. Rodniki tlenowe ułatwiają agregację i adhezję płytek krwi do ściany naczyniowej, zaś anionorodnik ponadtlenkowy przyczynia się do karboksylacji białek w obecności witaminy K, warunkując syntezę protrombiny<sup>241</sup>. Z kolei anionorodnik ponadtlenkowy powstaje w reakcji zredukowanej formy witaminy K z tlenem cząsteczkowym<sup>242</sup>. ROS ingerują w procesy związane z zapłodnieniem. Ich nadmiar powoduje inaktywację plemników, co próbuje się wykorzystać jako nową metodę antykoncepcji<sup>243</sup>. Plemniki ssaków muszą być zaktywowane, aby uzyskać zdolność do zapłodnienia. Jedną ze składowych tego procesu, określanego mianem kapacytacji, jest wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego przez błonową oksydazę NADPH<sup>244</sup>. Powstawanie rodnika tyrozynowego ma kluczowe znaczenie w reakcjach utleniania z udziałem reduktazy rybonukleotydowej oraz w procesach sieciowania reszt tyrozynowych, które zachodzą przy zapłodnieniu i podczas tworzenia błon biologicznych<sup>245</sup>.

Zabezpieczenie integralności organizmu wiąże się z jego zdolnością do obrony przed inwazją patogenów. Cytotoksyczne właściwości makrofagów są uzależnione od tworzenia i uwalniania ROS, takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, tlen singletowy, anion podchlorynowy oraz RNS, m.in. nadtlendioazotynu<sup>246-248</sup>. Niezwykle szerokim zagadnieniem jest metabolizm kseniobiotyków, gdzie w części tych przemian indukowane są zjawiska wolnorodnikowe<sup>249</sup>.

## 1.9. ROS w komórkowych mechanizmach regulacyjnych

Istnieją liczne przesłanki wskazujące, że ROS pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych<sup>63</sup>, które decydują o przemianach metabolicznych komórki, jej różnicowaniu i dojrzewaniu, adaptacji komórki do zmian środowiska zewnętrznego, a także przeżyciu. Umiarkowana reaktywność anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru w porównaniu do innych rodników tlenowych, takich jak np. rodnik wodorotlenowy oraz pewna, choć ograniczona specyficzność ich działania sprawia, że obu ROS przypisuje się zasadniczą rolę w sygnałowaniu wewnątrz- i międzykomórkowym. Przez wpływ na właściwości fizykochemiczne błon komórkowych ROS wpływają na dyfuzję i transport przezbłonowy oraz na aktywację szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Intrygującym zjawiskiem jest zachodząca przy udziale ROS zmiana konformacji przestrzennej receptorów błonowych, gdyż zjawisko to w praktyce oznacza, że receptor może pełnić nie tylko funkcję sensora w stosunku do swojego liganda, ale także może pełnić dodatkowo funkcję czujnika wewnątrzkomórkowej równowagi redoks. W takim układzie odpowiedź komórkowa inicjowana przez pobudzenie określonej puli receptorów błonowych ma charakter zintegrowany, zależny od obecności liganda i od chwilowego statusu metabolicznego komórki<sup>250</sup>. Wiele ligandów, np. angiotensyna II, uruchamia reakcje generujące ROS w komórce<sup>251</sup>. Przyczynia się to do utleniania wewnątrzkomórkowych przekaźników, np. grup SH kinaz białkowych, jak również do zwiększonej fosforylacji reszt tyrozynowych białek. Taki profil działania sprzyja ograniczeniu odpowiedzi wywołanej pobudzeniem danych receptorów. Fosforylacja reszt tyrozynowych kinaz adhezyjnych FAK umożliwia migrację i proliferację komórek, zabezpiecza komórki przed apoptozą i zmniejsza prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej<sup>252</sup>. Pod wpływem ROS znajdują się również szlaki sygnałowania zależne od stężenia cyklicznych nukleotydów, fosfolipaz, fosfatydyloinozytolu. ROS są nieodzownym czynnikiem transdukcji sygnałów, pełniąc funkcję wtórnych przekaźników wielu białek<sup>63</sup>, w tym białek z rodziny Ras aktywowanych przez GTP<sup>253</sup>, kinaz regulujących apoptozę

(ASK1)<sup>254</sup>, kinazy białkowej p38 aktywowanej przez mitogeny (MAPK)<sup>255</sup>. Ponadto szlaki sygnałowania, w których uczestniczą kinazy aktywowane przez stres (JNK/SAPK) i przez mitogeny (MAPK), czynniki transkrypcyjne AP1 i NF-κB są szczególnie wrażliwe na regulację oksydacyjną, podobnie jak szlaki przekazywania indukcji biosyntezy TNF-α i interleukin, m.in: IL-1β<sup>250</sup>. Efekty pobudzenia czynników transkrypcyjnych, będących jądrowymi receptorami hormonów i regulujących przemiany lipidów i glukozy są kontrolowane przez ROS<sup>256</sup>. Istnieje coraz więcej dowodów, że ROS są kluczowym elementem wewnątrzkomórkowego sygnałowania w relacjach mitochondrium - jądro komórkowe oraz mitochondrium - cytoplazma<sup>257,258</sup>, którego transdukcja przekłada się na rozrost komórki, jej proliferację, indukcję apoptozy, a także trwałą zmianę przemian bioenergetycznych. Wewnątrzkomórkowa równowaga redoks ma zasadniczy wpływ na aktywność kinaz białkowych A i C, które zawierają liczne grupy SH. Przy względnej przewadze antyoksydantów kinaza białkowa C jest nieaktywna, natomiast oksydanty powodują jej aktywację, co promuje wzrost komórki i ułatwia transformację nowotworową<sup>259,260</sup>. Aktywność obu kinaz decyduje o różnicowaniu komórek<sup>261</sup>. Stała obecność ROS warunkuje prawidłowy przebieg wielu procesów życiowych. Uważa się, że istnieje minimalny poziom ROS i RNS warunkujący przeżycie makrofagów i monocytów<sup>262</sup>.

ROS tworzą kaskadowe układy sprzężeń zwrotnych umożliwiających dostosowanie przemian metabolicznych do chwilowych potrzeb i do chwilowych możliwości czynnościowych komórki. Szczególnym przykładem funkcji regulacyjnej ROS jest ich wpływ na białka kontrolujące stężenie jonów Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie. W warunkach stresu oksydacyjnego niezwykle łatwo dochodzi do utleniania metioniny w białkach pełniących funkcję lokalnych sensorów wapniowych, co ogranicza przemiany energetyczne w komórce i pośrednio wytwarzanie ROS<sup>263</sup>. Białkiem o krytycznym znaczeniu dla dostępności jonów Ca<sup>2+</sup> jest kalmodulina (CaM), która zawiera liczne domeny metioninowe wyeksponowane na działanie oksydantów. Utleniona postać kalmoduliny, nie tylko nie aktywuje białek docelowych, ale pełni w stosunku do nich funkcję ochronną, utrzymując je w stanie nieaktywnym i w ten sposób przyczynia się do zmniejszenia aktywności komórki. W warunkach nagłej destabilizacji czynnościowej komórki, np. podczas zapalenia, lub ischemii, przytłumienie aktywności metabolicznej komórki może ograniczać jej uszkodzenia. ROS biorą udział w subtelnej regulacji dostępności jonów żelaza, które z jednej strony są niezbędne w procesach transportu tlenu, transferu elektronów w łańcuchu oddechowym, syntezy DNA i proliferacji komórki, z drugiej zaś katalizują powstawanie niezwykle reaktywnego i destruktywnego rodnika wodotlenowego. Nadtlenek wodoru i nadtlenki lipidów powodują uwalnianie jonów żelaza z ferrytyny i mogą zaburzać ekspresję ferrytyny. Udowodniono ponadto, że aktywacja kinaz białkowych aktywowanych stresem prowadzi do degradacji ferrytyny i uwolnienia zmagazynowanego żelaza. Nadtlenek wodoru i nadtlenki lipidów mogą zaburzać ekspresję ferrytyny. Wiadomo, że aktywacja kinaz białkowych aktywowanych stresem prowadzi do degradacji ferrytyny i uwolnienia zmagazynowanego żelaza, co otwiera drogę do wytwarzania rodnika wodotlenowego w przebiegu reakcji Fentona<sup>264,265</sup>.

Zwiększenie tempa przemian energetycznych, np. w komórkach mięśni szkieletowych podczas wysiłku, kardiomiocytach lewej komory serca przy zwiększeniu obciążenia następczego, w wątrobie pod wpływem zwiększonej podaży substratów metabolicznych, wiąże się ze wzrostem zużycia tlenu i nasileniem wytwarzania ROS, co z kolei stwarza warunki do wystąpienia stresu oksydacyjnego i zaburzenia czynności i struktury komórki. Zjawiskom destrukcji przeciwdziałają mechanizmy regulacyjne działające na różnych poziomach. W mitochondriach opisano mechanizmy sprzężeń zwrotnych, w

których uczestniczą ROS. Wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego przy udziale oksydazy cytochromu c (COX) jest limitowane przez allosteryczne zmniejszenie jej aktywności przez ROS<sup>266</sup>. Ludwig i wsp.<sup>266</sup> zaproponowali schemat regulacyjny w oparciu o oryginalną koncepcję Skulacheva<sup>267</sup>, w którym defosforylacja, a następnie aktywacja COX przyczyniają się do zwiększenia siły protonomotorycznej ( $\Delta p$ ) i przyspieszenia syntezy ATP kosztem rozkojarzenia fosforylacji oksydacyjnej i zmniejszenia jej wydajności. Zwiększona w tych warunkach generacja anionorodnika ponadtlenkowego powoduje z kolei zahamowanie aktywności COX wskutek peroksydacji fosfolipidu kardiolipiny i wywołanym przez to zakotwiczeniem i częściowym unieruchomieniem COX w błonie mitochondrialnej<sup>268</sup>.

W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do tworzenia wodoronadtlenków wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, uwodorowanych kwasów tłuszczowych i rodników lipidowych, które aktywują białka rozprzegające mitochondria z grupy UCP. Ostatnio szczególne znaczenie regulacyjne przypisuje się aktywacji białka UCP2, które nieznacznie, o zaledwie kilka mV obniża siłę protonomotoryczną ( $\Delta p$ ), co prowadzi do nieznacznego rozkojarzenia mitochondriów<sup>269</sup>. To zaś w znaczącym stopniu ogranicza generację anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru<sup>270,271</sup>. Należy podkreślić, że mechanizmy regulacji zwrotnej wytwarzania ROS mają kapitalne znaczenie jako mechanizm zabezpieczający tkankę lub narząd przed poważnym i często nieodwracalnym uszkodzeniem. Narastający stres oksydacyjny generowany w trakcie przeciążenia mięśnia szkieletowego pracą może doprowadzić do zerwania, bądź też może przyczynić się do jego częściowego zaniku w wyniku indukcji nadmiernej apoptozy. Stąd też ograniczenie wytwarzania ROS kosztem przytłumienia przemian energetycznych może, co prawda, zmniejszać chwilowo wydolność mięśnia, ale zwiększa szansę na jego przetrwanie w stanie morfologicznie niezmiennym. W przeciążonym, lub niedokrwionym sercu wolnorodnikowe sprzężenia zwrotne mogą spowalniać jego przebudowę, do której dochodzi w wyniku uruchomienia ognisk apoptozy i zastępowaniu kardiomiocytów przez mioocyty o nieprawidłowej orientacji przestrzennej i przez tkankę łączną.

Już w latach dwudziestych ubiegłego wieku Gurwitsch wykrył istnienie słabej luminescencji komórek, które miało stymulować podziały innych komórek<sup>272</sup>. Ponad pół wieku później wykazano, że chemiluminescencja obserwowana przez Gurwitscha pochodzi z rozpadu wzbudzonych cząsteczek, które powstają w przebiegu komórkowych reakcji utleniania, a Cadenas i Sies udowodnili<sup>273</sup>, że wywołany przez rodniki tlenowe rozkład wodoronadtlenków lipidów powoduje powstawanie wzbudzonych cząstek, w tym tlenu singletowego i rodników przy grupach karbonylowych białek, wykazujących zdolność do emisji światła. Według ogłoszonej w 1983 roku przez Nagla i Poppa koncepcji koherencji komórkowej<sup>274</sup>, która wciąż wymaga udowodnienia, zanotowana przez Gurwitscha emisja światła jest przejawem sygnałowania międzykomórkowego wywołanego bezpośrednio przez ROS. Znaczenie wzbudzonych energetycznie cząstek w komunikacji międzykomórkowej jest przedmiotem licznych badań<sup>275,276</sup>.

## 1.10. Znaczenie ROS w ogólnoustrojowych mechanizmach regulacyjnych

Z licznymi doniesieniami i koncepcjami odnoszącymi się do udziału ROS w przemianach komórkowych, subkomórkowych i molekularnych, kontrastują fragmentaryczne dane i ogólnie uboga wiedza o ich roli w skali regulacji ogólnoustrojowej.

ROS tworzą niezwykle złożony układ powiązań czynnościowych decydujących o przepływie krwi w naczyniach krwionośnych i o dostępności przenoszonych z krwią substratów energetycznych. Poszczególne mechanizmy wolnorodnikowe dostosowują lokalne krążenie krwi do zmieniających się potrzeb w warunkach zdrowia i choroby oraz przy zakłóceniach środowiska zewnętrznego organizmu. ROS generowane w śródbłonku naczyniowym uczestniczą w zjawisku autoregulacji krążenia, powodując, w zależności od warunków, zarówno skurcz<sup>277-279</sup>, jak i rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń<sup>280,281</sup>. Działając w mięśniówce naczyniowej ROS mogą bezpośrednio indukować zarówno obkurczenie<sup>282,283</sup>, jak i rozluźnienie<sup>284</sup> ściany naczynia, a ROS generowane w przydatce modulują napięcie mięśniówki gładkiej<sup>285,286</sup>. Szczególne znaczenie ma udział ROS w przebudowie naczyń, a w zwłaszcza w inicjowaniu przerostu i proliferacji komórek ściany naczyniowej, w odpowiedzi na zwiększone obciążenie ciśnieniowe i na zmianę profilu substratów metabolicznych<sup>282</sup>. W warunkach fizjologicznych, a także zaburzeniach metabolicznych i podczas odpowiedzi ustroju na infiltrację patogenów, ROS i utlenione produkty ich przemian wywierają istotny wpływ na przepuszczalność ściany naczyniowej i przez to na biodystrybucję czynników krwiopochodnych<sup>287-289</sup>.

Reakcje wolnorodnikowe są zaangażowane w zachowanie komfortu cieplnego organizmu i w ogólnoustrojową termoregulację. Nagłe ochłodzenie powierzchni wywołuje odpowiedź miogenną ograniczającą przepływ krwi przez oziębioną skórę. W wyniku zwiększonej generacji nadtlenu wodoru, przez mitochondria w miocytach ściany naczyń, dochodzi do obkurczenia tętniczek skórnych<sup>290</sup>. W adaptacji ssaków do niskiej temperatury istotną rolę odgrywają mitochondria tkanki tłuszczowej i mięśni, które są podstawowym czynnikiem produkcji ciepła w zjawiskach termogenezy bezdrzewiowej. Pod wpływem bodźca termicznego wzmacnia się intensywność utleniania kwasów tłuszczowych w przebiegu  $\beta$ -oksydacji, co przyczynia się do częściowego rozkojarzenia oddechowego mitochondriów<sup>291</sup> i do wzmożonej generacji ROS, a zwłaszcza nadtlenu wodoru. Wzmocniona produkcja ROS przyczynia się do zwiększonej ekspresji białek rozprzegających oddychanie mitochondriów, przede wszystkim w tkance tłuszczowej - białko UPC1<sup>292,293</sup>, a także w mięśniach szkieletowych, gdzie główną rolę odgrywa białko UCP3<sup>294,295</sup>. Nawet niewielkie rozkojarzenie mitochondriów wiąże się ze zwiększonym wytwarzaniem ciepła<sup>63</sup>.

Jednym z najtrudniejszych problemów badawczych ostatnich lat jest udział ROS w mechanizmach chemodetekcji tlenu. Liczne publikacje, zaskakujące wzajemnymi sprzecznościami, wskazują na istotną, lub wręcz kluczową rolę anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego w wyzwaniu odruchu z chemoreceptorów tętnicznych, który obok odruchów z baroreceptorów tętnicznych i mechanoreceptorów serca i obszaru sercowo-płucnego w sposób zasadniczy współdecyduje o neurogennej regulacji krążenia. Zmiana prężności tlenu wywołuje w komórce wielokierunkowe zmiany: przepuszczalności błonowych kanałów jonowych, przemian energetycznych w mitochondriach, aktywności i syntezy enzymów oraz białek wiążących żelazo, ekspresji genów, a także generowania ROS<sup>296-298</sup>. Wymienione mechanizmy tworzą niezwykle złożony układ powiązań czynnościowych, w którym modyfikacja, np. w warunkach doświadczalnych, jednego z elementów przekłada się na zmianę właściwości pozostałych i całego układu. *In vivo*, w poszczególnych kompartmentach i organellach komórkowych prężność tlenu jest bardzo zróżnicowana. Przykładowo, w mitochondriach prężność tlenu jest przeciętnie o dwa rzędy wielkości mniejsza, niż w błonie cytoplazmatycznej i płynie pozakomórkowym. W praktyce doświadczalnej jest niezwykle trudno spełnić warunki fizjologicznej prężności tlenu we wszystkich elementach układu regulacyjnego komórki. Stąd też wyniki badań doświadczalnych nad zjawiskami chemo-

detekcji tlenu są jak dotąd niespójne i dalekie od sformułowania ostatecznych wniosków. Oprócz komórek neurosekrecyjnych typu I, zlokalizowanych w kłębkach szyjnych i aortalnych, których pobudzenie wyzwała odruch z chemoreceptorów tętnicznych, funkcję endogennych czujników tlenu o ogólnoustrojowym znaczeniu regulacyjnym pełnią komórki mięśniówki gładkiej krążenia płucnego, które reagują skurczem na hipoksję oraz komórki syntetyzujące erytropoetynę (EPO), zlokalizowane w nerce i w mniejszej ilości w wątrobie. Hipoksja powoduje przyspieszenie syntezy i wzmożone uwalnianie EPO do krwiobiegu, która pobudza powstawanie krwinek czerwonych w szpiku kostnym. Niemal wszystkie komórki organizmu reagują na hipoksję zwolnieniem przemian metabolicznych<sup>299</sup>, lecz wymienione wyżej komórki chemosensoryczne wykazują właściwości odmienne: w hipoksji pobór i zużycie tlenu wzrastają<sup>296</sup>.

Ze współczesnych opracowań pochodzących z różnych ośrodków naukowych wyłaniają się dwa punkty widzenia, wskazujące na udział ROS w zjawisku detekcji tlenu przez komórki o właściwościach chemosensorycznych. Część badaczy postuluje, że hipoksja przyczynia się do przytłumienia generowania ROS w komórkach typu I kłębków szyjnych i aortalnych oraz w miocytach krążenia płucnego. Inni wskazują, że wraz ze wzrostem zużycia tlenu przez te komórki, do czego dochodzi podczas hipoksji, wytwarzanie ROS wzrasta. W następstwie dochodzi do wzrostu stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i aktywacji kinazy C przez fosfolipazę C zależną od  $\text{Ca}^{2+}$  (PLC)<sup>300</sup>, co z kolei uruchamia komórkowe mechanizmy chemorecepcji. Najprawdopodobniej istnieje kilka bezpośrednich czujników tlenu w komórce - to jest struktur, które w odpowiedzi na tlen wyzwalają kaskadę reakcji prowadzącą do wywołania potencjału czynnościowego we włóknie eferentnym kłębka szyjnego, skurczu miocytów krążenia płucnego, sekrecji EPO w nerkach. Nadtlenek wodoru, który uczestniczy jako cząsteczka sygnałowa w chemodetekcji, powstaje przede wszystkim z anionorodnika ponadtlenkowego w reakcjach katalitycznych z udziałem SOD i oksydazy NADPH (Nox). Acker i współpracownicy<sup>301</sup> wysunęli koncepcję, że bezpośrednim czujnikiem tlenu w komórce jest Nox, która jest zlokalizowana w cytoplazmie w sąsiedztwie siateczki śródplazmatycznej. Wytwarzany przy udziale Nox nadtlenek wodoru przyczynia się do uwolnienia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  z retikulum sarkoplazmatycznego, co w dalszym efekcie toruje pobudzenie komórki<sup>302</sup>. Synteza nadtlenku wodoru zależy od podaży tlenu. Hipoksja powoduje zmniejszenie generacji  $\text{H}_2\text{O}_2$ , co według Ackera i wsp. wywołuje zamknięcie błonowych kanałów potasowych, depolaryzację komórki i powstanie potencjału czynnościowego. Hipotezie Ackera i wsp. przeciwstawiali się m.in. zespół Obeso i Gonzaleza<sup>303</sup>, którzy dowodzili w oparciu o doświadczenia wykonane na neutrofilach, że ROS wytwarzane przez Nox nie biorą udziału w detekcji tlenu. Okazało się jednak, że przyjęty przez obu badaczy model eksperymentalny nie odpowiada komórkom chemosensorycznym tlenu, które są wyposażone w odmienny układ izoform Nox. Izoformy Nox1 w komórkach mięśniówki gładkiej krążenia płucnego<sup>304</sup>, Nox2 i Nox 4 w komórkach neuroepitelialnych kłębków szyjnych generują znaczące ilości nadtlenku wodoru w warunkach normoksji<sup>305</sup>, co ułatwia otwarcie kanałów potasowych: bramkowanych napięciem ( $\text{K}_v$ ), zależnych od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{Ca}$ ) i kanałów tła typu TASK<sup>306</sup>. Hipoksja inaktywuje te kanały i zmniejszając wpływ jonów  $\text{K}^+$  z komórki, powoduje jej aktywację. Ostatnie badania wskazują, że w miocytach krążenia płucnego oraz w komórkach neuroepitelialnych kłębków szyjnych w warunkach normoksji, powinowactwo Nox do tlenu i jej wpływ na jego detekcję jest większe niż mitochondrialnej oksydazy cytochromu c (COX)<sup>298</sup>. COX wydaje się odgrywać kluczową rolę w rozpoznaniu hipoksji przez komórki neuroepitelialne. Istotne znaczenie dla detekcji tlenu mają wewnątrzkomórkowe czynniki chelatujące żelazo<sup>307</sup>. Zwiększenie dostępności żelaza w warunkach hipoksji, powoduje zwiększoną generację rodnika



wodorotlenowego w reakcji Fentona, co prowadzi do aktywacji komórki. Rodnik wodorotlenowy przyspiesza degradację hydroksylaz prolinowych i asparaginowych, które regulują czynniki transkrypcyjne indukowane przez hipoksję (HIF). Zwiększenie ekspresji tych czynników uruchamia długotrwałe przesterowanie przemian komórkowych, przez syntezę białek adaptacyjnych. Coraz więcej przesłanek wskazuje, że bezpośrednim sensorem tlenu może być tlenek azotu (NO), który poprzez hamowanie aktywności COX hamuje oddychanie komórkowe<sup>308</sup>. Wykazano, że myszy pozbawione NOS cechuje zwiększona wrażliwość na hipoksję<sup>309</sup>. Uwzględniając znaczny pobór tlenu przez komórki chemosensoryczne, wzrastający w hipoksji, wysoce prawdopodobne wydaje się powstawanie RNS w reakcji NO z rodnikami tlenowymi i ich udział w detekcji tlenu.

Odruchy z chemoreceptorów tętnicznych oraz aktywność neuronów ośrodkowych decydują o ośrodkowej regulacji krążenia za pośrednictwem układu autonomicznego. Przy wysokim tempie przemian tlenowych, w neuronach ośrodkowego układu nerwowego powstaje stosunkowo dużo ROS. Dostępność tlenu jest podstawowym czynnikiem regulującym pobudliwość neuronów mózgowych. Niektóre neurony ośrodkowe, wyposażone w kanały potasowe typu TASK w błonie komórkowej, są szczególnie wrażliwe na zmiany prężności tlenu<sup>310</sup>. Zdecydowana większość neuronów, których pobudliwość wzrasta w wyniku hiperoksji, ulega także aktywacji pod wpływem obniżenia pH i wzrostu prężności dwutlenku węgla<sup>311</sup>, przy czym ROS w sposób addycyjny zwiększają częstość powstających pobudzeń<sup>312</sup>. Nie trudno sobie zatem wyobrazić, że ROS generowane w mózgowych ośrodkach regulacyjnych mogą w sposób znaczący wpływać na regulację czynności serca i ciśnienia tętniczego. Dotychczas nie udało się stworzyć standardowych układów eksperymentalnych do oceny wpływu ROS na funkcje regulacyjne mózgu, a liczba publikacji poświęconych temu zagadnieniu jest stosunkowo niewielka. W tym kontekście przełomowe znaczenie ma praca Mulkey'a i wsp., którzy wykazali w wycinkach z rdzenia przedłużonego szczura, że troloks, który jest rozpuszczalnym w wodzie analogiem tokoferolu o uznanych właściwościach antyoksydacyjnych, w sposób odwracalny zablokował pobudzenie neuronów indukowane przez hiperoksję<sup>313</sup>.

### **1.11. Udział ROS w mechanizmach adaptacji organizmu do zmian środowiska zewnętrznego**

Środowisko zewnętrzne komórki i organizmu podlega częstym zmianom o nieradko znacznym natężeniu i dynamice. Zaburzenia czynnościowe i strukturalne wywołane przez nadmierne reakcje utleniania są podstawowym zagrożeniem dla żywego ustroju indukowanym przez czynniki zewnętrzne. Warunkiem przetrwania w niestabilnym otoczeniu jest wytworzenie i uruchamianie w razie potrzeby mechanizmów przystosowawczych, które pozwalają zachować integralność środowiska wewnętrznego. Badania ostatnich dwudziestu lat ujawniły, że zarówno *Procaryota*, jak i *Eukaryota*, wykształciły szereg mechanizmów aktywacji endogennych procesów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na stres oksydacyjny<sup>314</sup>. Skuteczność adaptacji zależy od zmiany ekspresji genów oraz modyfikacji transkrypcji i translacji, co ujawnia się już w ciągu minut od zadziałania czynnika szkodliwego<sup>314</sup>. Keyse i Tyrell wykazali, że indukcja oksygenazy hemu przez różne czynniki oksydacyjne, w tym przez łagodny stres oksydacyjny spowodowany peroksydacją lipidów, wyzwala silny efekt protekcyjny i zabezpiecza fibroblasty przed uszkodzeniami wywołanymi przez promieniowanie UV<sup>315</sup>. Doświadczenia przeprowadzone na szczurach poddanych działaniu promieniowania jonizującego ujawniły,

że po ekspozycji doszło do zwiększenia aktywności SOD w mózgu, z towarzyszącym spadkiem produktów peroksydacji lipidów<sup>316</sup>. Intensywny wysiłek fizyczny z jednej strony powoduje liczne uszkodzenia DNA i utlenianie białek i lipidów, z drugiej zaś pobudza mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, w tym wzrost aktywności SOD, katalazy, peroksydazy glutationu, a także indukuje przebudowę mięśnia i zwiększenie ekspresji jego białek kurczliwych. Można przyjąć, że uzyskanie korzystnego efektu treningu fizycznego wymaga wywołania pewnego stresu oksydacyjnego podczas wysiłku. Zasadniczym problemem współczesnej medycyny są skutki zaprzestania aktywności fizycznej i bezruchu, a także zmniejszenia obciążenia grawitacyjnego mięśni, co ma znaczenie w projektowaniu długotrwałych lotów w przestrzeni pozaziemskiej. Uważa się, że wyłączenie tonicznego wpływu stresu oksydacyjnego zależnego od obciążenia mięśnia, jest czynnikiem rozwoju dysfunkcji mięśni szkieletowych i ich zaniku. Dotychczasowe próby przeciwdziałania tym efektom, bez usunięcia bezpośredniej przyczyny, nie przyniosły jak dotąd satysfakcjonujących rezultatów. Zjawisko pobudzającego organizm, korzystnego działania małej ekspozycji, lub małych dawek czynnika, który w dawkach większych jest ewidentnie szkodliwy, zauważył już Hipokrates, a w czasach nowożytnych Paracelsus. Zostało ono nazwane w latach 40-tych ubiegłego stulecia hormezą, co w tłumaczeniu z greki oznacza "wprowadzić w ruch"<sup>317</sup>. Istnieją liczne przesłanki, że ROS są nieodzownym elementem hormezy. Rattan wykazał, że powtarzana ekspozycja na czynnik wywołujący łagodny stres oksydacyjny opóźnia starzenie, stymuluje proteasomy, co przyczynia się do przyspieszonego usuwania oksydacyjnie uszkodzonych białek komórkowych, zmniejsza wrażliwość izolowanych komórek na destrukcyjne działanie etanolu i nadtlenu wodoru oraz aktywuje enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne<sup>130</sup>. Analogicznie, powtarzane epizody krótkotrwałego niedokrwienia, znane jako "hartowanie przez niedokrwienie" (ischemic preconditioning) w znacznym stopniu ograniczają uszkodzenia serca, mózgu i narządów obwodowych wywołane przez późniejsze ich ciężkie niedokrwienie<sup>318</sup>, a nadtlenek wodoru i rodniki tlenowe uruchamiają komórkową odpowiedź adaptacyjną<sup>319,320</sup>.

## 1.12. Poszukiwania roli ROS w układzie krążenia

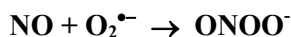
Pierwsze publikacje o efektach ROS w układzie krążenia przyniosły niejednoznaczny obraz. Zarejestrowano rozkurcz mięśniówki gładkiej aorty królika pod wpływem nadtlenu wodoru<sup>280</sup>, wiążąc to z uwalnianiem prostacykliny ze śródbłonna naczyniowego<sup>281</sup>, a także aktywację cyklazy guanylanowej pod wpływem rodnika hydroksylowego<sup>321</sup>. Z drugiej strony w różnych modelach eksperymentalnych obserwowano obkurczenie naczyń tętniczych<sup>322-324</sup>. Wykazano, że ROS wywołują uszkodzenie ściany naczyniowej<sup>322-325</sup>, a w zwłaszcza śródbłonna<sup>322-324,326</sup> oraz że przyczyniają się do rozwoju zastoinowej niewydolności krążenia<sup>227,322-324,326</sup>, jak też zaburzeń czynności serca wywołanych przez jego niedokrwienie i reperfuzję<sup>226,227,322-324,326</sup>. Opisano korzystny wpływ ROS na adaptację serca do hipoksji indukowanej przez kilkakrotne umieszczanie szczurów w środowisku hipobarycznym o obniżonym o ciśnieniu parcjalnemu tlenu<sup>327</sup>.

### 1.13. Postulowany udział ROS w rozwoju nadciśnienia tętniczego

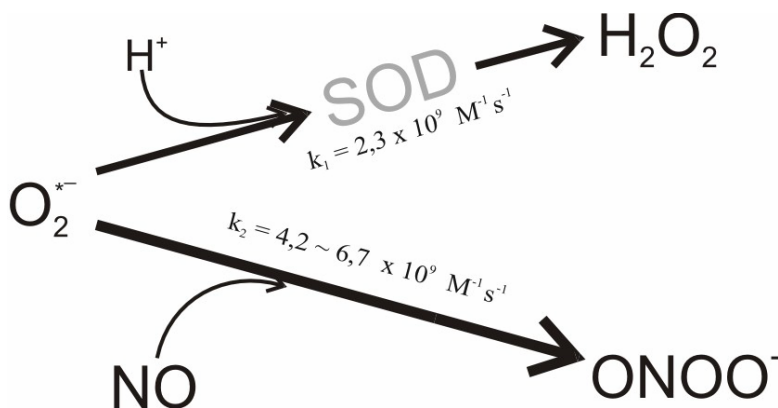
W 1991 roku Nakazono i wsp.<sup>328</sup>, opierając się na wcześniejszych doniesieniach z początku lat siedemdziesiątych ub. stulecia<sup>329,330</sup> ogłosili wolnorodnikową hipotezę rozwoju nadciśnienia tętniczego. Dalsze poszukiwania ujawniły, że anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ) uwalniany ze śródbłónka<sup>331</sup> i z przydanki<sup>332</sup> wywołuje obkurczenie mięśniówki gładkiej naczyń<sup>333</sup> oraz że wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  jest zwiększone u chorych z nadciśnieniem tętniczym samoistnym<sup>334</sup>, zaś nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) w populacji normotensyjnej o dodatnim wywiadzie rodzinnym w kierunku choroby nadciśnieniowej<sup>335</sup>. Udokumentowano w różnorodnych układach eksperymentalnych, że ROS odgrywają istotną rolę w rozwoju nadciśnienia tętniczego: indukowanego nadmiarem angiotensyny II<sup>336,337</sup>, niedoborem endogennego  $NO$ <sup>338</sup>, nadwrażliwością na  $NaCl$ <sup>339</sup> i nadmierną podażą  $NaCl$  u szczurów DOCA-salt z niską reninemią otrzymujących deoksykortykosteron<sup>340</sup> oraz że mogą także prowadzić do zwiększonej aktywności konwertazy angiotensyny (ACE) w śródbłónku naczyniowym<sup>338</sup>. W ramach poszukiwań podłoża genetycznego nadciśnienia tętniczego wykazano, że u szczurów SHR z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym występuje nadmierna ekspresja genu p22phox, z czym sprzężona jest zwiększona aktywność śródbłónkowej oksydazy  $NADH/NADPH$ , generującej wolne rodniki tlenowe<sup>341</sup>.

### 1.14. Nadciśnienie tętnicze jako konsekwencja zaburzenia równowagi czynnościowej między endogennymi oksydantami i mechanizmami obrony antyoksydacyjnej

W 1986 roku Gryglewski i wsp.<sup>342</sup> udowodnili, że główny czynnik endogeny o działaniu rozkurczającym mięśniówkę gładką naczyń – tlenek azotu ulega eliminacji w wyniku reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym.



Produktem tej bardzo dynamicznej reakcji jest nadtlenoazotyn, rodnik o znacznej aktywności oksydacyjnej, który może inicjować szereg dalszych przemian biochemicznych, prowadzących między innymi do wytworzenia znacznie bardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego. Spontaniczna reakcja  $NO$  z anionorodnikiem ponadtlenkowym zachodzi ponad dwukrotnie szybciej od dysmutacji  $O_2^{\bullet-}$  katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (CuZn-SOD; ryc. 1).



Ryc. 1. Podstawowe reakcje wymiatające anionorodnik ponadtlenkowy w naczyniach krwionośnych

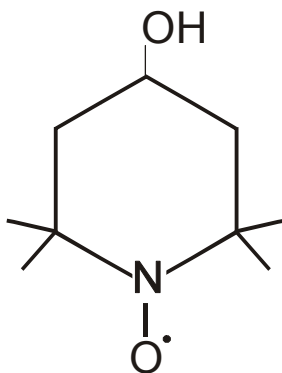
Fig. 1. Major pathways of scavenging superoxide anion in blood vessels

W powiązaniu z wcześniejszymi doniesieniami Weissa i wsp.<sup>343</sup> oraz Freemana i Crapo<sup>344</sup> o modulującym czynność śródbłonna tonicznym działaniu ROS, praca Gryglewskiego i wsp.<sup>342</sup> stanowiła punkt zwrotny w rozwoju nowej koncepcji, wedle której rozwój nadciśnienia tętniczego i zmian miażdżycowych jest wynikiem zaburzenia równowagi czynnościowej między endogennymi oksydantami i antyoksydantami.

### 1.15. Zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i nitroksylowych znaczników spinowych w eksperymentalnych modelach nadciśnienia tętniczego

W ostatniej dekadzie wykazano, że podawanie SOD, które w założeniach doświadczalnych miało prowadzić do wyeliminowania anionorodnika ponadtlenkowego, wywołuje efekt hipotensyjny u szczurów z nadciśnieniem tętniczym: genetycznie uwarunkowanym – SHR<sup>328</sup> oraz indukowanym 5-dniową infuzją angiotensyny II przy użyciu miniaturowej pompy osmotycznej<sup>345</sup>, zmniejszając częstość powikłań sercowo-naczyniowych i śmiertelność w jego przebiegu<sup>346</sup>. Efektu hipotensyjnego nie zaobserwowano u szczurów z nadciśnieniem tętniczym indukowanym noradrenaliną, które otrzymywały SOD zawieszoną w liposomach, co umożliwiło jej wnikanie do komórek<sup>345</sup>. Kardioprotekcyjne działanie SOD udokumentowano w modelach eksperymentalnych serca poddanego ischemii i reperfuzji, przejawiające się zmniejszeniem zaburzeń czynności skurczowej serca<sup>347</sup> i szybszym powrotem funkcji do stanu sprzed ischemii<sup>348</sup>. Nie wyjaśniono jak dotąd w sposób bezpośredni, czy opisywane efekty SOD w układzie krążenia zależą o przyspieszonej eliminacji anionorodnika ponadtlenkowego, czy też wynikają ze zwiększonej generacji NO. Istotną niedogodnością związaną z właściwościami fizykochemicznymi występujących w naturze enzymatycznych antyoksydantów jest ich ograniczona dostępność biologiczna. Stosunkowo znaczne rozmiary SOD, a także przewaga ładunków ujemnych w jej strukturze zewnętrznej, uniemożliwiają swobodną penetrację błon biologicznych.

Wprowadzenie do badań niskocząsteczkowych nitroksylowych znaczników spinowych o właściwościach katalitycznych, które wykazują aktywność SOD, rozszerzyło horyzonty badań. Często stosowanym piperydynowym związkiem nitroksylowym jest tempol (2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-N-tlenek; ryc. 2):

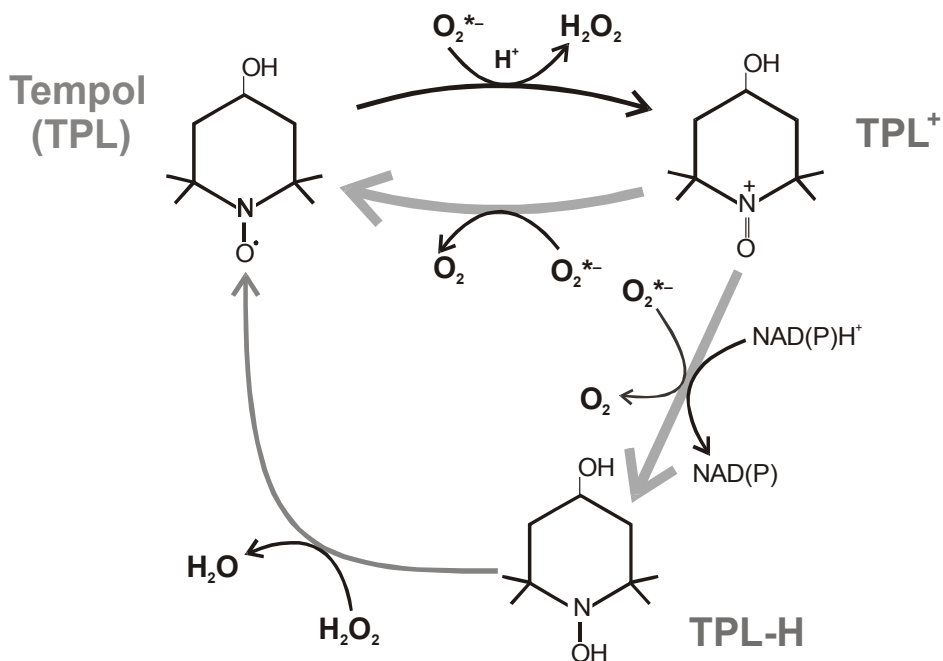


Ryc. 2. Struktura tempola  
Fig. 2. Tempol moiety

który wykazuje stosunkowo niewielką toksyczność, przy czym łatwo przenika do wnętrza komórek, gdzie jest rozmieszczony przede wszystkim w środowisku wodnym. Tempol przypomina sposobem działania dysmutazę ponadtlenkową<sup>349</sup>. Reagując z aniononrodnikiem ponadtlenkowym ( $O_2^{\bullet -}$ ) i z rodnikami zlokalizowanymi przy atomie węgla, prowadzi do eliminacji tych rodników, ulegając redukcji do hydroksylaminowej pochodnej (TPL-H). Reakcja zachodzi dwuetapowo (ryc.3). Katalizując dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego (ryc.3) tempol (TPL) ulega w sposób wahadłowy utlenieniu do formy przejściowej – kationu oksoamoniowego (TPL<sup>+</sup>), który z kolei reagując z następną cząsteczką  $O_2^{\bullet -}$ , zostaje zredukowany do pochodnej hydroksylaminowej (TPL-H). W obecności nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) TPL-H przekształca się z powrotem do cząsteczki macierzystej, co zachodzi szczególnie łatwo w obecności grup fenolowych<sup>350</sup>. Zachodzące na przemian reakcje utleniania i redukcji umożliwiają wielokrotne odtwarzanie cząsteczki tempola (ryc.3) oraz jego długotrwałe przetrwanie w środowisku biologicznym<sup>351</sup>.

Tempol wykazuje właściwości paramagnetyczne, stąd też do jego detekcji jest wykorzystywana metoda spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Należy zaznaczyć, że podstawowy produkt degradacji tempola – jego hydroksylaminowa pochodna (TPL-H), jest diamagnetykiem i nie jest wykrywalna przy użyciu tej metody. Publikacje odnoszące się do zaniku tempola w środowisku biologicznym dają obraz niejednoznaczny. Opisywano zarówno kilkuminutowy<sup>352</sup>, jak też trwający od 22 do 60 minut<sup>353-355</sup> okres jego połowicznego zaniku. Niedawno wykazano, że tempol podawany przez okres od 1 do 2 tygodni, wywołuje efekt hipotensyjny u szczurów z nadciśnieniem tętniczym<sup>356</sup>. Istotnym niedostatkim tej pracy jest brak weryfikacji występowania tempola we krwi lub tkankach w okresie dawkowania.

Badania eksperymentalne potwierdziły właściwości kardioprotekcyjne tempola podczas ischemii i reperfuzji<sup>357-359</sup>, analogicznie do SOD, a także jego działanie hipotensyjne, związane z redukcją markerów stresu oksydacyjnego.



Ryc. 3. Wolnorodnikowe przemiany tempola umożliwiające jego odtwarzanie  
 Fig. 3. Free radical tempol chemistry providing its recycling

W latach 1998-1999 został opublikowany cykl prac opisujących efekt hipotensyjny tempola zarejestrowany u szczurów i u świni miniaturowych z nadciśnieniem tętniczym, a także w mniejszym stopniu, u ich odpowiedników normotensyjnych<sup>356,360,361</sup>. Ponadto, wykazano, że tempol wywierał protekcyjny wpływ na czynność nerek, czego wyrazem był wzrost filtracji kłębkowej. Tempol zmniejszał wydalanie z moczem 8-izoprostaglandyny- $F_{2\alpha}$ , która powstaje w wyniku nieenzymatycznej reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z kwasem arachidonowym i jest uważana za jeden z wykładników stresu oksydacyjnego<sup>362</sup>. Podobnie jak w przypadku innych antyoksydantów, nie został poznany wpływ tempola na regulację czynności serca i ciśnienia tętniczego, realizującą się za pośrednictwem autonomicznego układu nerwowego.

## 1.16. Niepowodzenia praktycznego stosowania antyoksydantów

Liczne dane z badań doświadczalnych, poparte doświadczeniem klinicznym, nie-dwuznacznie wskazują na udział ROS w rozwoju nadciśnienia tętniczego i wielu innych chorób układu krążenia oraz na potencjalne korzyści ze stosowania antyoksydantów. w terapii i w profilaktyce chorób układu sercowo-naczyniowego. Optymistyczne wnioski z licznych badań doświadczalnych oceniających działanie antyoksydantów przyczyniły się do wdrożenia wielośrodkowych programów ukierunkowanych na obiektywną ocenę korzyści stosowania antyoksydantów w prewencji pierwotnej i wtórnej chorób sercowo-naczyniowych w oparciu o prospektywne, randomizowane próby kliniczne. Wyniki większości podjętych prób okazały się zaskakujące, podważając mozolnie budowaną koncepcję o jedynie korzystnym profilu działania antyoksydantów. Badanie *Iowa Women's Health Study*, opublikowane w 1996 roku ujawniło, że wśród 34387 kobiet po menopauzie systematycznie przyjmujących kwas askorbinowy (500 mg/dobę) lub/i  $\alpha$ -tokoferol (10000 jedn./dobę) nieznamiennie zwiększyło się ryzyko wystąpienia raka piersi<sup>363</sup>. W raporcie *Iowa Women's Health Study* opublikowanym w lipcu 2005 roku, nie wykazano istotnego wpływu tej witaminy na śmiertelność ogólną i na śmiertelność z powodu chorób nowotworowych w populacji 39876 kobiet w wieku powyżej 45 roku życia, które przyjmowały 600 jedn. witaminy E pochodzenia naturalnego<sup>364</sup>. Częstość występowania groźnych incydentów sercowo-naczyniowych odpowiadała częstości w grupie referencyjnej. Stwierdzono co prawda, zmniejszenie o 24% ( $P = 0,03$ ) śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych, ale we końcowych wnioskach z *Iowa Women's Health Study* autorzy podkreślają, że nie ma przekonujących dowodów do rekomendowania długotrwałego podania witaminy E w diecie u kobiet po menopauzie. W badaniu *CARET* obejmującym 18314 palaczy tytoniu i pracowników ekspozowanych na azbest, w którym testowano wpływ  $\beta$ -karotenu (30 mg/dobę) i retinolu (25000 jedn./dobę) na prewencję pierwotną chorób sercowo-naczyniowych, wykazano istotne zwiększenie ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i raka płuc w grupach przyjmujących antyoksydanty<sup>365</sup>. Z kolei, wśród 27271 zdrowych palaczy tytoniu w przedziale wiekowym 50-69 lat, uczestniczących w fińskim badaniu *ATBC* i przyjmujących witaminę E (50mg/dobę),  $\beta$ -karoten (20 mg/dobę), lub oba czynniki, przez średnio 6 lat, stwierdzono zmniejszenie o 4% częstości występowania pierwotnych incydentów wieńcowych i o 8 % śmiertelności z powodu niewydolności wieńcowej w grupie przyjmującej witaminę E, natomiast suplementacja  $\beta$ -karotenem nie miała istotnego znaczenia<sup>366</sup>. Z kolei w grupie 1862 palaczy tytoniu w tym samym przedziale wiekowym, z zawałem serca w wywiadzie wykazano, że przyjmowanie witaminy E i  $\beta$ -karotenu nie miało znaczenia w prewencji wtórnej ostrych incydentów wieńcowych, natomiast przyczyniało się do zwiększenia śmiertelności w następstwie nagłych incydentów sercowych<sup>367</sup>. Analogicznie, włoskie badanie *GISSI-P* z udziałem 11324 chorych po zawałe serca wskazywało na brak korzyści ze stosowania  $\alpha$ -tokoferolu w dawce 300 mg/dobę w prewencji wtórnej zawału serca i śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych<sup>368</sup>. W badaniu *CHAOS* prowadzonym na 2002 pacjentach z angiograficznie udokumentowaną chorobą wieńcową udokumentowano co prawda, istotne statystycznie zmniejszenie ryzyka zawału serca podczas przewlekłego (średnio 510 dni) stosowania  $\alpha$ -tokoferolu (800 jedn./dobę), ale jednocześnie wykazano nieznamienny wzrost ryzyka zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych w tej grupie<sup>369</sup>. Wnioski z kolejnych prób klinicznych: *HPS* (20356 pacjentów)<sup>370</sup> i *HOPE* (9541 pacjentów)<sup>371</sup> dotyczących wpływu antyoksydan-

tów na prewencję pierwotną i wtórną incydentów sercowo-naczyniowych wskazują na brak istotnego wpływu stosowania antyoksydantów na ryzyko wystąpienia choroby sercowo-naczyniowej, lub zgonu z powodu choroby sercowo-naczyniowej. Opublikowane w 2003 i 2004 roku trzy ogromne metaanalizy oparte o randomizowane wielośrodkowe próby kliniczne nie tylko nie rozwiały wątpliwości związanych ze stosowaniem antyoksydantów, ale jeszcze je pogłębiły. Z zestawienia opracowanego przez zespół badaczy z Uniwersytetu w Sydney, na podstawie wcześniej opublikowanych wyników 7 wielośrodkowych prób klinicznych, dotyczących wpływu flawonoidów zawartych w diecie na prewencję incydentów wieńcowych wynika, że wysokie spożycie flawonoidów jest związane ze zmniejszonym ryzykiem zgonu z powodu incydentu sercowo-naczyniowego<sup>372</sup>. Z kolei, w analizie statystycznej opracowanej z 2003 roku pod egidą zespołu z Cleveland (USA)<sup>373</sup> wykorzystano dane pochodzące z 7 randomizowanych prób klinicznych dotyczących suplementacji witaminą E stosowaną w dawce dobowej od 50 do 800 jedn. u 81788 pacjentów oraz z 8 prób klinicznych, których uczestnicy otrzymywali  $\beta$ -karoten w dawce dobowej od 15 do 50 mg. Czas suplementacji wybranymi antyoksydantami wynosił od 16 miesięcy do 12 lat. U pacjentów, którzy przyjmowali  $\beta$ -karoten stwierdzono nieznaczne, ale statystycznie istotne (o 0,4%;  $P = 0,003$ ) zwiększenie śmiertelności ogólnej i śmiertelności spowodowanej przyczynami sercowo-naczyniowymi (o 0,3%;  $P = 0,003$ ). Witamina E nie miała znamionnego wpływu na śmiertelność ogólną (wzrost o 0,2%;  $P = 0,42$ ), śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych ( $P = 0,86$ ) i z powodu udarów mózgu (wzrost o 0,1%;  $P = 0,31$ ). Brak wpływu podawania witaminy E i karotenoidów w prewencji incydentów wieńcowych oraz na ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych potwierdził raport opublikowanego przez grupę badaczy z Uniwersytetu w Helsinkach w grudniu 2004 roku<sup>374</sup>. Na metaanalizę składały dane uzyskane z 9 wielośrodkowych prób klinicznych, których celem była ocena skuteczności witamin C i E oraz karotenoidów w prewencji choroby wieńcowej i ryzyka incydentów wieńcowych. Przy dziesięcioletnim okresie obserwacji w badaniach wzięły udział 293172 osoby, które przewlekłe przyjmowały wybrane antyoksydanty. Zachęcające wyniki, istotne zmniejszenie częstości poważnych incydentów sercowych, uzyskano w grupie pacjentów, która systematycznie przyjmowała witaminę C, szczególnie w stosunkowo dużych dawkach dobowych, przekraczających 700 mg.

Dotychczasowe próby praktycznego zastosowania antyoksydantów w terapii i profilaktyce nie spełniły oczekiwań<sup>375</sup>. Rozbieżności między pożądanymi efektami antyoksydantów, opisywanymi w licznych pracach doświadczalnych i początkowych doniesieniach klinicznych, a zagrożeniami ujawnionymi przez badania epidemiologiczne przeprowadzone na dużych populacjach, w których przewlekłe stosowano wybrane antyoksydanty, wzbudzają nadal ogromne zakłopotanie środowiska naukowego i skłaniają do podejmowania nowych poszukiwań. Niepowodzenia suplementacji poszczególnymi antyoksydantami kontrastują w wnioskami z badań epidemiologicznych, w których wykazano ewidentne korzyści przy stosowaniu diety bogatej w warzywa i owoce i przez to zawierającej znaczący ładunek antyoksydantów.

Pokładane nadzieje z szerokiego zastosowania antyoksydantów zderzyły się z nadal niedostatecznie poznanymi mechanizmami ich działania i z niewystarczającą wiedzą o fizjologicznej roli ROS, w tym ich znaczeniu w przebiegu procesów regulacyjnych zachodzących zarówno w mikroskali subkomórkowej, jak też w wymiarze ogólnoustrojowym. W toku prób klinicznych w zasadzie pominięto ocenę mechanizmów regulacyjnych. Przeszkodą wznowienia szerokich badań klinicznych są względy etyczne. Stąd konieczność powrotu do badań eksperymentalnych z wykorzystaniem zwierząt.



## 2. CEL BADAŃ:

Moje wcześniejsze poszukiwania badawcze koncentrowały się na mechanizmach nadciśnienia tętniczego i na poszukiwaniu narzędzi farmakologicznych przydatnych w ocenie jego podłoża patogenetycznego i w dalszej perspektywie, w terapii. Badania eksperymentalne, które prowadziłem obejmowały ocenę efektów czynnościowych neuropeptydów – wazopresyny<sup>376,377</sup> i oksytocyny<sup>378,379</sup> oraz ich analogów strukturalnych, tlenku azotu<sup>380,381</sup>, prostaglandyn<sup>380</sup>, amin katecholowych<sup>380,382</sup>, bradykininy i jej pochodnych<sup>383</sup> oraz układu angiotensyny<sup>384,385</sup>. W ostatnim dwudziestolecu lawinowo wzrastała liczba publikacji wskazujących na udział czynników współistniejących, w tym w szczególności reaktywnych postaci tlenu (ROS), na charakterystykę czynnościową efektora i na przebieg rejestrowanych przeze mnie odpowiedzi układu krążenia<sup>105,106,251,386-391</sup>. Skłoniło mnie to do podjęcia badań eksperymentalnych ukierunkowanych na ocenę wpływu czynników o znanych, lub oczekiwanych właściwościach antyoksydacyjnych na wybrane mechanizmy regulacji ciśnienia tętniczego. W ramach prowadzonych badań testowałem aktywność biologiczną nowych analogów strukturalnych wazopresyny<sup>377,392,393</sup> i bradykininy<sup>383,394-399</sup>, a w projektowaniu tych związków zostały uwzględnione ich potencjalne właściwości antyoksydacyjne. Ponadto, zaplanowałem i zrealizowałem wieloetapowy program badań eksperymentalnych ukierunkowany na ocenę efektów czynnościowych drobnocząsteczkowego antyoksydanta nitroksylogowego, tempola (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrahydrametylpiperidyno-N-tlenek; 4-OH-tempo) w układzie sercowo-naczyniowym, o czym traktuje niniejsza praca.

Celem zrealizowanego programu badań była ocena wpływu częściowego wyeliminowania reaktywnych postaci tlenu, przy użyciu tempola – nitroksylogowego wymiatacza reaktywnych postaci tlenu o właściwościach dysmutazy ponadtlenkowej, na czynniki regulacji układu krążenia i wydolność fizyczną u szczurów z nadciśnieniem tętniczym.

Badania eksperymentalne obejmowały ocenę wpływu tempola na:

1. rozwój nadciśnienia tętniczego u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR) i nadciśnieniem tętniczym zależnym od niedoboru endogennego tlenku (NO) wywołanego zahamowaniem endogennej syntazy NO,
2. czynność serca izolowanego, a więc pozbawionego pozasercowych wpływów regulacyjnych,
3. napięcie mięśniówki gładkiej małych i średnich naczyń tętniczych reprezentowanych przez izolowany układ naczyń tętniczych krezki,
4. ocenę rozprzestrzeniania się fali tętna w dużych naczyniach tętniczych,
5. autonomiczną regulację rytmu serca, badaną przy użyciu analizy zmienności rytmu serca (HRV),
6. odruchową regulację układu krążenia zachodzącą przy udziale baroreceptorów i chemoreceptorów tętniczych,
7. profil przemian energetycznych w sercu i mięśniach szkieletowych,
8. wydolność fizyczną i adaptację do wysiłku fizycznego.

### 3. MATERIAŁY I METODY

Badania eksperymentalne zostały przeprowadzone na szczurach z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym genetycznie (SHR) oraz na referencyjnym szczepie szczurów normotensyjnych WKY. U części szczurów WKY zostało zaindukowane nadciśnienie tętnicze wskutek zahamowania endogennego wytwarzania tlenu azotu (NO) przez podawanie inhibitora syntazy NO, L-nitroargininy (L-NNA). Powstała w ten sposób grupa szczurów WKY została nazwana mianem LNR.

Zaprojektowałem i zrealizowałem program doświadczeń ukierunkowany na kompleksową, porównawczą ocenę wpływu tempola na regulację krążenia w dwóch modelach nadciśnienia tętniczego, reprezentowanych przez szczury SHR i LNR. Poszczególne procedury badawcze były ukierunkowane na ocenę:

- ciśnienia tętniczego i rytmu serca *in vivo* w warunkach zbliżonych do spoczynkowych,
- czynności izolowanego serca odciętego od wpływów regulacyjnych,
- napięcia mięśniówki gładkiej izolowanego układu naczyń tętniczych, zawierającego tętniczki typu oporowego,
- podatności dużych pni tętniczych,
- wybranych mechanizmów regulacji ciśnienia tętniczego i rytmu serca,
- wydolności fizycznej typu wytrzymałościowego i adaptacji do treningu,
- biodystrybucję i kinetykę zaniku tempola, zmiatacza rodników tlenowych, wykorzystywanego jako podstawowe narzędzie badawcze,
- funkcję oddechową mitochondriów wyizolowanych z serca i reprezentatywnego mięśnia szkieletowego.

Część układów i procedur eksperymentalnych zaprojektowanych oryginalnie do realizacji szczegółowych zadań badawczych tej pracy, jednakże większość wykorzystanych w niniejszej pracy metod i technik doświadczalnych została przeze mnie opracowana i wdrożona we wcześniejszych badaniach, których wyniki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z Listy Filadelfijskiej<sup>380,392,394-398,400-402</sup>.

Zastosowaną w niniejszej pracy technikę chirurgicznej wyprowadzania linii naczyńowych w sposób umożliwiający monitoring układu krążenia u szczurów z nadciśnieniem tętniczym, w warunkach bez narkozy, oparłem na badaniach opublikowanych w roku 1992 z moim udziałem w: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* (IF = 2,023 wg danych z roku 2005)<sup>400</sup>, *Hypertension* (IF = 6,331)<sup>380</sup> i *Collection of Czech Chemical Communications* (IF = 0,949) w roku 1997<sup>397</sup>. Technikę rejestracji ciśnienia tętniczego u zwierząt z zachowaną swobodą ruchu i z utrzymywanymi przez wiele dni liniami tętniczymi, w tym zwierząt z nadciśnieniem tętniczym, wykorzystałem w pracach opublikowanych na łamach *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* (IF = 1,029) w roku 1992<sup>403</sup> i w *Journal of Peptide Research* (1,741) w roku 2001<sup>394</sup>. Procedurę wstępnej adaptacji zwierząt do warunków doświadczalnych związanych z długotrwałym monito-

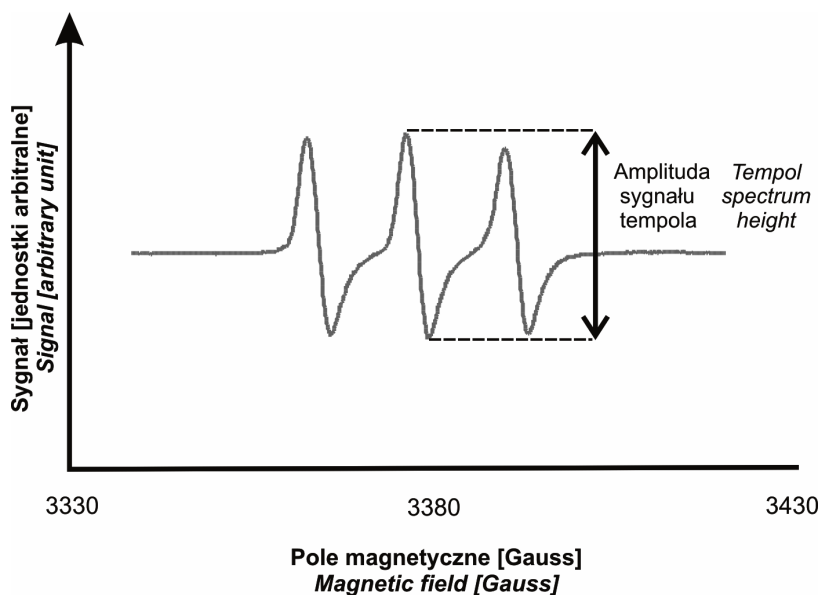
rowaniem ciśnienia tętniczego i częstości akcji serca oraz metodykę podawania testowanych substancji drogą dożylną i dotętniczą u szczurów bez narkozy nie wykazujących oznak niepokoju, zastosowałem między innymi w pracach opublikowanych w 2005 r w *Journal of Medicinal Chemistry* (IF = 4,926)<sup>396</sup> i *Journal of Peptide Science* (IF = 1,803)<sup>395</sup>. Procedura perfuzji izolowanego układu tętnic kregkowych została przeze mnie wykorzystana w pracach opublikowanych na łamach *Collection of Czech Chemical Communications* w roku 1991 (IF = 0,949)<sup>392</sup>, a zastosowany w niniejszej pracy zestaw do perfuzji naczyń izolowanych jest udoskonaloną i znacznie rozszerzoną wersją ówczesnego układu perfuzyjnego. Procedura treningu szczurów na bieżni ruchomej została przeze mnie zaprojektowana i zweryfikowana w praktyce w badaniach opublikowanych w *Journal Physiology and Pharmacology* (IF = 2,212) w 2006 roku<sup>402</sup>, zaś technikę implantacji drenów umożliwiających kilkutygodniowe utrzymanie linii naczynowych i dokładne odwzorowanie fali tętna wykorzystałem w pracy, która ukazała się na łamach *Acta Biochimica Polonica* w roku 2007 (IF = 1,863)<sup>398</sup>.

### 3.1. Biodystrybucja i kinetyka zaniku tempola

#### 3.1.1. ZANIK TEMPOLA W KRWIOBIEGU PO JEDNORAZOWEJ DAWCE DOŻYLNEJ

Doświadczenia zrealizowałem w celu oceny szybkości zaniku tempola w krwiobiegu po podaniu jednorazowej dawki dożylniej, a także możliwości odtwarzania tempola z jego hydroksylaminowej pochodnej, po całkowitym zaniku jego sygnału EPR. Zaprojektowałem oryginalny układ eksperymentalny, który umożliwia detekcję tempola w krwi krążącej w czasie rzeczywistym.

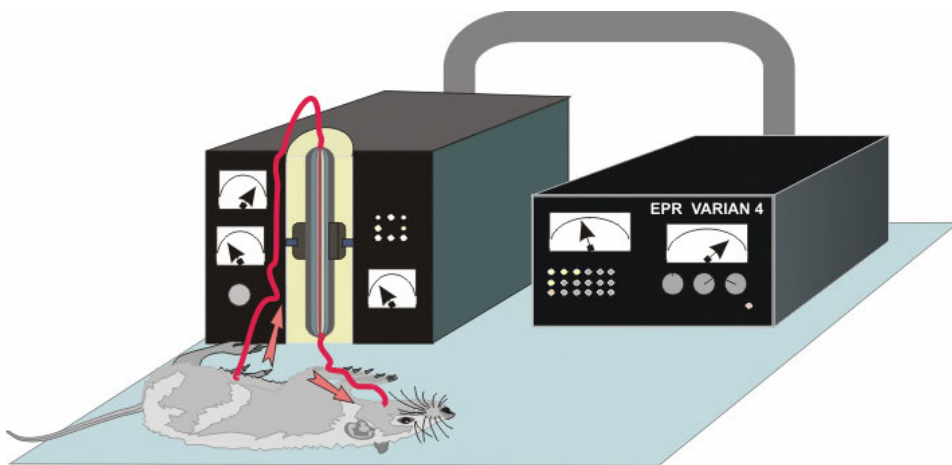
Doświadczenia przeprowadziłem na 9 szczurach, samcach rasy Wistar, o masie od 400 do 435 g, w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal - 50 mg/kg ip. oraz dodatkowo w razie potrzeby – 5 do 10 mg/kg, przeciętnie co 2 godziny). Dreny polietylenowe (PE-50, Clay-Adams, USA), zawierające heparynę (50 jedn. /ml) wprowadzono do żyły szyjnej powierzchownej lewej i do prawej tętnicy biodrowej. Szczura ułożono w bezpośrednim sąsiedztwie spektrometru EPR (Varian-E4, USA). Kapilarę kwarcową o pojemności 250 µl umieszczono we wnęce rezonacyjnej spektrometru. Sporządzono wodny roztwór tempola (1 µmol/l) jako standard do nastrojenia spektrometru i uzyskania wzorcowego widma EPR tempola. Po wypełnieniu tym roztworem drenu PE-50 zatknąco go oba końce, po czym przeprowadzono dren przez szklaną kapilarę, którą następnie wstawiono do wnęki rezonacyjnej spektrometru. Na monitorze zaobserwowano charakterystyczne widmo EPR tempola, zawierające 3 pasma składowe (ryc.4).



Ryc. 4. Widmo EPR tempola i wyznaczenie jego amplitudy

*Fig. 4. EPR tempol spectrum. Determination of magnitude of the spectrum*

Dostrojono spektrometr do środkowego szczytu widma, a następnie usunięto dren PE-50 z kapilary. Dreny wyprowadzone z układu naczyniowego szczura połączone ze sobą za pośrednictwem dodatkowego drenu PE-50 (Clay-Adams, Parsippany, USA) o długości 80 cm, który wcześniej przeciągnięto przez kapilarę umieszczoną uprzednio we wnęce rezonacyjnej spektrometru. W ten sposób uzyskano zewnętrzne połączenie tętniczo-żylnie. We krwi swobodnie przepływającej przez wnękę rezonacyjną spektrometru można było w sposób ciągły analizować obecność tempola (ryc. 5).



Ryc. 5. Schemat pomiaru

*Fig. 5. Measurement layout*

Przy czasie przepływu krwi przez pętlę tętniczo-żylną wynoszącym od 17 do 32 s, krew po wypłynięciu z tętnicy biodrowej docierała do wnęki rezonancyjnej po upływie 8 do 13 s. Stosunkowo powolny przepływ krwi wynikał ze znacznych oporów spowodowanych niewielkim przekrojem wewnętrznym zastosowanych drenów (0,58 mm). Niewielka szybkość przepływu krwi umożliwiała przeprowadzenie długotrwałego doświadczenia, gdyż wytworzony przeciek tętniczo-żylny nie powodował zauważalnych zaburzeń krążenia i oddychania. Po rozpoczęciu rejestracji EPR, podano pojedynczą dawkę tempola: 0,005, 0,02, 0,1, lub 1 mmol/kg do żyły szyjnej. Następnie rejestrowano w sposób ciągły amplitudę środkowego szczytu widma tempola. Skanowanie EPR przeprowadzono w dwóch 4-godzinnych cyklach, następujących bezpośrednio po sobie. Zastosowano następujące parametry skanowania: modulacja amplitudy – 5 G, częstotliwość mikrofal – 9,55 Hz, wzmocnienie – 100 do 10000, w zależności od amplitudy widma tempola, szerokość skanu – 100 G, stała czasowa – 14 s. Przebieg krzywych reprezentujących zmniejszanie w czasie amplitudy widma zdefiniowano przy użyciu oprogramowania Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA). Jako kryterium optymalnego wyboru typu krzywej i jej przebiegu przyjęto najmniejszą sumę kwadratów różnic pomiędzy rzeczywistymi punktami pomiarowymi i korespondującymi punktami w uzyskanych krzywych, co odpowiadało najwyższej wartości współczynnika determinacji  $r^2$ . Wartości sygnału EPR uzyskane z poszczególnych pomiarów ( $n = 3$ ) były do siebie zbliżone, stąd też przedstawiono je w postaci jednej, uśrednionej krzywej. Przy stosunkowo niskiej amplitudzie sygnału tempola jego detekcję przeprowadzano przy maksymalnym wzmocnieniu – 10000. Przy tak dużym wzmocnieniu spektrometr rejestrował znaczące szумы, w które wtapiał się badany sygnał. Wartość logarytmu ilorazu amplitudy widma do poziomu szumu  $\geq 0,1$  przyjęto arbitralnie jako poziom odniesienia dla wiarygodnego potwierdzenia występowania tempola w krwiobiegu. Należy przy tym zaznaczyć, że w licznych przeprowadzonych poprzednio oznaczeniach na materiale tkankowym można było w sposób nieregularny rozpoznać charakterystyczne widmo tempola przy stosunku amplitudy widma do szumu mniejszym od 0,02<sup>404</sup>. Wychodząc z założenia, że główny metabolit tempola - jego hydroksylaminowa pochodna, może przetrwać w ustroju znacznie dłużej niż cząsteczka macierzysta, co umożliwiałoby w obecności utleniaczy jej regenerację<sup>404-406</sup> zaplanowano dodatkowe eksperymenty z użyciem żelazicyjanku potasu -  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Związek ten utleniając zredukowaną formę tempola (TPL-H) przekształca ją do cząsteczki macierzystej, wykrywalnej metodą EPR.  $K_3[Fe(CN)_6]$  podano w jednorazowej dawce dożylniej (1 mmol/kg) 540 min. po uprzednim podaniu pojedynczej dawki tempola.

W celu odniesienia amplitudy sygnału EPR do jego stężenia w krwiobiegu i w tkankach wykonano krzywą kalibracyjną. Przygotowano roztwory tempola w 5% buforze fosforanowym (5% PBS, pH 7,4) w zakresie stężeń od 1 pmol/l do 10 mmol/l i po napełnieniu tymi roztworami kapilar pomiarowych wykonano metodą EPR oznaczenia amplitudy środkowego szczytu widma tempola.

### 3.1.2. WYSTĘPOWANIE TEMPOLA W TKANKACH PO PODANIU DOUSTNYM

Celem doświadczeń była ocena występowania tempola w wybranych tkankach szczura po 24-godzinny podawaniu doustnym w wodzie pitnej.

Badania przeprowadziłem na 15 szczurach, samcach szczepu Wistar o masie 386 - 410 g, które były przechowywane w osobnych klatkach doświadczalnych, w zwierzętar-

ni o stałej temperaturze:  $+22^{\circ}\text{C}$  i kontrolowanym oświetleniu. Pomieszczenie było oświetlone w godzinach od  $8^{30}$  do  $20^{30}$ , zaś w pozostałych godzinach w zwierzętarni było zupełnie ciemno. Szczury wykazują większą aktywność życiową i większe spożycie płynów w godzinach nocnych, co ma znaczenie przy planowaniu dawkowania testowanych substancji w postaci rozpuszczonej w wodzie pitnej. W okresie 14 dni poprzedzających właściwy eksperyment zmierzono dzienne spożycie wody, co umożliwiło indywidualne dostosowanie stężenia tempola w wodzie pitnej do zaplanowanej dawki. Cztery dni po wyprowadzeniu linii tętnicznej, szczury otrzymywały tempol rozpuszczony w wodzie do picia, w godzinach od  $9^{00}$  do  $9^{00}$  następnego dnia. Założono, że 24-godzinna dawka tempola powinna wynosić  $1\text{ mmol/kg}$ . Ostatecznie, po przeliczeniu objętości wypitej wody, okazało się, że szczury wypily  $0,965 \pm 0,012\text{ mmol/kg}$  (od  $0,905$  do  $1,085\text{ mmol/kg}$ ). Po okresie 24-godzinnego dawkowania, roztwór tempola w wodzie pitnej zastąpiono wodą. Po kolejnych 2 godzinach, zwierzęta zostały uśmiercone przez dekapitację, po uprzednim oszołomieniu eterem. Natychmiast po dekapitacji pobrano krew i narządy: serce, aortę, mięsień płaszczkowy (reprezentujący typ mięśnia o przewodze włókien czerwonych), mięsień prostownik długi palców (reprezentujący typ mięśnia o przewodze włókien białych), mózg i nerkę, krezkę jelitową, tarczycę, nadnercza i jądro. Krew wirowano przez 10 minut przy 1400 obrotach w celu oddzielenia krwinek czerwonych od osocza. Pobrane narządy i tkanki zważono, a następnie homogenizowano ręcznie przez 10 minut w roztworze buforu fosforanowego (5% PBS, pH 7,4), po czym próbki zamrożono w ciekłym azocie w celu zahamowania reakcji chemicznych.

Po rozmrożeniu próbki poddano analizie metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w celu określenia obecności oraz ilości badanej substancji. Skanowanie EPR na obecność swoistego widma tempola przeprowadzono spektrometrem Varian E-4 (Varian Associates Inc., USA) w kapilarach kwarcowych o pojemności  $150\text{ }\mu\text{l}$ , w temperaturze pokojowej, przy parametrach: stała czasowa 4 min, próbkowanie 0,3 s, szerokość skanu 100 G, modulacja amplitudy 26 G, moc mikrofal 20 mW, wzmocnienie  $2,5 \cdot 10^2$  do  $10^4$ , temperatura pomieszczenia  $22^{\circ}\text{C}$ . Przedmiotem analizy była amplituda sygnału tempola. Uwzględniając fakt, że ze wzrostem wzmocnienia sygnału zwiększał się zakres szumu pomiarowego. Przyjąłem, że optymalnym wykładnikiem wielkości właściwego sygnału jest logarytm ze stosunku amplitudy środkowego szczytu widma tempola do średniej wartości szumu -  $\log(S/N)$ .

### **3.1.3. ROZMIESZCZENIE TEMPOLA W WYBRANYCH TKANKACH PO PODANIU DOOTRZEWNOWNYM**

Doświadczenia wykonałem na 5 szczurach, samcach szczepu Wistar (350- 430 g), w celu oceny występowania tempola w tkankach po podaniu jednorazowej dawki dootrzewnowo.

Tempol –  $100\text{ }\mu\text{mol/kg}$ , rozpuszczony w 1 ml 0,9% NaCl podawałem dootrzewnowo. Po 120 minutach zwierzęta zostały uśmiercone przez dekapitację, po uprzednim oszołomieniu eterem. Natychmiast pobrano krew i narządy: serce, aortę, krezkę jelitową, mięsień płaszczkowy, mózg, nadnercza i nerki, z których wyodrębniono część korową i rdzeń. Krew wirowano przez 10 min. przy 1400 obrotach w celu oddzielenia krwinek czerwonych od osocza. Pobrane narządy i tkanki zważono, a następnie homogenizowano ręcznie przez 10 minut w roztworze buforu fosforanowego (5% PBS, pH 7,4). Krwinki czerwone i homogenaty tkankowe podzielono na dwie części. Pierwsza część zawierała składniki hydrofilowe z domieszką hydrofobowych i została niezwłocznie zamrożona w

ciekłym azocie. Do drugiej części dodano benzen w proporcji 1 : 3 (*vol/vol*) w celu wyekstrahowania komórkowej komponenty lipidowej. Próbki dwukrotnie starannie wymieszano, przed i po 30-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, po czym ponownie wirowano przez 10 min. przy 1400 obrotach. Pobrane próbki z frakcji benzenowej supernatantu zamrożono i przechowywano w ciekłym azocie. Proporcje rozcieńczeń dopasowano w taki sposób, aby uzyskać 10% homogenaty tkankowe.

Po rozmrożeniu próbki poddano analizie metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w celu określenia obecności oraz ilości badanej substancji. Skanowanie EPR na obecność swobodnego tempola przeprowadzono spektrometrem Varian E-4 (Varian Associates Inc., USA) w kapilarach kwarcowych o pojemności 150  $\mu\text{l}$ , w temperaturze pokojowej, przy parametrach: stała czasowa 4 min, próbkowanie 0,3 s, szerokość skanu 100 G, modulacja amplitudy 26 G, moc mikrofal 20 mW, wzmacnienie  $2,5 \cdot 10^2$  do  $10^4$ , temperatura pomieszczenia 22°C. Przyjąłem, że wykładnikiem wielkości amplitudy sygnału tempola jest logarytm ze stosunku amplitudy środkowego szczytu widma tempola do średniej wartości szumu -  $\log(S/N)$ .

## 3.2. Ocena wpływu tempola na ciśnienie tętnicze i czynność serca

### 3.2.1. MATERIAŁ

W doświadczeniach wykorzystano łącznie 240 szczurów samców: z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym genetycznie (szczep SHR; N = 79) i ich odpowiedników normotensyjnych (szczepu Wistar-Kyoto; WKY; N = 141), które pochodziły z licencjonowanej hodowli (Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Hodowli Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź oraz Zwierzętnia Instytutu Medycyny Pracy, Łódź) oraz z jedno- i dwupokoleniowej hodowli własnej. Zwierzęta przechowywano w plastikowych klatkach w zwierzętni Katedry i Zakładu Fizjologii Akademii Medycznej w Gdańsku. W pomieszczeniu utrzymywano kontrolowaną temperaturę  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  i stałą dobową rytmikę oświetlenia: przez 12 godzin nocnych zwierzęta przebywały w ciemności, zaś w pozostałych 12 godzinach zwierzętnia była oświetlona. Szczury miały nielimitowany dostęp do paszy granulowanej i wody. Spośród szczurów szczepu WKY wyodrębniono 2 grupy: WKY (N = 81) i LNR (N = 80). Grupa LNR otrzymywała inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS) L-nitroargininę (L-NNA; 100  $\mu\text{mol/kg}$ ), rozpuszczony w wodzie do picia. Stężenie L-NNA w wodzie pitnej dostosowywano do dziennego spożycia wody w poprzednim dniu.

Zastosowałem 3 procedury eksperymentalne o różnym czasie trwania.

### 3.2.2. METODYKA EKSPERYMENTALNA

#### PROCEDURA 3.2.2.1

Celem badań była ocena wpływu jednorazowej, dożylniej dawki tempola na ciśnienie tętnicze i częstość akcji serca u zwierząt bez narkozy, z uprzednio wprowadzoną linią tętniczną i linią żylną.

Doświadczenia zrealizowałem na 28 szczurach (285 – 340 g): WKY (N = 11), SHR (N = 9) i LNR (N = 8).

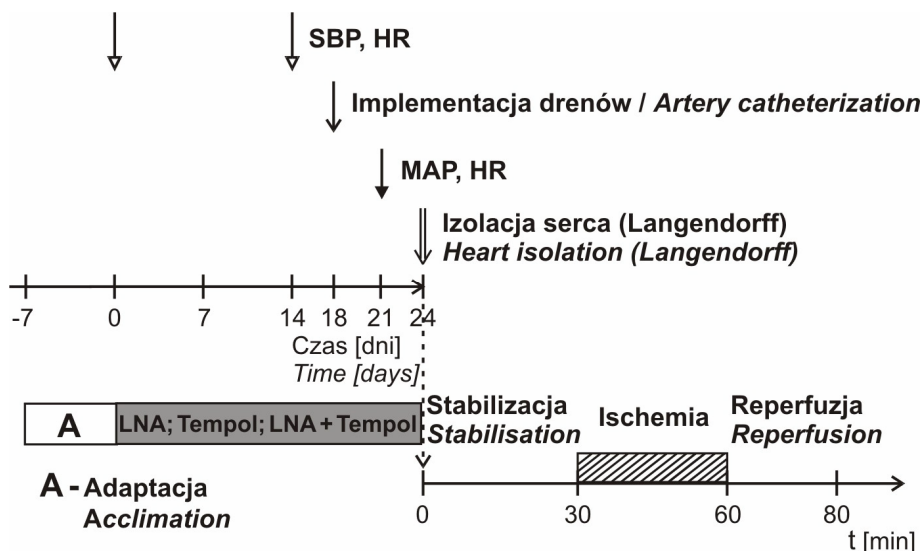
Przez 7 dni poprzedzających właściwy eksperyment zwierzęta były adaptowane do warunków pomiarowych, przez wielokrotne umieszczanie w klatkach doświadczalnych na okres od kilku do kilkudziesięciu minut, w warunkach oświetlenia i odgłosów akustycznych zbliżonych do występujących w trakcie pomiarów. Trzy dni przed właściwym eksperymentem wykonałem zabieg chirurgiczny w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal, Biowet; 50 mg/kg). Heparynizowany dren polietylenowy PE-50 (Clay-Adams, Parsippany, USA) wprowadziłem do prawej tętnicy biodrowej i do prawej żyły szyjnej powierzchownej, zaś zakończenia obu linii naczyniowych zostały wyprowadzone podskórnice w okolicy ciemieniowo-potylicznej. Doświadczenie rozpoczynało połączenie linii tętniczej z czujnikiem tensometrycznym (Statham Db-23B, Gould Inc., Oxnard, USA). Za pośrednictwem wzmacniacza (TT-6c, Zelmed, Polska), czujnik był połączony z jednokanałowym rejestratorem (TZ 21S, Laboratori Pstroje, Praga, Czechosłowacja). Po 30-minutowym okresie stabilizacji rejestrowano w sposób ciągły średnie ciśnienie tętnicze (MAP) i falę tętna, z której następnie obliczano częstość akcji serca (HR). Doświadczenie rozpoczęto od dożylnego podania 0,5 ml 0,9% NaCl. Następnie, w 45-minutowych odstępach podawano dożylnie wzrastające dawki tempola rozpuszczonego w 0,5 ml 0,9% NaCl. Każdy szczur otrzymał 3 z 6 wybranych dawek: 10 lub 100 nmol/kg, 1, 10, 55, lub 200  $\mu$ mol/kg oraz jako ostatnią dawkę - 1 mmol/kg. Przedmiotem analizy były maksymalne zmiany MAP i HR zachodzące po podaniu tempola.

### PROCEDURA 3.2.2.2

W procedurze eksperymentalnej doświadczenia przeprowadzone *in vitro*, na izolowanym preparacie serca, były poprzedzone 3-tygodniowym eksperymentem *in vivo* (ryc.6). Do doświadczeń włączyłem 50 szczurów (350 – 410 g): WKY (N = 18), SHR (N = 16) i LNR (N = 18). W analizie wyników uwzględniłem 46 szczurów (WKY: N = 18; SHR: N = 14 i LNR: N=14). Przyczynami wykluczenia były: nagły zgon (N = 2), nieoczekiwana znaczna utrata masy ciała (N = 1), lub nierównomierne picie płynów, utrudniające racjonalne dawkowanie L-NNA (N = 1).

Przedmiotem pierwszego etapu badań była ocena wpływu podawania tempola przez okres 14 – 21 dni na częstość akcji serca (HR) oraz ciśnienie tętnicze: skurczowe (SBP), mierzone metodą pośrednią oraz średnie (MAP) rejestrowane bezpośrednio z tętnicy. Przez 7 dni poprzedzających zwierzęta były adaptowane do warunków pomiaru ciśnienia tętniczego. Każda z grup została podzielona na dwie subpopulacje, z których jedna otrzymywała przez 24 dni tempol (0,25 mmol/kg): w postaci doustnej w wodzie do picia - 0,125 mmol/kg i w iniekcjach dootrzewnowych – 0,0625 mmol/kg, powtarzanych co 12 godzin. W okresie 24-dniowego dawkowania dzienne dawki były zbliżone do założonych i wynosiły: 0,42 mmol/kg tempola i 0,105 mmol/kg L-NNA. Bezpośrednio przed rozpoczęciem podawania L-NNA i tempola oraz po 14 dniach dokonano pomiarów SBP i HR metodą pletyzmograficzną na tętnicy ogonowej. W 18 dniu eksperymentu wykonałem zabieg chirurgiczny w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal, Biowet; Puławy 50 mg/kg). Dren elastomerowy wykonany na bazie poliuretanu (High fidelity pressure tubing RPT-040 z końcówką Micro-Renanthane<sup>®</sup>, MRC-04; Braintree Scientific, USA) wprowadziłem do prawej tętnicy biodrowej i do prawej żyły szyjnej powierzchownej, wyprowadzając podskórnice końcówki w okolicy ciemieniowo-potylicznej.





Ryc. 6. Procedura doświadczalna 3.2.2.2.

Fig. 6. The experimental procedure 3.2.2.2.

Trzy dni później linię tętniczą połączono z czujnikiem tensometrycznym (Statham-Gould Db-23B, Oxnard, USA). Za pośrednictwem wzmacniacza (UNI-BIO, Kared, Polska) czujnik był połączony z komputerem i z jednokanałowym rejestratorem (TZ 21S, Laboratorni Pstroje, Praga, Czechosłowacja). Po 30-min stabilizacji zarejestrowano MAP i HR.

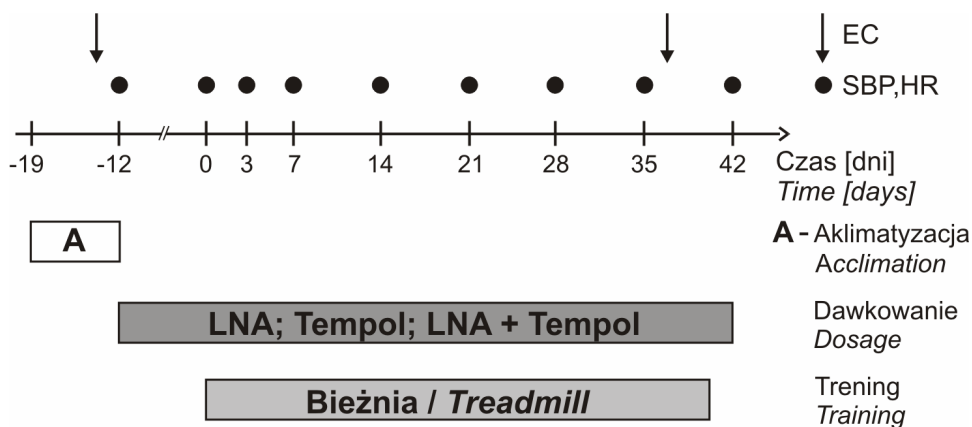
W drugim etapie, w 24 dniu procedury eksperymentalnej, wyizolowałem serce w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal, Biowet, 50 mg/kg) i podłączono do systemu perfuzyjnego w układzie Langendorffa. Serce perfundowano wstecznie, roztworem Krebsa o składzie (w mmol/l): NaCl – 112, KCl – 5,0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, NaHCO<sub>3</sub> – 25,0, D/+glukoza – 11,2 (pH = 7,40, osmolalność – 284 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), o temperaturze 37 °C, przy wysokości słupa cieczy 70 mm Hg. Po 30-min stabilizacji wstrzymywano perfuzję serca na 30 min (ischemia), po czym przywracano przepływ przez kolejne 20 min (reperfuzja). Płyn perfuzyjny przygotowywano bezpośrednio przed każdym doświadczeniem, zaś przed dopłynięciem do preparatu był wysycany mieszaną gazową, zawierającą 95% tlenu i 5 % dwutlenku węgla. W celu rejestracji ciśnienia wprowadzono balonik poliwinylowy połączony z drenem polietylenowym (PE-50, Clay-Adams, Parsippany, USA) do lewej komory serca przez zastawkę mitralną. Po umieszczeniu w komorze balonik wypełniano płynem. Objętość wypełnienia dostosowywano indywidualnie tak, aby uzyskać ciśnienie końcowo-rozkurczowe (EDP) o wysokości 5 cm H<sub>2</sub>O. Balonik połączono z czujnikiem tensometrycznym (Statham-Gould Db-23B, Oxnard, USA). Za pośrednictwem wzmacniacza i układu do akwizycji danych (UNI-BIO, Kared, Polska), czujnik był połączony z komputerem. Rejestrowano w sposób ciągły spontaniczną częstość akcji serca (HR), maksymalne ciśnienie podczas skurczu (PSP) i najniższe w czasie rozkurczu (EDP). Ponadto wyznaczono maksymalną szybkość przyrostu ciśnienia w czasie skurczu (+dP/dt), maksymalną szybkość rozkurczowego spadku ciśnienia (-dP/dt) oraz tzw. produkt podwójny (PRP), który jest iloczynem PSP i HR. W wyznaczonych odstępach: przez 60 s przed ischemią oraz w okresach reperfuzji: 0 – 45 s, 45 – 90 s, 135 – 180 s, 315 – 360 s, 555 – 600 s oraz 1155 – 1200 mierzone wypływy

plynu perfuzyjnego z serca przy użyciu cylindrów miarowych, który odpowiadał jego przepływowi przez naczynia wieńcowe preparatu. Przepływ wieńcowy odniesiono do masy serca (CF/HW) odsączonego ligniną i wyrażono w  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

### PROCEDURA 3.2.2.3

Badania były ukierunkowane na ocenę wpływu przewlekłego podawania tempola na ciśnienie tętnicze, częstość akcji serca, wydolność fizyczną oraz wybrane wykładniki metaboliczne odnoszące się do bioenergetyki komórki.

Przed doświadczeniem kilkakrotnie umieszczano zwierzęta na nieruchomej bieżni, którą później uruchamiano na 1-3 min, celem wytworzenia właściwego wzorca przebywania na bieżni i biegu. Szczury, które nie przystosowały się do warunków bieżni (około 10%) nie zostały zakwalifikowane do części eksperymentalnej. Do doświadczeń wstępnie zakwalifikowałem 160 szczurów (203 – 294 g): WKY (N = 52), SHR (N = 54) i LNR (N = 54), z których 147 uwzględniłem w analizie wyników (WKY: N = 51; SHR: N = 50 i LNR: N = 46). Przyczynami wykluczenia były: nagły zgon (N = 6), nieoczekiwana znaczna utrata masy ciała (N = 1), cechy infekcji (N = 1), uraz kończyny (N = 1), niestandardowe zachowanie na bieżni ruchomej podczas treningu (N = 2), niemożność zmierzenia ciśnienia tętniczego (N = 2). Schemat procedury eksperymentalnej przedstawia ryc. 7.



Ryc. 7. Procedura doświadczalna 3.2.2.3.

Fig. 7. The experimental procedure 3.2.2.3.

Każdą z podstawowych grup zwierząt podzieliłem na subpopulację nietrenowaną (WKYs, SHRs, LNRs) i trenowaną (WKYtr, SHRtr, LNRtr), a te z kolei na podgrupy, którym podawano tempol (0,25 mmol/kg/dobę rozpuszczony w wodzie do picia; Podgrupy: WKYs-T, N = 13; WKYtr-T, N = 13; SHRs-T, N = 12, SHRtr-T, N = 13; LNRs-T, N = 12; LNRtr-T, N = 9), lub placebo (WKYs-C, N = 13; WKYtr-C, N = 12, SHRs-C, N = 13; SHRtr-C, N = 12; LNRs-C, N = 13; LNRtr-C, N = 12). Dwukrotnie: 14 dni przed rozpoczęciem treningu biegowego oraz w 37 dniu treningu określano wydol-

ność fizyczną (EC), oznaczając czas biegu do wyczerpania. Przez 54 dni: 12 dni poprzedzających trening i 42 dni od jego rozpoczęcia szczury otrzymywały w wodzie do picia L-NNA, lub/i tempol, stosownie do przydziału grupowego. Dziewięciokrotnie: 12 - 14 dni przed rozpoczęciem treningu biegowego, bezpośrednio przed jego rozpoczęciem oraz w: 3, 7, 14, 21, 28, 35 i 42 dniu od jego rozpoczęcia dokonano pomiarów masy ciała (BW), SBP i HR metodą pletyzmograficzną na tętnicy ogonowej. Trening biegowy o stopniowo wzrastającej intensywności i czasie trwania był prowadzony przez 40 dni. Przez dwie ostatnie doby szczury wypoczywały. Zwierzęta nie poddane treningowi były umieszczane na nieruchomej bieżni na czas odpowiadający aktualnemu czasowi treningu. W ostatnim dniu doświadczenia, po nacięciu skóry w płytkiej narkozie eterowej pobierano krew z tętnicy biodrowej do dalszych oznaczeń, po czym szczura dekapitowano przy użyciu gilotyny, skrawiano, a następnie pobierano serce i mięsień brzuchaty łydki (*m. gastrocnemius*) w celu wykonania dalszych oznaczeń. Schemat stopniowego wzrostu obciążeń treningowych przedstawiono w tab. 4. Każdy trening rozpoczynał się 5 min. rozgrzewką o małej intensywności. Największa zaplanowana moc wysiłku odpowiadała w przybliżeniu zakresowi 75 – 85 %  $VO_{2max}^{407,408}$ .

Tab. 4. Schemat treningu biegowego

Tab. 4. Schedule of the treadmill training

Dzień Day	Tryb treningowy Mode of programme	Czas Duration [min]	Dzień Day	Tryb treningowy Mode of programme	Czas Duration [min]
-19 - 0	<b>0</b>	5-10	23	<b>D</b>	45
1-2	<b>A</b>	20	24	<b>D</b>	45
3-4	<b>A</b>	25	26	<b>E</b>	40
5	<b>B</b>	25	27	<b>D</b>	50
6	<b>B</b>	30	28	<b>F</b>	50
8	<b>B</b>	30	30	<b>F</b>	55
9	<b>B</b>	35	31	<b>F</b>	50
10	<b>C</b>	30	33	<b>F</b>	55
12	<b>C</b>	30	34	<b>F</b>	50
13	<b>B</b>	35	35	<b>G</b>	55
15-16	<b>C</b>	35	37	<b>G</b>	55
17	<b>C</b>	40	38	<b>F</b>	60
19-20	<b>D</b>	40	39	<b>F</b>	60
21	<b>D</b>	45	40	<b>E</b>	60

Maksymalna intensywność treningu: 0 – adaptacja do bieżni i treningu; A: bieg poziomy – 18 m / min ; B: bieg poziomy - 22m / min; C: bieg poziomy – 25m / min; D: nachylenie 3° – 22 m / min; E: nachylenie 5° – 25 m / min; F: nachylenie 7° – 25 m / min; G: nachylenie 10° – 25 m / min. Kolejne etapy treningu (do 5): 1) rozgrzewka: bieg poziomy 5' - 10m / min - 5'; 2) bieg poziomy 5'– 15 min; 3) do 40 min treningu – maksymalna intensywność danego dnia; 4) 41 – 44 min treningu – intensywność D; 5) od 45 min - maksymalna intensywność danego dnia .

Maximal training intensity: 0 – Acclimation to treadmill ; A: no incline – 18 m / min ; B: no incline – 22 m / min; C: no incline – 25 m / min; D: 3° incline – 22 m / min; E: 5° incline – 25 m / min; F: 7° incline – 25 m / min; G: 10° incline – 25 m / min. Subsequent training stages (up to 5): 1) Warm up 5', no incline 10 m / min - 5'; 2) no incline, 5' – 15 m / min; 3) up to 40 min of training - maximal daily workload; 4) min 41 - 44 – intensity D; 5) from min 45 – maximal daily workload.

#### PROCEDURA 3.2.2.4

Celem doświadczeń była analiza wpływu tempła na wykładniki podatności dużych pni tętniczych: szybkość rozprzestrzeniania się fali tętna w aorcie oraz dynamikę narastania i spadku ciśnienia tętniczego w aorcie w poszczególnych cyklach sercowych.

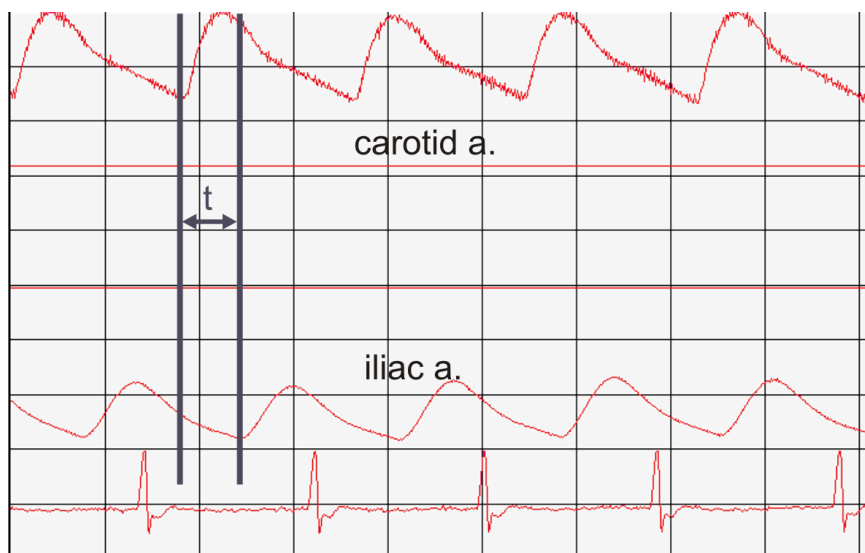
Doświadczenia wykonałem na 15 szczurach (355 – 408 g): WKY (N = 5), SHR (N = 5) i LNR (N = 5). Szczury grupy LNR otrzymywały L-NNA przez 7 poprzedzających dni.

Pięć dni przed właściwym eksperymentem wyprowadziłem line naczyniowe w narozie pentobarbitalowej (Vetbutal, Biowet; 50 mg/kg). Do prawej tętnicy biodrowej i do lewej tętnicy szyjnej wewnętrznej wprowadziłem dren elastomerowy wykonany na bazie poliuretanu (High fidelity pressure tubing RPT-040 z końcówką Micro-Renanthane<sup>®</sup>, MRC-04; Braintree Scientific, USA), o bardzo dobrej charakterystyce przenoszenia fali tętna przy właściwościach antyagregacyjnych ściany wewnętrznej. Zastosowane dreny są rekomendowane przez American Heart Association do eksperymentalnych pomiarów ciśnienia tętniczego u zwierząt<sup>409</sup>. Końcówki drenów umieściłem przy odejściu tętnic od aorty. Dren polietylenowy PE-50 (Clay-Adams, Parsippany, USA) wprowadziłem do prawej żyły szyjnej powierzchownej. Trzy miniaturowe płaskie elektrody srebrne własnej konstrukcji rozmieściłem w tkance podskórnej: dwie na przedniej powierzchni klatki piersiowej (układ elektrod dwubiegunowych) i jedną – elektrodę odniesienia w okolicy przykręgosłupowej. Elektrody były połączone z miękkimi, izolowanymi przewodami elektrycznymi zakończonymi bolcem wtykowym. Dreny naczyniowe i przewody elektryczne wyprowadziłem podskórnie i umocowałem w okolicy ciemieniowo-potylicznej. Począwszy od drugiego dnia po zabiegu chirurgicznym dreny były codziennie przepłukiwane roztworem heparyny (75 jedn./ml).

Przez 7 dni poprzedzających właściwy eksperyment zwierzęta przyzwyczajano do warunków pomiarowych, przez wielokrotne umieszczanie w klatkach doświadczalnych na okres od kilku do kilkudziesięciu minut, w warunkach oświetlenia i odgłosów akustycznych zbliżonych do występujących w trakcie pomiarów.

Właściwe eksperymenty rozpoczynałem około godziny 11.00, w okresie małej aktywności szczurów, po umieszczeniu zwierząt w klatkach doświadczalnych, gdzie miały pozostawioną swobodę ruchu. Początkiem właściwego eksperymentu było połączenie obu linii tętniczych z czujnikami tensometrycznymi (Statham-Gould Db-23B, Oxnard, USA) oraz połączenie wyprowadzonych elektrod z układem do rejestracji EKG. Czujniki i elektrody były połączone z komputerem za pośrednictwem układu wzmacniającego sygnał (UNI-BIO, Kared, Polska), który go przetwarzał w postać cyfrową. Do wyprowadzonej uprzednio linii żyłnej dołączono zewnętrzny dren wyprowadzony ze strzykawki umieszczonej w pompie infuzyjnej (F5z Dialyse 15; Dascon BV, Uden, Holandia). Po kilkunastominutowym zaadaptowaniu do warunków otoczenia szczury zwykle przyjmowały pozycję leżącą i przez następne kilka godzin sporadycznie przemieszczały się wewnątrz klatki. Po 30-min stabilizacji rozpoczęto ciągłą rejestrację: HR, ciśnienia tętniczego, arteriogramów z aorty (z końcowego odcinka łuku aorty i z jej rozwidlenia) oraz krzywej EKG. Sygnał ciśnieniowy rejestrowano z częstością próbkowania 1,5 kHz. Czas wystąpienia ciśnienia skurczowego (SBP) i rozkurczowego (DBP), a także wartości SBP, DBP i średniego ciśnienia tętniczego (MAP) oraz maksymalnej szybkości narastania ciśnienia w aorcie podczas skurczu ((+dP/dt)max) i szybkości spadku ciśnienia w rozkurczu (-dP/dt), obliczono przy użyciu dedykowanego oprogramowania Analiza oryginalnie opracowanego przez mgr. G. Redlarskiego. Sygnał EKG rejestrowano z pierwotną częstością próbkowania 12 kHz, z rozdzielczością 14 bitów. W celu dokład-

nego wyznaczenia czasu trwania pojedynczego cyklu serca obliczono czas trwania kolejnych odstępów RR (RRi). Lokalizację załamków R określono przy użyciu oprogramowania Analiza-3E (mgr G. Redlarski). Przy przetwarzaniu danych zostały zsumowane wartości bezwzględne pierwszej i drugiej pochodnej sygnału. Sumę tę odfiltrowano w filtrze dolnoprzepustowym. W kolejnych przeliczeniach ustalane było położenie czasowe próbek o lokalnie najwyższej wartości przekraczającej automatycznie nastawioną wartość progową. Z 11 próbek sąsiadujących z tym maksimum lokalnym była wyznaczona parabola metodą najmniejszych kwadratów, po czym określona została lokalizacja maksimum tej paraboli. Punkt ten przyjmowano jako szczyt załamka R. Zastosowany algorytm obliczeniowy pozwolił na zwiększenia rozdzielczości przy ustalaniu lokalizacji załamka R. Doświadczenia symulacyjne przeprowadzone w przez dr. inż. P. Wierzbę w Katedrze Optoelektroniki i Systemów Elektronicznych Politechniki Gdańskiej (dane nieopublikowane) wykazały, że rzeczywista rozdzielczość przy wyznaczaniu odstępów RR przekracza 2 kHz. Z odstępów RR obliczono HR, zgodnie z wzorem:  $HR [\text{min}^{-1}] = 60/\text{RRi}$ . W celu wyznaczenia szybkości rozprzestrzeniania fali tętna ( $v$ ) określono przesunięcie w czasie ( $t$ ) między ciśnieniami rozkurczowymi zarejestrowanymi z linii tętnicznej z końcowego odcinka łuku aorty i z jej rozwidlenia (ryc. 8). Po zakończeniu doświadczenia i uśmiercieniu szczura w narkozie pentobarbitalowej, otworzono jamę brzuszną i klatkę piersiową, po czym zmierzono odległość ( $S$ ) pomiędzy końcówkami drenów obu linii tętnicznych. Szybkość rozprzestrzeniania fali tętna wyznaczono z wzoru:  $v = S/t$ .



Dwie linie pomocnicze przechodzące przez punkty ciśnienia rozkurczowego obu zapisów ciśnienia tętniczego wyznaczają czas  $t$  przejścia fali ciśnieniowej pomiędzy końcowym odcinkiem łuku aorty i jej rozwidleniem.  
*Two accessory lines intersecting the diastolic pressure points of the both arterial pressure lanes delineates the time  $t$  of the arterial wave translocation between the distal part of the aortic arch and the aortal bifurcation.*

Ryc. 8. Fragment oryginalnego zapisu równoczesnej rejestracji EKG i ciśnienia tętniczego za pośrednictwem cewników wprowadzonych do tętnicy szyjnej wewnętrznej i tętnicy biodrowej.  
*Fig. 8. Fragment of the original recording of the simultaneous registration of ECG and arterial pressure through catheters indwelled into the carotid and iliac arteries.*

Maksymalna szybkość narastania ciśnienia w aorcie podczas skurczu:  $(+dP/dt)_{\max}$  została obliczona przy użyciu przez wyznaczenie metodą najmniejszych kwadratów najbardziej stromego przebiegu linii regresji, wyznaczonego przez conajmniej 3 punkty pomiarowe mieszczące się na przebiegu krzywej wzrostu ciśnienia. Dla wyznaczenia szybkości rozkurczowego spadku ciśnienia tętniczego w aorcie  $(-dP/dt)$  podzielono okres pomiędzy ciśnieniem skurczowym i rozkurczowym w danym cyklu serca na 7 równych części. Średnie nachylenie piątej, kolejnej części okresu spadku ciśnienia tętniczego przyjąłem jako miarę podatności rozkurczowej ściany aorty. Przy rejestrowanych wzorcach krzywej ciśnienia tętniczego piąty odcinek okresu spadku ciśnienia występował zawsze po zakończeniu fali dykrotycznej i bezpośrednio poprzedzał ewentualne wystąpienie dyskretnej fali przedsionkowej, która mogłaby zakłócać interpretację wyników.

Po okresie stabilizacji, szczirom podawano przy użyciu pompy infuzyjnej 1 ml roztworu 5% glukozy przez okres 20 min. Po 20-min przerwie wykonywano kolejno cztery 20-min infuzje 1 ml roztworów tempola rozpuszczonego w 5% glukozie. Po każdej infuzji zaplanowano 40-min okres dodatkowej rejestracji badanych zmiennych. W kolejnych infuzjach stosowano coraz większe stężenia tempola, dostosowane do masy szcziura przeciętnie: 0,13, 1,3, 13 i 130 mg/ml, co odpowiadało dawkom podanym w ciągu 20 min: 0,002, 0,02, 0,2 oraz 2 mmol/kg. Wcześniejsze doświadczenia z pomiarem pobierania wody i wydalania moczu przeprowadzone w klatkach metabolicznych wykazały<sup>376,392</sup>, że w porównywalnych warunkach nie dochodzi do retencji płynów u szcziurów bez narkozy, którym podawano analogiczne, lub kilkakrotnie większe objętości płynu.

### PROCEDURA 3.2.2.5.

Celem doświadczeń była analiza wpływu jednorazowych dawek tempola na autogenną reaktywność odruchu z baroreceptorów tętnicznych. W ocenie wpływu tempola na odruch z baroreceptorów tętnicznych zastosowano metodę sekwencyjną oceny spontanicznych fluktuacji ciśnienia tętniczego powiązanych ze zmianami częstości akcji serca<sup>410</sup>.

Doświadczenia przeprowadziłem na 17 szcziurach (302 – 344 g): WKY (N = 8 ), SHR (N = 4) i LNR (N = 5). Szcziury grupy LNR otrzymywały L-NNA przez 7 poprzedzających dni.

Siedem dni przed właściwym eksperymentem wykonałem zabieg chirurgiczny w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal, Biowet; 50 mg/kg). Do prawej tętnicy biodrowej i do prawej żyły szyjnej powierzchownej wprowadziłem dren elastomerowy wykonany na bazie poliuretanu (High fidelity pressure tubing RPT-040 z końcówką Micro-Renanthane<sup>®</sup>, MRC-04; Braintree Scientific, USA), o bardzo dobrej charakterystyce przenoszenia fali tętna przy właściwościach antyagregacyjnych ściany wewnętrznej. Trzy miniaturowe płaskie elektrody srebrne własnej konstrukcji rozmieściłem w tkance podskórnej: dwie na przedniej powierzchni klatki piersiowej (układ elektrod dwubiegunowych) i jedną – elektrodę odniesienia w okolicy przykręgosłupowej. Elektrody były połączone z miękkimi, izolowanymi przewodami elektrycznymi zakończonymi bolcem wtykowym. Dreny naczyniowe i przewody elektryczne wyprowadziłem podskórnie i umocowałem w okolicy ciemieniowo-potylicznej. Począwszy od drugiego dnia po zabiegu chirurgicznym dreny codziennie przepłukiwano roztworem heparyny (75 jedn./ml).

Przez 10 dni poprzedzających właściwy eksperyment zwierzęta były adaptowane do warunków doświadczenia.

Początkiem właściwego eksperymentu było połączenie linii tętniczej z czujnikiem tensometrycznym (Statham-Gould Db-23B, Oxnard, USA) oraz połączenie wyprowadzonych elektrod z układem do rejestracji EKG. Czujniki i elektrody były połączone z komputerem za pośrednictwem układu wzmacniającego sygnał (UNI-BIO, Kared, Polska) i przetworzeniu go na postać cyfrową. Rejestrowano w sposób ciągły EKG i ciśnienie tętnicze. Po 30-min okresie stabilizacji i przyjęciu przez szczura pozycji spoczynkowej podawano dożylnie tempol – 0,02 mmol/kg, rozpuszczony w 0,25 ml 5% glukozy. Po 60 min podawano kolejną dawkę tempola: 0,2 mmol/kg. Sygnał ciśnieniowy rejestrowano z częstością próbkowania 1,5 kHz. Wartości średniego ciśnienia tętniczego (MAP), ciśnienia skurczowego (SBP) i rozkurczowego (DBP) oraz zmienne charakteryzujące reaktywność odruchu z baroreceptorów tętniczych wyznaczono przy użyciu dedykowanego oprogramowania Analiza (wersja 9P) oryginalnie opracowanego przez mgr. G. Redlarskiego. Sygnał EKG rejestrowano z pierwotną częstością próbkowania 12 kHz, z rozdzielczością 14 bitów. W celu dokładnego wyznaczenia czasu trwania pojedynczego cyklu serca obliczono czas trwania kolejnych odstępów RR (RRi). Lokalizację załamek R określono przy użyciu oprogramowania Analiza-3E (mgr G. Redlarski). Z odstępów RR obliczono HR, zgodnie z wzorem:  $HR [min^{-1}] = 60/RRi$ . Określono metodą sekwencyjną spontaniczną reaktywność odruchu z baroreceptorów tętniczych. Wyznaczono sekwencje następujących po sobie spontanicznych wzrostów i spadków SBP i HR. Za wiarygodną sekwencję przyjąłem cykl kolejnych 3 do 6 jednokierunkowych zmian SBP, lub HR, w których wielkość kolejnej zmiany była nie mniejsza niż 0,5% wartości początkowej, lub łączna amplituda 3 kolejnych zmian była nie mniejsza niż 2% wartości początkowej. Trzy kolejne okresy, trwające po 90 s zapisu ciśnieniowego i EKG zarejestrowane po 5 min od podania każdej z dawek tempola zostały włączone do analizy danych. Wyniki obliczeń z kolejnych 3 okresów zsumowano i obliczono wartości średnie poszczególnych zmiennych. Przy wybraniu okna czasowego do porównawczej analizy uwzględniono wyniki wcześniejszych oznaczeń, wskazujące na stosunkowo znaczną dynamikę zaniku tempola w krwioobiegu w pierwszych 3 min od jego podania dożylnego i jego znacznie wolniejszy zanik i stosunkowo stabilne stężenie we krwi w okresie późniejszym. Wyznaczono liczbę sekwencji zmian SBP przypadających na 100 cykli sercowych oraz ich częstotliwość. Obliczono odsetek sekwencji zmiany HR rozpoczynających się równocześnie, lub z opóźnieniem do 6 cykli sercowych w stosunku do sekwencji zmiany SBP, określając te sekwencje zmian HR jako sekwencje skojarzone. Wyróżniono 2 typy sekwencji skojarzonych: zgodne, w których kierunek zmiany SBP i zmiany RRi były zgodne i niezgodne, gdzie kierunek zmian był przeciwny. W ramach każdego typu sekwencji zmian SBP wyodrębniono sekwencje spadku i wzrostu SBP. Przyjęto, że jedynie sekwencje zgodne reprezentują spontaniczny odruch z baroreceptorów tętniczych (BRS)<sup>411</sup>. Stosunek liczby sekwencji zgodnych do całkowitej liczby sekwencji zmiany SBP przyjąłem jako miarę wydajności BRS<sup>412</sup>. Jako dodatkowy wskaźnik charakteryzujący BRS obliczyłem średnie opóźnienie sekwencji zmiany HR w stosunku do sekwencji zmiany SBP<sup>411,413</sup>. Dla każdego układu sekwencji zgodnej wyznaczono metodą korelacji Pearsona nachylenie linii regresji reprezentującej zależność liniową sekwencyjnej zmiany częstości HR jako funkcji zmiany SBP podczas sekwencji ciśnieniowej. Po odrzuceniu 5% wartości skrajnych wyznaczono wartości średnie nachylenia linii regresji wyznaczonych w danym okresie rejestracji danych. Nachylenie linii regresji zależności zmiany HR od pierwotnej SBP jest miarą wzmocnienia reakcji odruchowej, określaną jako wrażliwość odruchu z baroreceptorów.

### PROCEDURA 3.2.2.6

Celem doświadczeń była analiza wpływu tempola na zmienność rytmu serca (HRV) w warunkach standardowych oraz podczas hipoksji wywołanej obniżeniem ciśnienia atmosferycznego, co w założeniu miało prowadzić do pobudzenia chemoreceptorów tętniczych.

Doświadczenia przeprowadziłem na 9 szczurach (311 – 365 g): WKY (N = 5), SHR (N = 4), uprzednio zainstrumentowanych chirurgicznie w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal, Biowet; 50 mg/kg). Do prawej tętnicy biodrowej wprowadziłem dren elastomerowy wykonany na bazie poliuretanu (High fidelity pressure tubing RPT-040 z końcówką Micro-Renanthane<sup>®</sup>, MRC-04; Braintree Scientific, USA). Trzy miniaturowe płaskie elektrody srebrne własnej konstrukcji rozmieściłem w tkance podskórnej: dwie na przedniej powierzchni klatki piersiowej (układ elektrod dwubiegunowych) i jedną – elektrodę odniesienia w okolicy przykregosłupowej. Elektrody były połączone z miękkimi, izolowanymi przewodami elektrycznymi zakończonymi bolcem wtykowym. Linie tętniczą i przewody elektryczne wyprowadziłem podskórnie i umocowałem w okolicy ciemieniowo-potylicznej. Począwszy od drugiego dnia po zabiegu chirurgicznym dreny codziennie przepłukiwano roztworem heparyny (75 jedn./ml).

Przez 7 dni poprzedzających właściwy eksperyment, zwierzęta były przystosowywane do warunków pomiarowych, przez wielokrotne umieszczanie w klatkach doświadczalnych na okres od kilku do kilkudziesięciu minut, w warunkach oświetlenia i odgłosów akustycznych zbliżonych do występujących w trakcie pomiarów.

Właściwy eksperyment był trwał 36 dni i składał się z czterech, 9-dniowych cykli, których kolejność była dobrana losowo. Przez pierwsze 2 dni każdego cyklu szczurom nie podawano tempola, lub L-NNA, natomiast przez kolejne 7 dni szczury WKY otrzymywały w wodzie do picia: tempol (0,2 mmol/kg), L-NNA (0,1 mmol/kg), tempol i L-NNA (odpowiednio: 0,2 i 0,1 mmol/kg), lub wodę do picia bez dodatków. Szczury SHR otrzymywały tempol przez losowo wybrane dwa z czterech cykli doświadczalnych, zaś w pozostałych 2 cyklach otrzymywały wodę do picia bez dodatków. W grupie SHR dane liczbowe uzyskane z cykli z tempolem, lub bez tempola uśredniono. Powtórzenie cykli w grupie SHR miało na celu ujednoczenie całkowitego okresu eksperymentu oraz zapewnienie porównywalnego okresu podawania tempola w grupach WKY i SHR. W rezultacie dla celów analizy porównawczej wyodrębniono 3 grupy szczurów: WKY, LNR (WKY w cyklach, w których otrzymywały L-NNA) oraz SHR.

W ostatnim dniu każdego cyklu zwierzęta umieszczano w oryginalnie przystosowanej przezroczystej komorze hipobarycznej o pojemności 4 l (Nalgene, USA). Linie tętniczą złączono ze zmodyfikowanym czujnikiem tensometrycznym (Gould 23-ID, Cleveland, USA), zaś wyprowadzone końcówki elektrod połączono z oryginalnie zaprojektowanym i wykonanym przedwzmacniaczem (inż. G. Redlarski), który był przekazywał sygnał pomiarowy do układu rejestrującego. Sygnał z czujnika tensometrycznego i z elektrod EKG był przesyłany za pośrednictwem ekranowanych przewodów przeprowadzonych przez ścianę komory hipobarycznej do komputera typu PC do dalszej obróbki i analizy. Sygnały pomiarowe docierały do komputera po ich kolejnym wzmocnieniu, odfiltrowaniu i przetworzeniu w postać cyfrową (system UNI-BIO, Kared, Polska). Komora hipobaryczna, wyposażona w manometr była połączona za pośrednictwem zbiornika kompensacyjnego o pojemności 12 l z pompą podciśnieniową (Mediada, Göteborg, Szwecja) o znacznej sile ssącej. Zbiornik kompensacyjny zapobiegał nagłym zmianom ciśnienia w komorze hipobarycznej. Po umieszczeniu szczura w rozszczelnionej komorze hipobarycznej i 30-min okresie adaptacji szczura rozpoczynano ciągłą reje-



stracę EKG oraz rejestrowano przez okres 1 min ciśnienie tętnicze. Po zamknięciu komory hipobarycznej uruchamiano pompę podciśnieniową. W ciągu około 6 min ciśnienie w komorze obniżało się do poziomu -100 mm Hg w stosunku do otoczenia (Hipoksja I) i przez kolejne 14 min było utrzymywane przez pracującą pompę na zbliżonym poziomie ( $\pm 10\%$ ). Przez kolejne 6 min ciśnienie w komorze stopniowo obniżano do poziomu -200 mm Hg (Hipoksja II) i utrzymywano na stabilnym poziomie ( $\pm 10\%$ ) przez kolejne 14 min. Następnie w ciągu 100 - 120 s wyrównywano ciśnienie w komorze do poziomu ciśnienia atmosferycznego otoczenia, komorę rozszczelniano, pozostawiając w niej szczury przez kolejne 60 min. Dla wyłączenia wpływu hiperkapni, do której mogłoby dojść przy pozostawieniu szczura w szczelnej komorze o ograniczonej objętości komorę w sposób rozszczelniono komorę. Przez ścianę komory przeprowadzono cienką kaniulę wykonaną z igły do wstrzyknieć (rozmiar 25G, Terumo, Belgia). Wstępne pomiary ujawniły, że w założonym zakresie podciśnienia do -300 mm Hg, pompa podciśnieniowa usuwała z komory hipobarycznej nieco większą objętość powietrza w jednostce czasu niż było w stanie przeniknąć do komory przez kaniulę. W ten sposób podczas pracy pompy w komorze utrzymywano kontrolowane podciśnienie przy równoczesnej efektywnej wymianie gazowej, przekraczającej 1 l/min. Przed oraz w 3, 10 i 20 min każdego cyklu hipoksji hipobarycznej oraz w 5, 15, 30 i 60 min po jej zakończeniu rejestrowano ciśnienia tętnicze.

Sygnal EKG rejestrowano z pierwotną częstotliwością próbkowania 12 kHz, z rozdzielczością 14 bitów. W celu dokładnego wyznaczenia czasu trwania pojedynczego cyklu serca obliczono czas trwania kolejnych odstępów RR (RRi). Lokalizację załamek R określono przy użyciu oprogramowania Analiza-3E (mgr G. Redlarski). Przy przetwarzaniu danych zostały zsumowane wartości bezwzględne pierwszej i drugiej pochodnej sygnału, a następnie odfiltrowano tę sumę w filtrze dolnoprzepustowym. W kolejnych przeliczeniach ustalane było położenie czasowe próbek o lokalnie najwyższej wartości przekraczającej automatycznie nastawioną wartość progową. Z 11 próbek sąsiadujących z tym maksimum lokalnym była wyznaczona parabola metodą najmniejszych kwadratów, po czym określona została lokalizacja maksimum tej paraboli. Punkt ten przyjmowano jako szczyt załamek R.

Po wstępnej wizualizacji krzywej EKG przy użyciu dedykowanego oprogramowania Viewer (Kared, Gdańsk) z zapisu EKG przed hipobarią oraz rozpoczynających się w 3, 8 i 17 min każdego z okresów hipobarii, a także rozpoczynających się w 2, 10, 30 i 60 min od jej zakończenia wyodrębniono 2 - 3 min. niezakłócone ciągi RRi do dalszej analizy zmienności rytmu serca (HRV). Brakujące, lub niepasujące odstępy RR zastępowano średnią z 5 poprzedzających i 5 następujących RRi. Taki sposób filtracji zapisu EKG stosowano w przypadku stwierdzenia wystąpienia pojedynczych zakłóceń uniemożliwiających identyfikację RRi, wystąpienia pobudzenia dodatkowego lub pojedynczego RRi o czasie trwania różniącym się o więcej niż 3 odchylenia standardowe od średniej 5 poprzedzających RRi. Nieprawidłowości wymagające takiej interwencji stanowiły mniej niż 1% analizowanych odstępów RR. Analizę HRV przeprowadzono przy użyciu oprogramowania HRV Analysis (wersja 1.1, z poprawkami; Kuopio, Finlandia) przy zastosowaniu obliczeń nieparametrycznych opartych na algorytmie szybkiej transformaty Fouriera (FFT) oraz technik parametrycznych bazujących na modelowaniu sygnału przy wykorzystaniu metod autoregresyjnych (AR)<sup>414</sup>. Z poszczególnych okresów zapisu poddanych analizie zostały wyodrębnione 1 do 2 odcinków składających się z 512 kolejnych RRi i utworzono z nich periodogram Welsha. Wyodrębnione odcinki podzielono na 3 sekwencje kolejnych 256 RRi, nakładające się na siebie z przesunięciem 128 odstępów. Dla każdej z trzech sekwencji RRi obliczono wartości liczbowe analizowanych wykład-

ników HRV, obliczając wartości średnie dla każdego odcinka składającego się z 512 RRi. Program obliczeniowy dokonywał automatycznej interpolacji sekwencji RRi z częstotliwością 5 Hz, a następnie przeprowadzał analizę HRV po uprzednim usunięciu trendu liniowego przy zastosowaniu dwukierunkowej filtracji wygładzającej Kalmana<sup>415</sup> oraz przy wykorzystaniu ruchomego okna widmowego Hamminga. Przy obliczeniach z wykorzystaniem metody AR zastosowano następujące parametry obliczeniowe: współczynnik alfa – 200, rząd modelu autoregresyjnego – 31<sup>416</sup>.

Wyznaczono składowe HRV analizy widmowej: TP (Total Power, całkowita moc widma, w przedziale częstotliwości 0,04-2,2 Hz; VLF (very low frequency) - moc widma zmienności rytmu zatokowego w zakresie ultra niskich częstotliwości: 0,04 – 0,27 Hz, LF (Low Frequency) - moc widma w zakresie niskich częstotliwości (0,28-0,74 Hz) oraz HF (High Frequency) - moc widma w zakresie wysokich częstotliwości (0,74-2,2 Hz). Obliczono stosunek LF/HF, który jest uznanym wykładnikiem udziału komponenty współczulnej w autonomicznej regulacji krążenia. Ponadto, jako wykładniki HRV w analizie czasowej wyznaczono: HR, rMSSD (pierwiastek kwadratowy ze średniej z kwadratów różnic między kolejnymi RRi). Po zaobserwowaniu, że różnice ocenianych wykładników HRV między grupami szczurów mają zbliżoną charakterystykę przy analizie wykonanej metodą FFT i metodą AR przedstawiono jedynie wyniki obliczeń uzyskanych metodą AR. Doświadczenia symulacyjne przeprowadzone przez dr. inż. P. Wierzbę w Katedrze Optoelektroniki i Systemów Elektronicznych Politechniki Gdańskiej (dane nieopublikowane), częściowo w oparciu o oryginalnie zarejestrowane zapisy EKG wykazały, że przy zmianie rozdzielczości próbkowania sygnału EKG w zakresie od 0,5 do 2 kHz zmiany we wzajemnych proporcjach poszczególnych składowych mocy widma (VLF, LF i HF) nie przekraczają 5%.

Ponadto określono rozkład ilościowy różnic czasowych pomiędzy kolejnymi RRi i wyznaczono dystrybuantę tego rozkładu przy wykorzystaniu oprogramowania Analiza-3E (inż. G. Redlarski). Po stwierdzeniu, że największe różnice pomiędzy grupami szczurów występują przy porównaniu odsetka różnic pomiędzy kolejnymi RRi w przedziale od 2 do 3 ms, obliczono wartości pNN2,5, określające odsetek różnic między kolejnymi RRi przekraczających 2,5 ms. Dla orientacyjnej oceny krótko- i długoterminowej HRV wykreślono krzywe Poincaré', które reprezentują korelację pomiędzy kolejnymi RRi<sup>414</sup>. Przez punkt reprezentujący średnie wartości  $RR_n$  i  $RR_{(n-1)}$  przeprowadzono tzw. linię identity położoną pod kątem  $45^\circ$  względem standardowych osi wykresu. Linia identity przechodzi przez punkty, dla których czas trwania aktualnego i następnego odstępu RR jest identyczny ( $(RRi)_n = (RRi)_{n-1}$ ). Wyznaczono różnice położenia poszczególnych punktów w stosunku do linii identity oraz względem prostej prostopadłej do tej linii, przeprowadzonej przez punkt reprezentujący średnie wartości  $RR_n$  i  $RR_{(n-1)}$ . Odchylenie standardowe puli punktów w płaszczyźnie prostopadłej do linii identity (SD1) odzwierciedla krótkoterminową HRV, podczas gdy odchylenie standardowe puli punktów w płaszczyźnie równoległej do prostej odniesienia (SD2) odpowiada długookresowej zmienności HRV. Oba odchylenia standardowe: SD1 i SD2 zostały naniesione na linię identity i prosta do niej prostopadła i zostały opisane elipsą, stanowiącą graficzny wyraz zmienności krótko- i długoterminowej HRV.

### 3.3. Doświadczenia na układzie izolowanych tętnic kręzkowych

#### 3.3.1. MATERIAŁ

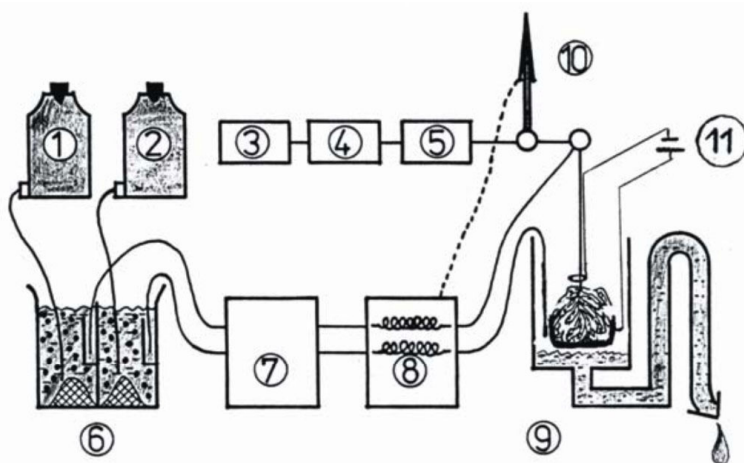
Doświadczenia przeprowadziłem na 194 preparatach izolowanego układu tętnic kręzkowych, wyizolowanych ze szczurów samców: z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym genetycznie (szczep SHR) i ich odpowiedników normotensyjnych (szczepu Wistar-Kyoto; WKY), o masie ciała od 233 do 420 g, które pochodziły z licencjonowanej hodowli (Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Hodowli Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź oraz Zwierzętnia Instytutu Medycyny Pracy, Łódź). Zwierzęta przechowywano w plastikowych klatkach w zwierzętni Katedry i Zakładu Fizjologii Akademii Medycznej w Gdańsku. W pomieszczeniu utrzymywano kontrolowaną temperaturę  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  i stałą dobową rytmikę oświetlenia: przez 12 godzin nocnych zwierzęta przebywały w ciemności, zaś w pozostałych 12 godzinach zwierzętnia była oświetlona. Szczury miały nielimitowany dostęp do paszy granulowanej i wody. Spośród szczurów szczepu WKY wyodrębniłem 2 grupy: WKY i LNR. Grupa LNR otrzymywała przez 30 dni inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS) L-nitroargininę (L-NNA), rozpuszczony w wodzie do picia. Stężenie L-NNA w wodzie pitnej dostosowywano do dziennego spożycia wody z dnia poprzedniego. Założono dzienną dawkę L-NNA  $0,1 \text{ mmol/kg}$  ( $21,92 \text{ mg/kg}$ ), zaś dawka ostateczna była nieco większa -  $0,104 \text{ mmol/kg}$ .

Preparaty izolowanych naczyń trzewnych wypreparowano według własnej metody, opracowanej w oparciu o model doświadczalny Mac Gregory'ego<sup>417</sup>. Zaprojektowałem i skonstruowałem oryginalny układ do perfuzji narządów izolowanych (ryc.9), umożliwiający jednoczesne wykonanie doświadczeń na 3 preparatach.

Zwierzęta usypiano pentobarbitem ( $60 \text{ mg/kg}$  i.p.). Po otwarciu jamy brzusznej, odsłaniałem aortę z początkowym odcinkiem tętnicy kręzkowej górnej. Tętnicę podwiązywałem, a następnie odcinałem jej odgałęzienia trzustkowo-dwunastnicze, krętnicze i okrężnicze. Po podwiązaniu aorty poniżej i powyżej odejścia tętnicy kręzkowej górnej, aortę nacinałem podłużnie i przez nacięcie wprowadzałem do początkowego odcinka tętnicy kręzkowej górnej kaniulę polietylenową (Surflo®-20G, Terumo Europe, Leuven, Belgia) wypełnioną heparynizowanym, 0,9% roztworem NaCl. Kaniulę zabezpieczałem przed przesuwaniem się w świetle naczynia poprzez założenie dwóch ściśle opasujących naczyń podwiązek. Naczynia trzewne wypełniałem 5 ml utlenowanego i ogrzanego do temperatury  $37^\circ\text{C}$  roztworu Krebsa, a następnie jelito cienkie odcinałem od dwunastnicy i jelita grubego, a całość izolowałem z otoczenia odcinając aortę bezpośrednio za podwiązkami oraz odseparowując tętnicę kręzkową górną z otaczających tkanek, po czym szczury skrwawiałem przez przecięcie aorty powyżej uprzednio założonej podwiązki. Następnie jelito cienkie starannie oddzielałem od krezki cięciem przeprowadzonym wzdłuż jej jelitowego brzegu. W ten sposób jedynie tętnice samej krezki mogły być perfundowane za pośrednictwem wprowadzonej kaniuli, co pozwoliło uniknąć błędów pomiarowych wynikających z interakcji między mięśniówką jelitową i naczyniową. Tak uzyskany preparat przymocowano za pośrednictwem trójnika do układu perfuzyjno-pomiarowego. Preparat umieszczono w ogrzewanym naczyniu inkubacyjnym, o pojemności 150 ml na siatce ze stali nierdzewnej, która pełniła rolę elektrody. Drugą elektrodę pierścieniową wykonaną srebra założono okrężnie wokół pnia tętnicy kręzkowej górnej, tak, aby ściśle przylegała do okołonaczyniowych włókien nerwowych. Obie elektrody były połączone ze stymulatorem elektrycznym generującym bodźce prądu stałego o

kształcie prostokątnym (Electronic square wave stimulator, Palmer, Londyn, Wielka Brytania).

Układ naczyniowy krezki perfundowano, przy użyciu pompy rolkowej (Zalimp typ 315, Warszawa) roztworem Krebsa o składzie (w mmol/l): NaCl – 112, KCl – 5,0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, NaHCO<sub>3</sub> – 25,0, D+/glukoza – 11,2 (pH = 7,40, osmolalność – 284 mOsm/kg H<sub>2</sub>O), o temperaturze 37 °C.



Preparat izolowanego układu tętnic krezkowych ułożony w układzie perfuzyjnym na elektrodzie z siatki stalowej

*View of the preparation of isolated mesenteric vessels placed onto a steel mesh electrode in the experimental setup*

1 – płyn perfuzyjny wieloelektrolitowy; 2 – płyn okołoperfuzyjny; 3 - rejestrator; 4 - wzmacniacz; 5 - czujnik ciśnieniowy; 6 - O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> układ natleniający; 7 – pompa rolkowa; 8 – łaźnia termostatowana; 9 – naczynie inkubacyjne; 10 – termometr; 11 – elektrody dwubiegunowe do stymulacji elektrycznej: elektroda pierścieniowa umieszczona na włóknach nerwowych okołonaczyniowych i elektroda odniesienia wykonana z siatki stalowej.

*1 - perfusing fluid; 2 - superfusing fluid; 3 - chart recorder; 4 - amplifier; 5 - pressure sensor; 6 - O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> bubbling system; 7 - roller pump; 8 - thermostat bath; 9 - incubation chamber; 10 - thermometer; 11 - bipolar electrodes for electrical stimulation: a ring one placed onto periarterial nerves and a steel mesh reference one.*

Ryc. 9. Układ doświadczalny do perfuzji i stymulacji elektrycznej krezki

*Fig. 9. The experimental setp for perfusion and electrical stimulation of mesentery*

Do naczynia inkubacyjnego doprowadzony był dodatkowy podajnik z płynem Krebsa, który wykorzystywano do doraźnego przepłukania preparatu. Roztwory przygotowywano na świeżo przed każdym doświadczeniem, zaś przed dopłynięciem do preparatu oba płyny były wysycane mieszanką gazową, zawierającą 95% tlenu i 5 % dwutlenku węgla.

Przy zadanej, stałej szybkości perfuzji – 18 ml/min, płyn perfuzyjny przepływał przez kolejne odgałęzienia tętnicy krezkowej górnej i wypływał swobodnie przez odcięte

przy brzegu jelitowym krezki końce naczyń. Przy stałym wydatku pompy perystaltycznej zmienną, która odzwierciedla opory przepływu i efekty napięcie mięśniówki naczyniowej było ciśnienie perfuzyjne (PP), które rejestrowano przez cały okres eksperymentu przy pomocy czujnika tensometrycznego o wysokiej czułości (Statham 23Db, Oxnard, USA). Pompa perystaltyczna pracowała w trybie pulsacyjnym, co przyczyniało się do rytmicznych zmian PP o maksymalnej amplitudzie  $\pm 2$  mm Hg. Niewielka amplituda pulsacji ciśnieniowej była wynikiem modułu powietrzni zainstalowanego w górnej części układu do perfuzji narządów izolowanych. Wymuszona przez pompę perfuzja imitowała warunki przepływu krwi *in vivo*, a w szczególności pulsacyjny charakter obciążenia ciśnieniowego śródbłonna naczyniowego. Rejestrowany podczas doświadczeń wzrost PP pod wpływem testowanych czynników był wykładnikiem odpowiedzi skurczowej mięśniówki gładkiej naczyń tętniczych, zaś obniżenie PP odpowiadało odpowiedzi wazorelaksacyjnej. Czujnik tensometryczny był połączony z jednokanałowym rejestratorem (LKB S-16125 Bromma, Kipp and Zonen, Delft, Holandia) za pośrednictwem wzmacniacza tensometrycznego (TT-6c, Zelmed, Polska), a także z komputerem za pośrednictwem zestawu do akwizycji danych (UNI-BIO system, Kared, Gdańsk). Ponadto, elementem układu pomiarowego był manometr rtęciowy, przy użyciu którego kalibrowano układ rejestrujący przed rozpoczęciem każdego doświadczenia.

W pierwszych kilkunastu minutach od rozpoczęcia perfuzji obserwowano znaczne wahania PP. Po około 10 - 20 min od początku perfuzji opór preparatu stabilizował się, a podstawowe ciśnienie perfuzyjne wynosiło od 30 do 56 mm Hg. Po 30 min od rozpoczęcia perfuzji przystępowano do właściwego eksperymentu, zgodnie z przyjętym schematem doświadczalnym. W wykonanych kilkunastu doświadczeniach o charakterze pilotowym nie wykazano różnic odpowiedzi naczynioruchowych na testowe iniekcje różnych preparatów izolowanych naczyń trzewnych na początku i po 6 godzinach perfuzji. Przed i po każdym doświadczeniu preparaty były ważone. Przyrost masy większy niż 10% był traktowany jako wyznacznik obrzęku okołonaczyniowego i preparaty te nie były uwzględniane w dalszej analizie danych (N = 2).

Zastosowano 6 procedur eksperymentalnych.

### 3.3.2. METODYKA EKSPERYMENTALNA

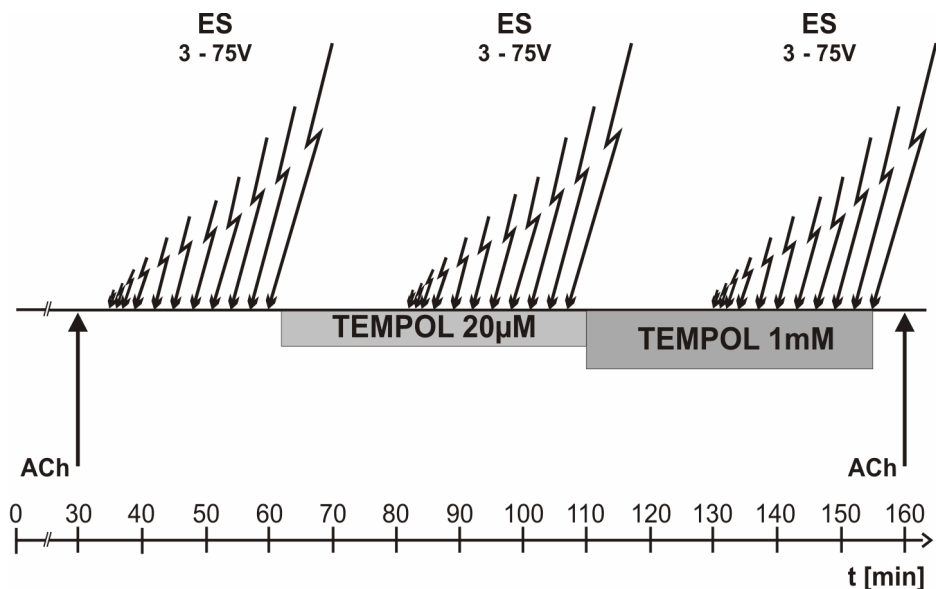
#### PROCEDURA 3.3.2.1.

Celem doświadczeń było porównanie wpływu tempola na przebieg krzywych typu dawka-odpowiedź wyznaczonych z zależności między napięciem bodźców elektrycznych i wywołaną odpowiedzią naczyniokurczącą w preparatach krezki pochodzących od szczurów (233 – 295 g): normotensyjnych – WKY (N = 4) oraz z nadciśnieniem tętniczym: samoistnym (SHR; N = 4) i wywołanym przez zahamowanie endogennej syntazy NO (LNR; N = 4).

Po 30 minutach od rozpoczęcia perfuzji do preparatu podawano przez trójnik acetylocholinę (ACh) w dawce 1  $\mu$ g. Obserwowano krótkotrwałe obniżenie PP, co było wskaźnikiem zachowanej funkcji śródbłonna naczyniowego. Preparaty grupy WKY i SHR, u których obniżenie PP było mniejsze niż 2 mm Hg, a grupy LNR < 0,5 mm Hg, były wyłączone z dalszej części doświadczenia. Trzykrotnie, w odstępach 20-minutowych przeprowadzono identyczną sekwencję stymulacji elektrycznej: przez i podczas perfuzji roztworami tempola (kolejno 20  $\mu$ mol/l i 1 mmol/l). Preparaty były drażnione 30-sekundowymi seriami bodźców elektrycznych o częstotliwości 20 Hz

(impulsy prostokątne 3 ms) w zakresie od 3 do 75 V. Sekwencja czasowa była następująca: 3 V: 0 - 30 s, 5 V: 60 - 90 s, 8 V: 90 - 120 s, 10 V: 240 - 270 s, 15 V: 420 - 450 s, 20 V: 600 - 630 s; 25 V: 780 - 810 s, 30 V: 960 - 990 s, 40 V: 1140 - 1170 s, 50 V: 1320 - 1350 s, 75 V: 1500 - 1530 s. Perfuzję kolejnymi stężeniami tempola rozpoczynano bezpośrednio po zakończeniu odpowiedzi naczyniokurczącej na ostatni z bodźców elektrycznych w danej serii. Dla orientacyjnej oceny funkcji śródbłonna naczyniowego pod koniec doświadczenia ponownie wstrzyknięto testową dawkę 1  $\mu\text{g}$  ACh. Schemat doświadczenia przedstawiono na ryc.10

Miarą obkurczenia mięśniówki gładkiej tętnic preparatu był wzrost ciśnienia perfuzyjnego (PP). Krzywe reprezentujące przyrost PP jako funkcję napięcia bodźca wyznaczono przy użyciu oprogramowania Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA). Jako kryterium optymalnego wyboru typu krzywej i jej przebiegu przyjęto najmniejszą sumę kwadratów różnic pomiędzy rzeczywistymi punktami pomiarowymi i korespondującymi punktami w uzyskanych krzywych, co odpowiadało najwyższej wartości współczynnika determinacji  $r^2$ . Z wyznaczonych krzywych obliczono: wartość maksymalnej odpowiedzi naczyniokurczącej na stymulacje elektryczną ( $PP_{\text{max}}$ ), napięcie bodźca wywołujące połowę maksymalnego wzrostu PP ( $V_{50}$ ), wrażliwość naczyń na bodźce elektryczne, definiowaną jako największy przyrost PP przypadający na jednostkę napięcia -  $(dP/dV)_{\text{max}}$ , a także przeciętny przyrost PP przypadający na jednostkę napięcia w przedziale odpowiedzi naczyniokurczącej ( $\Delta PP$ ) odpowiadającej 10 - 90 % całkowitego zakresu tej odpowiedzi.



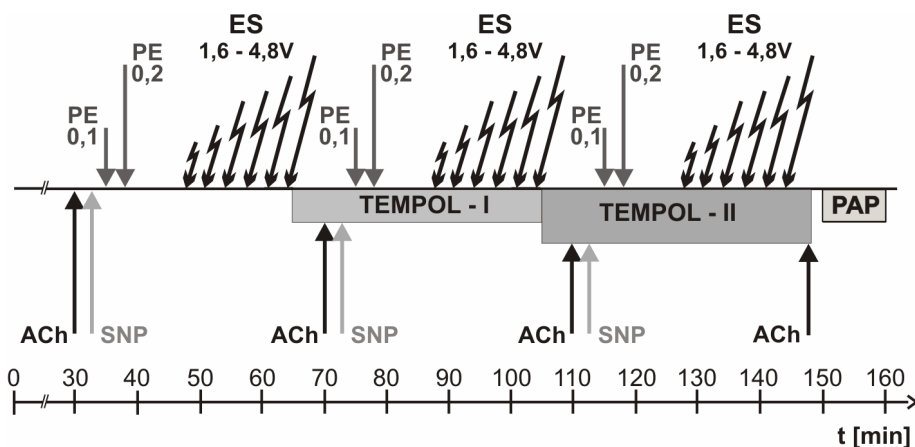
Ryc. 10. Procedura doświadczenia 3.3.2.1.

Fig. 10. The experimental procedure 3.3.2.1.

### PROCEDURA 3.3.2.2

Celem doświadczeń było wyznaczenie wpływu tempola na próg pobudliwości mięśniówki naczyniowej na stymulację elektryczną w preparatach krezki pochodzących od szczurów (305 – 420 g): normotensyjnych (WKY, N =12;) oraz z nadciśnieniem tętniczym: samoistnym (SHR; N = 12) i wywołanym przez zahamowanie endogennej syntazy NO (LNR; N = 12). Miarą progu pobudliwości było najmniejsze napięcie stymulacji elektrycznej, które wywoływało wyraźny wzrost PP ( $\Delta PP \geq 0,5$  mm Hg). Ponadto przedmiotem porównawczej analizy była odpowiedź naczynioruchowa wywołana podaniem testowych dawek (0,1 i 0,2 ng) fenylefryny (PE), acetylocholino (1  $\mu$ g) i nitroprusydku sodowego (SNP, 1  $\mu$ g).

Po 30 minutach od rozpoczęcia perfuzji do preparatu podawano acetylocholinę (ACh) w dawce 1  $\mu$ g poprzez trójnik, a następnie wstrzykiwano: w 32 min – SNP (1  $\mu$ g), w 35 min – PE (0,1 ng) i w 38 min – PE (0,2 ng). Wywołane odpowiedzi naczynioruchowe trwały od kilkunastu do kilkudziesięciu sekund, stąd też każdy kolejny czynnik był podany po zakończeniu reakcji na poprzedni. Od 48 min doświadczenia preparaty były pobudzane 30-sekundowymi seriami bodźców elektrycznych (3 ms, 20 Hz), o stopniowo wzrastającym napięciu od 1,6 V, ze skokiem 0,2 V. Dalszej stymulacji elektrycznej nie kontynuowano po stwierdzeniu pozytywnej odpowiedzi, przejawiającej się wzrostem PP w czasie kolejnych dwóch stymulacji. Za próg pobudliwości przyjąłem wartość napięcia wywołującego pierwszą z odpowiedzi pozytywnych. Sekwencję stymulacji elektrycznej poprzedzoną podaniem testowych dawek PE powtórzono dwukrotnie, w odstępach 28-minutowych, podczas perfuzji roztworami tempola o wzrastającym stężeniu. W każdym doświadczeniu zastosowano dwa z czterech testowanych stężeń tempola (5, 20, 100  $\mu$ mol/l i 1 mmol/l). Dwie min. po zakończeniu odpowiedzi naczyniokurczącej na ostatnią serię bodźców elektrycznych podawano ACh – 1 $\mu$ g w celu wywołania krótkotrwałego obniżenia PP, zaleźnego od śródbłonna naczyniowego. Pod koniec doświadczenia przeprowadzono 10-min perfuzję roztworem papaweryny (100 mg/l) w 0,9%NaCl. Najniższe PP zarejestrowane na tle papaweryny odpowiadało maksymalnemu zwiotczeniu mięśniówki gładkiej naczyń. Różnica między PP przed pierwszą serią bodźców elektrycznych a minimalnym PP na tle papaweryny jest miarą napięcia czynnego mięśniówki gładkiej naczyń (AVT). Schemat doświadczenia ilustruje ryc. 11



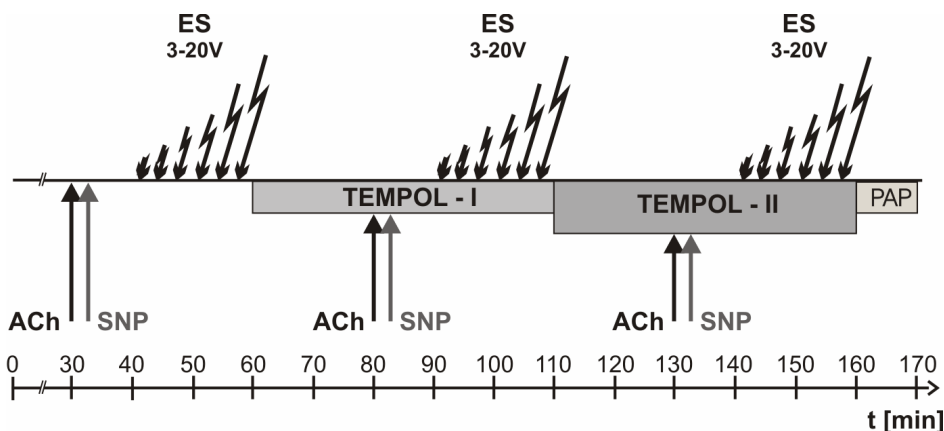
Ryc. 11. Procedura doświadczenia 3.3.2.2.

Fig. 11. The experimental procedure 3.3.2.2.

### PROCEDURA 3.3.2.3

Celem doświadczeń była analiza wpływu tempola na charakterystykę ilościową odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną, w preparatach krezki pochodzących od szczurów (288 – 402 g): normotensyjnych – WKY (N = 16) oraz z nadciśnieniem tętniczym: samoistnym (SHR; N = 13) i wywołanym przez zahamowanie endogennej syntazy NO (LNR; N = 12). Przedmiotem oceny była również odpowiedź naczynioruchowa wywołana podaniem acetylocholiny (ACh, 1  $\mu$ g) i nitroprusydku sodowego (SNP, 1  $\mu$ g).

Założono, że zakres testowanych bodźców elektrycznych odpowiadał w przybliżeniu przedziałowi od 10 do 90% całkowitego zakresu wywoływanych reakcji naczyniowych. Po 30 minutach od rozpoczęcia perfuzji do preparatu podawano acetylocholinę (ACh) w dawce 1  $\mu$ g poprzez trójnik, a następnie wstrzykiwano: w 32 min – SNP (1  $\mu$ g). Wywołane odpowiedzi naczynioruchowe trwały od kilkunastu do kilkudziesięciu sekund, stąd też każdy kolejny czynnik był podany po zakończeniu reakcji na poprzedni. Następnie preparaty były pobudzane 30-sekundowymi seriami bodźców elektrycznych (4 ms, 10 Hz), o stopniowo wzrastającym napięciu wg schematu: 42 min – 3 V, 45 min – 5 V, 48 min – 8 V, 51 min – 10 V, 54 min – 15 V i 57 min – 20 V. Sekwencję stymulacji elektrycznej poprzedzoną podaniem testowych dawek ACh i SNP powtórzono dwukrotnie, w odstępach 50-minutowych, podczas perfuzji roztworami tempola o wzrastającym stężeniu. W każdym doświadczeniu zastosowano dwa z czterech testowanych stężeń tempola (5, 20, 100  $\mu$ mol/l i 1mmol/l). Pod koniec doświadczenia przeprowadzono 10-min perfuzję roztworem papaweryny (100 mg/l) w 0,9%NaCl. Najniższe PP zarejestrowane na tle papaweryny odpowiadało maksymalnemu zwiotczeniu mięśniówki gładkiej naczyń. Różnica między PP w przed pierwszą serią bodźców elektrycznych a minimalnym PP na tle papaweryny jest miarą napięcia czynnego mięśniówki gładkiej naczyń (AVT). Schemat doświadczenia ilustruje ryc. 12.



Ryc. 12. Procedura doświadczalna 3.3.2.3.

Fig. 12. The experimental procedure 3.3.2.3.

W odpowiedzi naczyniokurczącej wyszczególniono dwie fazy: narastanie odpowiedzi i jej zanik, wyznaczając dla każdej z faz odmienne przebiegi funkcji. Wyznaczono



amplitudę odpowiedzi, maksymalną szybkość jej narastania, kinetykę zaniku. Krzywe reprezentujące przyrost PP jako funkcję napięcia bodźca wyznaczono przy użyciu oprogramowania Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA). Jako kryterium optymalnego wyboru typu krzywej i jej przebiegu przyjąłem najmniejszą sumę kwadratów różnic pomiędzy rzeczywistymi punktami pomiarowymi i korespondującymi punktami uzyskanych krzywych, co odpowiadało najwyższej wartości współczynnika determinacji  $r^2$ . Maksymalną amplitudę odpowiedzi naczyniokurczącej oraz maksymalną szybkość jej narastania ( $dP/dt - \max$ ) wyznaczyłem z krzywej logistycznej o wzorze ogólnym:

$$Y = \frac{x_{\max}}{1 + 10^{[(\log EC50 - x) \cdot k]}}$$

gdzie  $x_{\max}$  jest napięciem bodźca wywołującym maksymalny wzrost PP, EC50 – odpowiada napięciu wywołującemu połowę maksymalnej odpowiedzi naczyniokurczącej, a współczynnik  $k$  odpowiada nachyleniu środkowego odcinka krzywej logistycznej.

Zanik odpowiedzi miał charakter wykładniczy o wzorze ogólnym:

$$Y = Y_0 \cdot e^{-kt}$$

gdzie  $Y_0$  odpowiada PP odpowiedzi naczyniokurczącej,  $k$  jest stałą zaniku, a  $t$  odpowiada czasowi od rozpoczęcia zaniku.

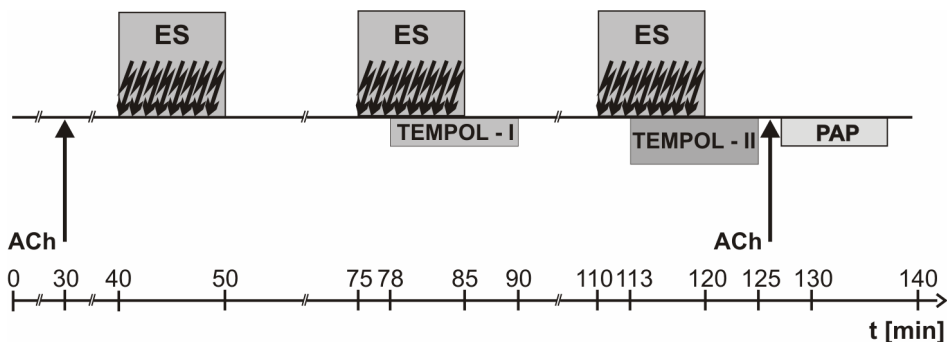
Z przebiegu uzyskanych krzywych zaniku wyznaczono: pole powierzchni zaniku, całkowity czas zaniku, czas połowicznego zaniku ( $t_{1/2}$ ), czas 90% zaniku ( $t_{90\%}$ ). Obliczono pola powierzchni poszczególnych faz odpowiedzi naczyniowej. Przez zsumowanie pola narastania odpowiedzi (DevA) i pola zaniku (DecA) wyznaczono całkowite pole odpowiedzi naczyniokurczącej (TA), jako wykładnik obciążenia ciśnieniowego łożyska naczyniowego po zastosowaniu pojedynczego bodźca elektrycznego.

#### PROCEDURA 3.3.2.4

Doświadczenia były ukierunkowane na ujawnienie ewentualnego wazorelaksacyjnego wpływu tempola w warunkach zwiększonego napięcia czynnego mięśniówki naczyniowej. Izolowany układ tętnic krezkowych charakteryzuje stosunkowo niewielkie, kilkumilimetrowe (mm Hg) spoczynkowe napięcie czynne. Utrudnia to ujawnienie efektu rozkurczającego naczynia, gdyż zakres takiej odpowiedzi jest w założeniu niewielki. Znacznie lepsze warunki do zaobserwowania efektu wazorelaksacyjnego występują przy zwiększonym napięciu czynnym mięśniówki naczyniowej. W celu uzyskania stabilnego wzrostu PP, o około 10 - 20 mm Hg, zastosowano przedłużoną, 10-minutową stymulację elektryczną seriami bodźców elektrycznych (8 V, 3 ms, 20 Hz). Stymulację wykonywano trzykrotnie, w odstępach 25-minutowych: przed i podczas perfuzji roztworami tempola (0,02 i 1 mmol/l), w 3 grupach doświadczalnych (szczury: 266 - 310 g): WKY (N = 4), SHR (N = 4) i LNR (N = 4).

W 30-tej i 95-tej minucie od rozpoczęcia perfuzji do preparatów podano ACh (1  $\mu$ g) dla orientacyjnej oceny funkcjonowania śródbłonna naczyniowego.

Schemat doświadczenia przedstawiono na ryc. 13



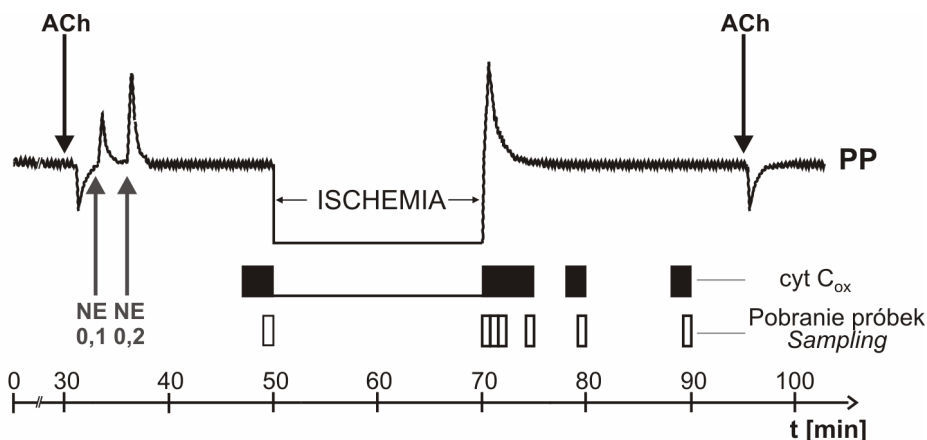
Ryc.13. Procedura doświadczalna 3.3.2.4.

Fig.13. The experimental procedure 3.3.2.4.

### PROCEDURA 3.3.2.5

Celem doświadczeń było porównanie wpływu tempola na uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot -}$ ) do płynu perfuzyjnego przez układ naczyń tętniczych krezki w warunkach standardowych oraz po ischemii, w preparatach uzyskanych od szczurów (338 – 415 g) : WKY (N = 20), SHR (N = 20) i LNR (N = 20). W każdej z grup preparatów wyodrębniono 4 niezależne podgrupy (N = 5) różniące się stężeniem tempola w płynie perfuzyjnym: 0 (kontrola danej grupy) 0,01, 0,1 i 1 mmol/l.

Po 30 i 95 min. od rozpoczęcia perfuzji testowano efekt wazorelaksacyjny pojedynczych dawek ACh (1  $\mu$ g). W 33 i 36 min. eksperymentu podano kolejno po sobie dwie dawki NE: 0,1 i 0,2 ng. Pomiędzy 50 a 70 min. doświadczenia perfuzję całkowicie wstrzymano, zapewniając warunki globalnej ischemii. Płyn perfuzyjny docierał do preparatów przez 2 dwa układy doprowadzające: główny, o wydatku 17 ml/min (pompa rolkowa, Zalimp typ 315, Warszawa) oraz dodatkowy o szybkości podawania 1 ml/min (pompa infuzyjna, Dialyse F5z, Dascon, Holandia). Przed dopłynięciem do preparatu oba płyny mieszały się z sobą. Przez dodatkowy układ doprowadzający tłoczony był identyczny płyn perfuzyjny, jak dostarczany przez zasilanie główne, lub alternatywnie płyn Krebsa zawierający ferricytochrom c ( $cytc_{ox}$ ; 15  $\mu$ mol/l) i katalazę (CAT: 660 jedn./ml). Roztwór zawierający  $cytc_{ox}$  i CAT stosowano w: 47 – 50, 78 – 80 i 88 – 90 min doświadczenia, czyli w okresie 3 minut poprzedzających ischemię oraz pięciu min po jej zakończeniu, a także pomiędzy 8 – 10 i 18 – 20 min. reperfuzyjii. Pobierano próbki płynu wypływającego z preparatu w odstępach 45-sekundowych i po ich przefiltrowaniu z użyciem filtrów o średnicy 5  $\mu$ m umieszczano w kuwecie pomiarowej. Generację anionorodnika ponadtlenkowego oceniano metodą spektrofotometryczną Southwortha<sup>418</sup> (spektrofotometr Cecil 9200 Super Aquarius; Cambridge, Wielka Brytania), przy długości fali 550 nm w temperaturze 22° C.



Ryc. 14. Procedura doświadczenia 3.3.2.5.  
 Fig. 14. The experimental procedure 3.3.2.5.

Porównano absorbancję próbek zebranych przed perfuzją i po przepłynięciu płynu perfuzyjnego przez preparat. Przyrost absorbancji po przepłynięciu przez preparat jest miarą redukcji cytochromu c wskutek jego reakcji z anionorodnikiem, wytwarzanym w świetle naczyń.

Reakcja cytochromu c z anionorodnikiem ponadtlenkowym zachodzi w sposób stechiometryczny, w proporcji 1 : 1. Produktami są:  $O_2$  i zredukowany cytochrom c. Ilość anionorodnika ponadtlenkowego wytworzonego w preparacie naczyniowym obliczono przy wykorzystaniu współczynnika absorbancji  $21 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  <sup>419</sup>

Przedmiotem oceny były także zmiany ciśnienia perfuzyjnego obserwowane bezpośrednio po zakończeniu ischemii, a także przebieg odpowiedzi naczyniokurczących na noradrenalinę (NE). Kinetykę zaniku odpowiedzi naczyniokurczących na NE i ischemię analizowano przy użyciu oprogramowania Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA).

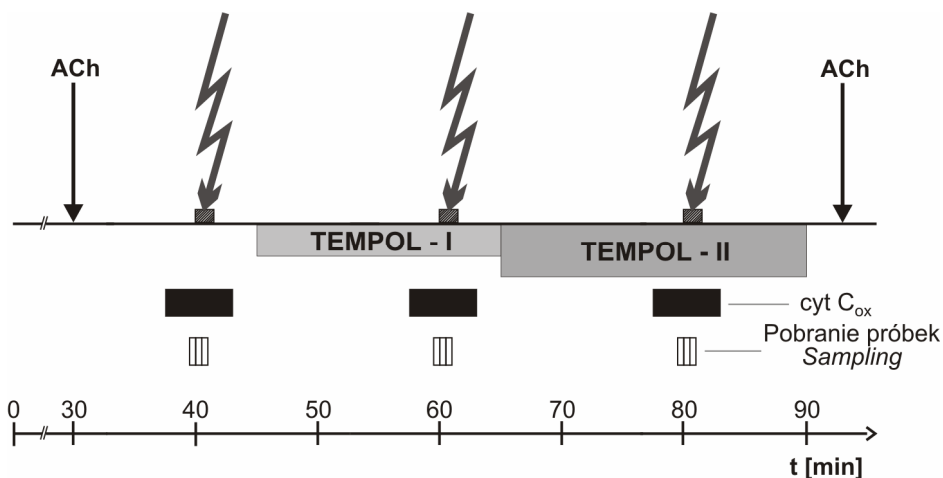
Schemat doświadczenia przedstawiono na ryc.14.

### PROCEDURA 3.3.2.6

Celem doświadczeń była ocena wpływu tempola na uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot -}$ ) do płynu perfuzyjnego podczas stymulacji elektrycznej preparatów tętnic krezkowych uzyskanych od szczurów (323 – 398 g): WKY (N = 9), SHR (N = 9) i LNR (N = 9).

Po 30 i 93 min od rozpoczęcia perfuzji testowano efekt wazorelaksacyjny pojedynczych dawek ACh (1  $\mu\text{g}$ ). Trzykrotnie, w 40, 60 i 80 min doświadczenia przeprowadzono 90-sekundową stymulację preparatu krezkowego seriami bodźców elektrycznych (5 V, 4 ms, 10 Hz).

Podczas pierwszej stymulacji elektrycznej preparat krezkowy był perfundowany rutynowym płynem Krebsa, natomiast w przedziale czasowych 45 – 65 min. i 65 – 90 min perfuzyjny zawierał tempol.



Ryc. 15. Procedura doświadczalna 3.3.2.6.  
 Fig. 15. The experimental procedure 3.3.2.6.

Stosowano 3 stężenie tempola: 0,01; 0,1 i 1 mmol/l, po dwa w każdym doświadczeniu. Pierwsze z zastosowanych stężeń zawsze było niższe. Płyn perfuzyjny docierał do preparatów przez 2 dwa układy doprowadzające: główny, o wydatku 17 ml/min (pompa rolkowa, Zalimp typ 315, Warszawa) oraz dodatkowy o szybkości podawania 1 ml/min (pompa infuzyjna, Dialyse F5z, Dascon, Holandia). Przed dopłynięciem do preparatu oba płyny mieszały się z sobą. Przez dodatkowy układ doprowadzający tłoczony był identyczny płyn perfuzyjny, jak dostarczany przez zasilanie główne, lub alternatywnie płyn Krebsa zawierający ferricytochrom c (cytC<sub>ox</sub>; 15 μmol/l) i katalazę (660 jedn./ml). Roztwór zawierający cyt<sub>ox</sub> i CAT stosowano bezpośrednio przed, w trakcie i bezpośrednio po stymulacji elektrycznej, między: 37'30'' – 43', 57'30'' – 63' oraz 77'30'' – 83' od rozpoczęcia perfuzji. Pobierano próbki płynu wypływającego z preparatu w odstępach 45-sekundowych i po ich przefiltrowano z użyciem filtrów o średnicy 5 μm umieszczano w kuwecie pomiarowej.

Generację anionorodnika ponadtlenkowego oceniano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr Cecil 9200 Super Aquarius; Cambridge, Wielka Brytania), przy długości fali 550 nm w temperaturze 22°C<sup>420</sup>.

Schemat doświadczenia przedstawiono na ryc.15

### 3.3.2.7. Procedury uzupełniające

#### Wyznaczenie krzywej kalibracji absorbancji ferricytochromu c w płynie Krebsa

W celu dobrania optymalnego stężenia ferricytochromu c do oceny wytwarzania anionorodnika w płynie perfuzyjnym wykonano krzywą kalibracyjną (N = 3). Wyznaczono spektrofotometrycznie absorbancję przy długości fali 550 nm w próbkach zawierających różne stężenia cytochromu c (μmol/l): 2,5, 5, 10, 20 i 50 rozpuszczonego w płynie perfuzyjnym. Pomiary wykonywano dwukrotnie w odstępach 10-minutowych, w standardowym płynie Krebsa i w płynie Krebsa zawierającym katalazę (660 jedn/ml).

### 3.3.2.7.2. Wpływ katalazy na absorbancję ferrytocyochromu c w płynie Krebsa

Roztwory cytochromu c w płynie wieloelektrolitowym przygotowane z odczynnika zawierającego niemal wyłącznie jego postać utlenioną (ferrytocyochrom c,  $\text{cytc}_{\text{ox}}$ ) w praktyce są mieszaniną zawierającą w przeważającej mierze  $\text{cytc}_{\text{ox}}$ , ale także pewną domieszkę postaci zredukowanej (ferrocycyochrom,  $\text{cytc}_{\text{red}}$ ). Anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) redukuje  $\text{cytc}_{\text{ox}}$ , powodując zwiększenie absorbancji roztworu, natomiast nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) utlenia postać zredukowaną zmniejszając absorbancję. *In vitro* w temperaturze pokojowej dochodzi w niewielkim stopniu do spontanicznej autooksydacji wody do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , z kolei anionorodnik ponadtlenkowy generowany w świetle naczyń krwionośnych łatwo ulega dysmutacji, z wytworzeniem  $\text{H}_2\text{O}_2$  i tlenu cząsteczkowego –  $\text{O}_2$ . Wytwarzanie  $\text{H}_2\text{O}_2$  powoduje zmniejszenie absorbancji roztworu cytochromu c i może skutecznie zakłócać detekcję  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Dodanie katalazy (CAT) do roztworu, enzymu katalizującego reakcję dysmutacji  $\text{H}_2\text{O}_2$  do wody i tlenu cząsteczkowego, miało w założeniu zapobiegać zakłóceniu pomiaru  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Wykonano 4 doświadczenia ( $N = 8$ ), w których wyznaczono spektrofotometrycznie absorbancję przy długości fali 550 nm w próbkach zawierających cytochrom c (15  $\mu\text{mol/l}$ ) rozpuszczony w płynie perfuzyjnym natlenowanym mieszaną 95% $\text{O}_2$  / 5% $\text{CO}_2$  bezpośrednio przed oznaczeniami. Wykonano pomiary w płynie perfuzyjnym: standardowym, zawierającym nadtlenek wodoru (1 mmol/l), zawierającym CAT (660 jedn./ml) oraz zawierającym CAT (660 jedn./ml) i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mmol/l).

### 3.3.2.7.3. Analiza udziału komponenty adrenergicznej w reakcji naczyniokurczącej obserwowanej bezpośrednio po zakończeniu ischemii.

W celu przetestowania hipotezy, że krótkotrwała reakcja naczyniokurcząca zachodząca bezpośrednio po zakończeniu ischemii preparatu krezkowego może mieć podłoże adrenergiczne wykonano 3 identyczne doświadczenia, na preparatach tętnic krezkowych uzyskanych ze szczurów szczepu Wistar (Hodowla Zwierząt Doświadczalnych, Warszawa). Po 30-minutowej wstępnej perfuzji roztworem Krebsa z prazosyną (1  $\mu\text{mol/l}$ ), wstrzymywano przepływ płynu perfuzyjnego przez 20 min (ischemia), po czym wznowiano perfuzję przez kolejnych 5 min. Przedmiotem analizy było PP po zakończeniu ischemii.

## 3.3.3. OZNACZANIE CZYNNOŚCI ODDECHOWEJ MITOCHONDRIOW

### 3.3.3.1. Izolacja mitochondriów z serca

Po zrealizowaniu Procedury 3.2.2.3, szczury uśmiercano przez dekapitację i natychmiast przystępowano do izolacji mitochondriów, której dokonywano przed upływem dwóch godzin. Po przepłukaniu w izotonicznym buforze (PBS), serca starannie cięto na drobne fragmenty przy użyciu nożyczek okulistycznych i zawieszono w środowisku homogenizacyjnym o pH 7,4 zawierającym (BSE): mannitol (225 mM), sacharozę (75 mM), EGTA (1 mM), Tris-HCl (10mM). Rozdrobnione serca pochodzące z trzech szczurów tej samej grupy doświadczalnej umieszczano w jednej próbówce grubościennnej. Po wstępnym rozdrobnieniu przy użyciu homogenizatora elektrycznego (Biospec Products Inc., USA) w pięciu 20-sekundowych cyklach przy 2000 obrotach / min., dalszą homogenizację przeprowadzono manualnie przy zastosowaniu homogenizatora ze

szkła kwarcowego ze ściśle dopasowanym tłokiem teflonowym. Uzyskanego homogenat miareczkowano przez dodawanie Tris-HCl do uzyskania pH 7,2, a następnie wirowano przez 3 min przy 400g. Do uzyskanego osadu dodawano 2 ml BSE i po wymieszaniu, tak uzyskaną zawiesinę ponownie wirowano przez 3 min przy 400g. Po zmieszaniu supernatantów pochodzących z pierwszego i drugiego wirowania, poddawano je wirowaniu przez 11 min przy 10 000 g. Uzyskany osad mitochondriów trzykrotnie płukano przez umieszczenie w roztworze KCl (150 mM) i Tris-HCl (10 mM) o pH 7,4, a następnie odwirowanie osadu przez 11 min przy 10 000g. Ostateczny osad mitochondriów zawieszono w roztworze KCl (150mM) i Tris (10mM) z dodatkiem 0,5% BSA. Zawartość białka w mitochondriach oceniano metodą Lowry'ego<sup>421</sup>, przy wykorzystaniu BSA jako standardu.

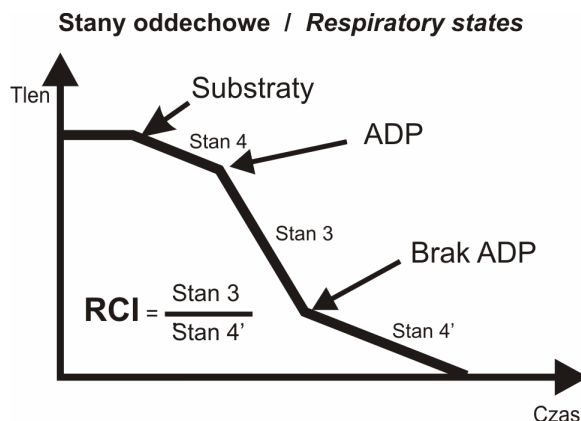
### 3.3.3.2. Izolacja mitochondriów z mięśnia szkieletowego

Po wycięciu obu mięśni brzuchatych łydki dokonywano przed upływem 2 godzin izolacji mitochondriów, której dokonywano przed upływem dwóch godzin. Po przepłukaniu w izotonicznym buforze (PBS), i usunięciu otaczających tkanek mięśnie pocięto na drobne fragmenty przy użyciu skalpela i nożyczek okulistycznych i zawieszono w środowisku homogenizacyjnym o pH 7,4 zawierającym (BSE): mannitol (225 mM), sacharozę (75 mM), EGTA (1 mM), Tris-HCl (10mM). Dalsza przebieg izolacji mitochondriów nie różnił się od zastosowanego przy uzyskiwaniu mitochondriów sercowych. Zawartość białka w mitochondriach oceniano metodą Lowry'ego<sup>421</sup>, przy wykorzystaniu BSA jako standardu.

### 3.3.3.3. Oznaczanie aktywności oddechowej mitochondriów

Aktywność oddechową mitochondriów oceniano metodą polarograficzną przy użyciu elektrody tlenowej Clarka (Gilson Polarograph, USA). Środowisko oddechowe o pH 7,4 i objętości 2 ml zawierało sacharozę (200 mM), KCl (15 mM), fosforan potasowy (5mM), EDTA 0,1 mM i 0,1% BSA. Jako substraty oddechowe NAD-zależne wykorzystano 5mM pirogronian i jabłczan, zaś FAD-zależne: 5 mM bursztynian (mitochondria sercowe), lub bursztynian z glutaminianem (mitochondria z mięśnia brzuchatego łydki).

Szybkość zużycia tlenu i iloraz ADP/O obliczono metodą Estabrooka<sup>422</sup> z zapisów uzyskanych przy użyciu elektrody tlenowej. Przy określaniu szybkości zużycia tlenu wyodrębniono stany oddechowe: stan 3, reprezentujący maksymalne zużycie tlenu w obecności substratów FAD- lub NAD-zależnych i ADP oraz stan 4', odpowiadający zużyciu tlenu po wyczerpaniu ADP (ryc. 16). Za wykładnik kontroli oddechowej przyjęto współczynnik oddechowy (RCI), który jest ilorazem zużycia tlenu w stanie 3 i w stanie 4'.



Ryc. 16. Wyznaczanie współczynnika oddechowego (RCI)  
 Fig. 16. Determination of the respiratory control index (RCI)

### 3.3.3.4. Oznaczenie aktywności enzymów mitochondrialnych

Aktywność syntazy cytrynianowej (CS) i oksydazy cytochromu c (COX) oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu spektrometru Cecil 9200 Super Aquarius (Cambridge, Anglia) w 10% homogenatach tkankowych oraz w mitochondriach. Aktywność CS wyznaczano wg metody Świerczyńskiego i wsp.<sup>423</sup>, zaś COX metodą Whartona i Tzagalloffa<sup>424</sup>. W metodzie oznaczania aktywności COX przedmiotem pomiaru jest utlenianie cytochromu C przez elektrony przepływające przez COX. Przed oznaczeniem cytochrom c utleniony był redukowany przy użyciu askorbinianu sodowego w 10 mM buforze fosforanowym. Procent zredukowanego cytochromu c obecnego w roztworze wyznaczano przy długości fali 550/566 nm.

### 3.3.3.5. Obliczanie gęstości tkankowej mitochondriów

Gęstość tkankową mitochondriów (ATMD) wyznaczono przez porównanie stężeń enzymatycznych markerów aktywności mitochondriów CS i COX w homogenacie tkankowym i w mitochondriach<sup>425,426</sup>. ATMD wyznaczono w mg białka mitochondrialnego przypadającego na gram mokrej tkanki określając wartość ilorazu aktywności testowanego enzymu (CS, lub COX) w homogenacie tkankowym [nmol/min/g tkanki] i w mitochondriach [nmol/min/mg białka mitochondrialnego]<sup>425</sup>. ATMD określoną przy użyciu CS (ATMD<sub>CS</sub>) uznałem jako wartość odniesienia w ocenie tkankowej aktywności mitochondriów. Różnice w wartościach ATMD<sub>CS</sub> i ATMD wyznaczonej przez pomiar aktywności COX (ATMD<sub>COX</sub>) przyjąłem jako orientacyjny wykładnik stresu oksydacyjnego w mitochondriach, przy założeniu, że COX jest bardziej podatna na uszkodzenia oksydacyjne od SC. Dla ułatwienia porównań, wartości ATMD, pierwotnie oznaczone w mg białka mitochondrialnego przypadającego na gram mokrej tkanki, zostały przedstawione w jednostkach względnych, odnoszących się do ATMD grupy referencyjnej: szczurów WKY nietrenowanych, które nie otrzymywały tempola (grupa WKYs-C).

### 3.3.5. ODCZYNNIKI

W badaniach zastosowano standardowe odczynniki o najwyższym dostępnym stopniu czystości. Pochodzenie testowanych substancji wyszczególniono w opisie procedur doświadczalnych. L-nitroargininę (L-NNA) i katalazę zakupiono w firmie Sigma (Sigma Polska). Tempol (2,2,6,6-tetrametylopiperdydno-N-tlenek) zsyntetyzowano metodą Rozantseva<sup>427</sup> i oczyszczono do zawartości powyżej 99% w eterze. Zawartość tempola w odczynniku bazowym weryfikowano przez pomiar temperatury topnienia.

### 3.3.5. METODY ANALIZY STATYSTYCZNEJ

Wnioskowanie oparto o analizę statystyczną. Obliczono średnią arytmetyczną  $\pm$  błąd standardowy średniej arytmetycznej (SEM). Za istotny poziom różnic między testowanymi zmiennymi przyjąłem  $P \leq 0.05$ , natomiast przy wyznaczaniu przebiegu funkcji krzywoliniowych uznałem  $P \leq 0,01$  jako kryterium istotności.

Hipotezę normalności rozkładu zmiennych weryfikowano testem Shapiro-Wilka, zaś dla wykluczenia niejednorodności wariancji w porównywanych grupach stosowano test Levene'a. Po odrzuceniu hipotezy o niejednorodności wariancji średnie wartości zmiennych porównywano przy użyciu analizy wariancji ANOVA i testów *post-hoc*. W przypadku potwierdzenia rozkładu normalnego wykorzystano testy parametryczne. Dla porównania par zmiennych powiązanych zastosowano test Bonferroniego przy normalnym rozkładzie zmiennych, lub test Wilcoxona, gdy rozkłady porównywanych zmiennych wyraźnie odbiegały od normalnego. Dla porównywania wartości grupy kontrolnej (WKY) z korespondującymi wartościami grup SHR lub LNR stosowano test Dunnetta, zaś testy: Fishera (LSD), lub Tukeya wykorzystano przy porównaniach pomiędzy grupami SHR i LNR. Przy nierównych wariancjach, a także w przypadku jednostronnego rozkładu zmiennych dla ujawnienia różnic między więcej niż dwiema grupami stosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, z wykorzystaniem testu Manna-Whiteya do obliczeń *post hoc*. Obliczenia wykonywano przy użyciu oprogramowania Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, USA) oraz XL-Statistics (Warrnambool, Australia).

Występowanie związków między badanymi zmiennymi testowano przy pomocy analizy regresji przy wykorzystaniu oprogramowania Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA). Obliczano współczynnik korelacji liniowej Pearsona przy  $n-2$  stopniach swobody i wyznaczano poziom jego istotności statystycznej. Przebiegi funkcji zależności typu dawka-odpowiedź, a także krzywych narastania, lub zaniku odpowiedzi określano przy użyciu aproksymacji nieliniowej. Jako kryterium optymalnego wyboru typu krzywej i jej przebiegu przyjęto najmniejszą sumę kwadratów różnic pomiędzy rzeczywistymi punktami pomiarowymi i korespondującymi punktami uzyskanych krzywych, co odpowiadało najwyższej wartości współczynnika determinacji  $r^2$ . Wyznaczając przebieg funkcji określano także jej przedział ufności. Porównywano położenie danego punktu pomiarowego do przebiegu krzywej reprezentujących daną grupę. Przynależność pojedynczego punktu do populacji próbek weryfikowano przy użyciu testu Wilcoxona przy wykorzystaniu oprogramowania InStat (GraphPad Software Inc, USA). Przebiegi krzywych porównywano przy użyciu analizy kowariancji (ANCOVA) przy zastosowaniu metodyki obliczeniowej zaproponowanej przez Armitage'a<sup>428</sup> dla krzywych o przebiegu równoległym i nierównoległym.

Porównawcza ocena ilościowej aktywności mitochondriów miała charakter w znacznej mierze oceny szacunkowej, z uwagi na małą liczbę próbek ( $N = 3$ ) w każdej z



---

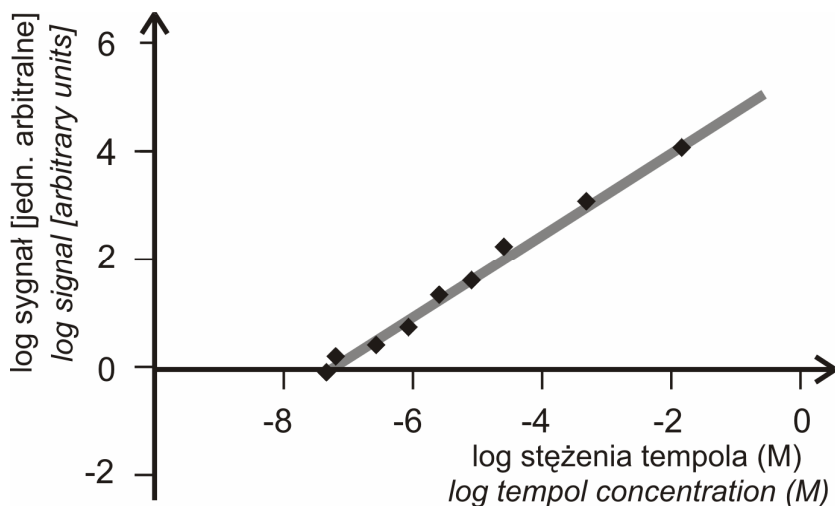
grup, która mogłaby być wykorzystana w obliczeniach statystycznych. W analizie wyników uwzględniłem znaczną jednorodność oznaczeń dokonanych w obrębie poszczególnych grup eksperymentalnych. Biorąc pod uwagę fakt empiryczny, że różnice ilościowe w wykonanych oznaczeniach biochemicznych, między oznaczeniami spulowanych próbek tej samej grupy nie przekraczały 10% w przypadku RCI, 12% - przy wyznaczaniu aktywności wybranych enzymów mitochondrialnych i 5% w przypadku ADP/O, przeprowadziłem symulację obliczeniową w programie Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Uwzględniłem przy tym fakt, że analizowane próbki były utworzone przez połączenie 3 jednostkowych materiałów tkankowych pochodzących od różnych osobników tej samej grupy. Przy założeniu, że indywidualne różnice ilościowe między próbkami, które zostały spulowane nie są większe o więcej niż 50% od zakresu różnic faktycznie ujawnionych przy oznaczeniach próbek spulowanych, różnica wartości zmiennej między dwiema grupami większa od 10% powinna być znamienna.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Biodystrybucja tempola i jego zanik w tkankach

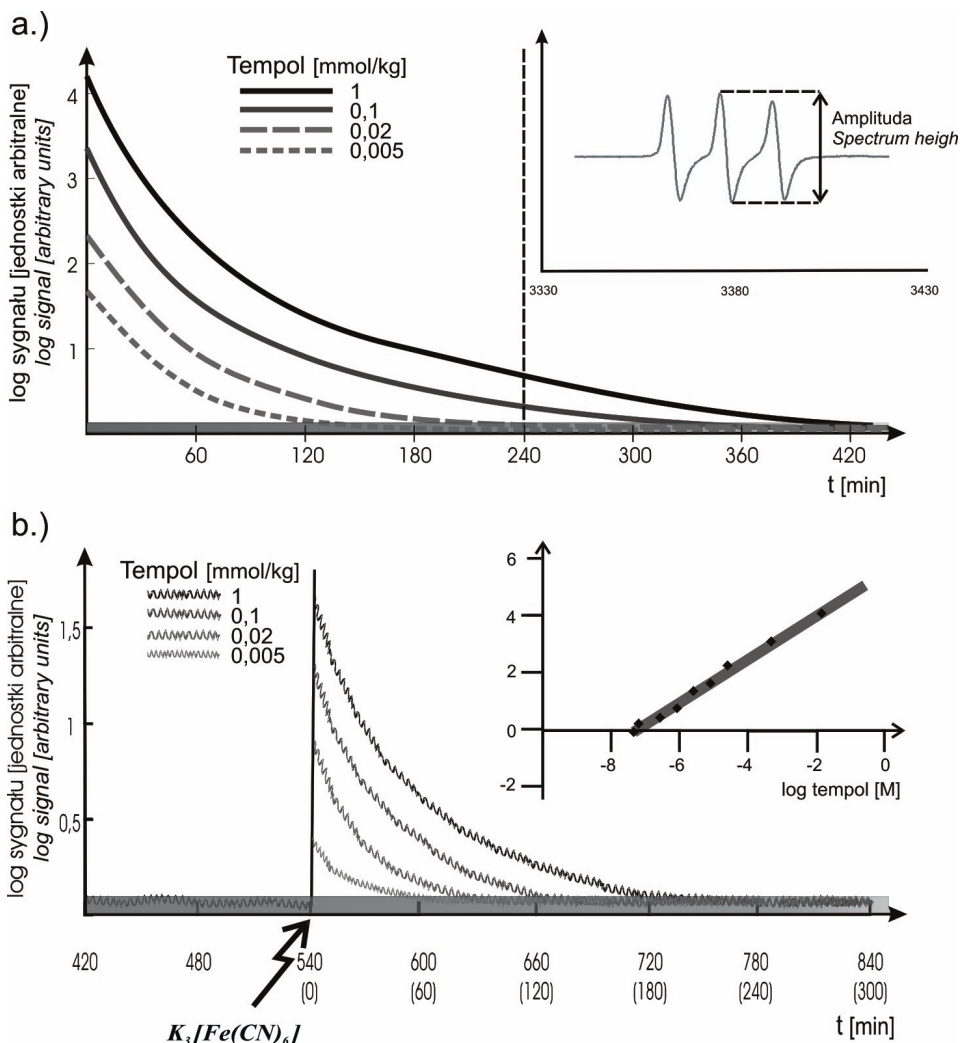
#### 4.1.1. DAWKOWANIE DOŻYLNNE

Z wstępnych doświadczeń kalibracyjnych *in vitro* wyznaczyłem liniową zależność między logarytmem stężenia tempola a amplitudą sygnału (ryc. 15). Próg detekcji tempola odpowiadał jego stężeniu 40 nmol/l



Ryc. 17. Krzywa kalibracji tempola w 5% PBS  
Fig. 17 Calibration curve of tempol in 5% PBS

Po 20–25 s od dożylnego podania tempola zaobserwowano nagłe pojawienie się widma EPR na ekranie spektrometru. Od tego momentu obserwowano stopniowe zmniejszanie amplitudy widma (ryc. 18a). Z uwagi na kilkunastosekundową stałą czasową pomiaru oraz przeciętnie kilkunastosekundowy czas dopływu krwi z tętnicy do komory rezonancyjnej spektrometru nie było możliwe precyzyjne ustalenie czasu w którym sygnał tempola osiągał maksymalną amplitudę. Maksymalny sygnał zarejestrowano w pierwszej minucie od jego podania, później obserwowano jego stopniowy wielogodzinny zanik (ryc. 18a). Z krzywej kalibracji obliczono, że u przeciętnego szczura o masie 420 g, maksymalne stężenie tempola w krwi wynosiło: 11,7, 0,97, 0,048 i 0,0058 mmol/l, po podaniu dawek 2,31, 0,231, 0,0462 i 0,0115 mmol. Stosunek dawki do maksymalnego stężenia we krwi był odwrotnie proporcjonalny do logarytmu dawki i wynosił odpowiednio: 0,197, 0,238, 0,967 i 1,998. Czas połowicznego zaniku był proporcjonalny do logarytmu dawki ( $r = 0,9996$ ) i wynosił 75, 57 45, 33 min., odpowiednio dla dawek: 1, 0,1, 0,02 i 0,005 mmol/kg zaś całkowity zanik sygnału tempola ( $\log S/N = 0,1$ ) następował po: 385, 328, 225 i 133 min.



a) Zanik tempola w krwiobiegu po podaniu pojedynczej dawki dożylniej. Pionowa linia przerywana oznacza zakończenie pojedynczego 4 godzinnego pomiaru EPR. Wykres w prawym górnym rogu odnosi się do sposobu wyznaczania amplitudy sygnału tempola w pomiarze EPR;

b) Zanik tempola w krwiobiegu po podaniu dożylnym pojedynczej dawki  $K_3[Fe(CN)_6]$  – 1 mmol/kg, w 540 min. po uprzednim podaniu dożylnym tempola. Wykres w prawym górnym rogu przedstawia krzywą kalibracyjną tempola wykorzystywaną do oszacowanie stężenia tempola we krwi. Obszar zacieniowany odpowiada amplitudzie sygnału tempola, którą arbitralnie przyjęto jako nieistotną ( $\log S/N < 0,1$ ).

a) *Bloodstream tempol decay after a single intravenous dose. Dashed vertical line denotes the end of a single 4-hour EPR scan. The graph in the right corner reflects the way of determination of the tempol EPR spectrum amplitude.*

b) *Bloodstream tempol decay after a single intravenous dose of potassium ferricyanide,  $K_3[Fe(CN)_6]$  – 1 mmol/kg, injected 540 min after the preceding intravenous tempol administration. The graph in the right corner reflects the tempol calibration curve employed for the evaluation of the tempol blood concentration. Shaded area delineates the amplitude of the tempol EPR spectrum arbitrary defined as insignificant.*

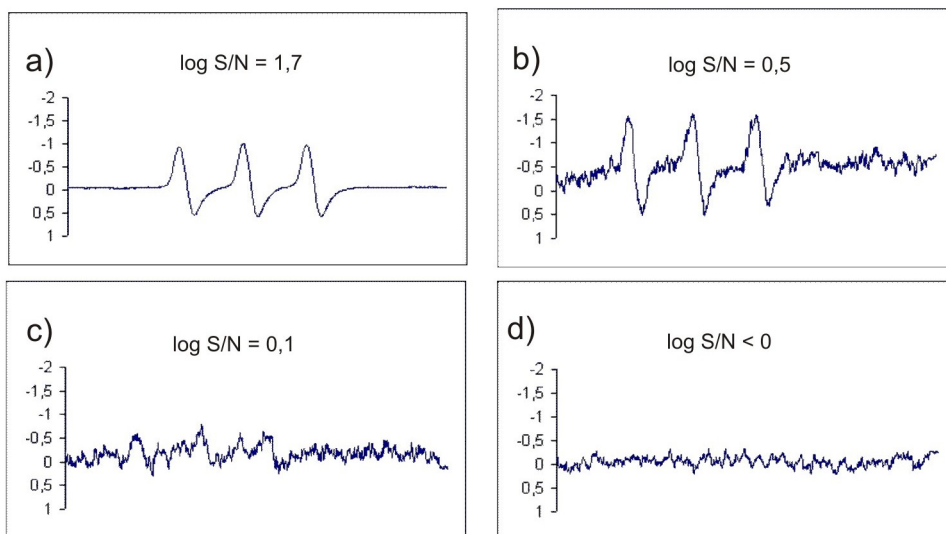
Ryc. 18. Zanik tempola w krwiobiegu.

Fig. 18 Tempol bloodstream decay.

Po wstrzyknięciu dożylnym żelazicyjanku potasu, co następowało 480 min. po uprzednim podaniu tempola, stwierdzono niemal natychmiastowe przywrócenie widma EPR tempola (ryc. 18b). Maksymalna amplituda sygnału była rejestrowana w pierwszej minucie od podania  $K_3[Fe(CN)_6]$  i była proporcjonalna do logarytmu dawki tempola. Stosunek maksymalnego stężenia tempola w pierwszej minucie po jego podaniu do maksymalnego stężenia uzyskanego po podaniu  $K_3[Fe(CN)_6]$  wynosił: 0,24, 0,23, 0,18 i 0,15, odpowiednio dla dawek tempola: 1, 0,1, 0,02 i 0,005 mmol/kg. Okres półtrwania sygnału wynosił odpowiednio: 75, 57, 45, 33 min., zaś całkowity zanik sygnału tempola ( $\log S/N = 0,1$ ) następował po: 385, 328, 225 i 133 min.

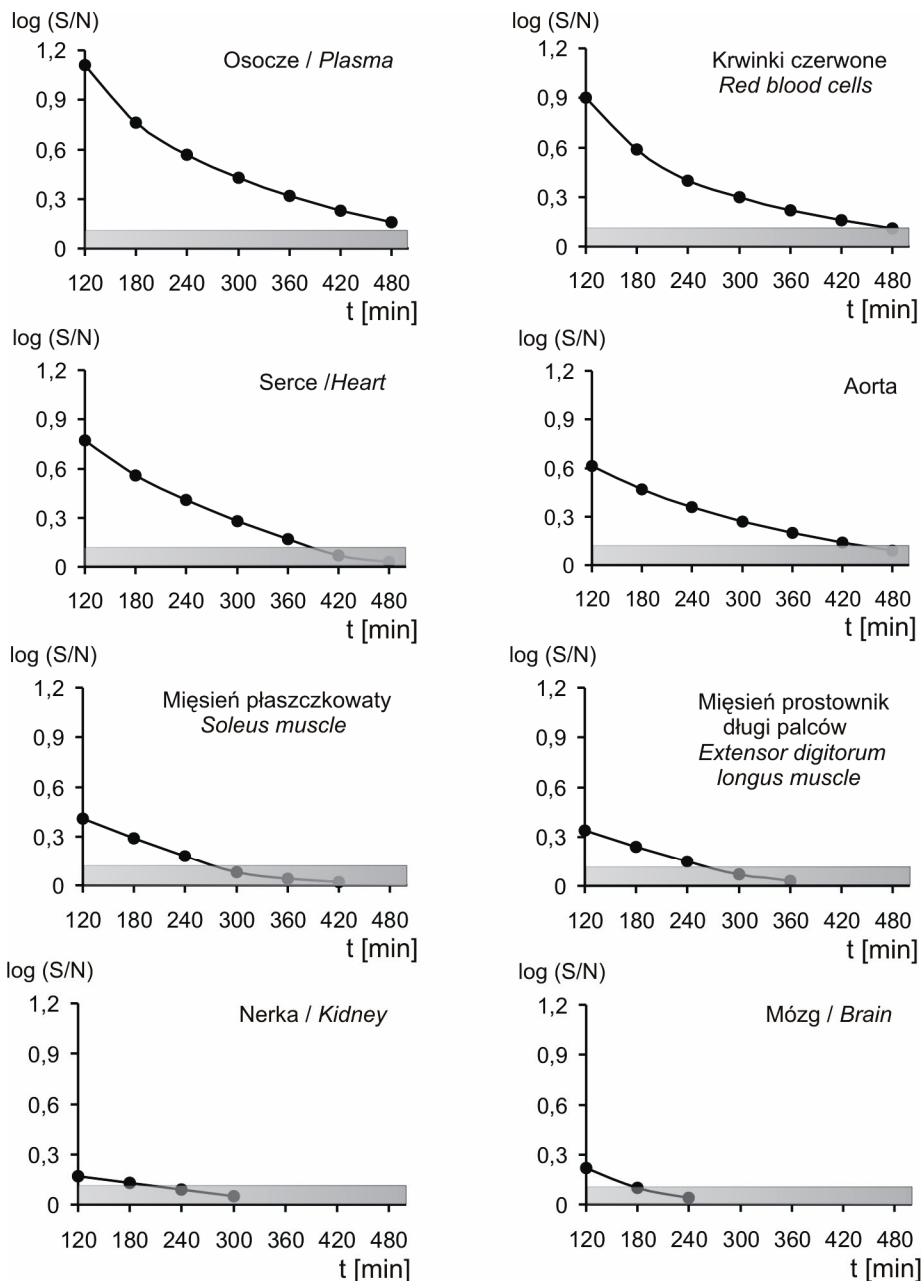
#### 4.1.2. DAWKOWANIE DOUSTNE

Stężenie tempola w tkankach było znacznie niższe niż we krwi, co wiązało się z koniecznością zastosowania wysokiego wzmocnienia przy rejestracji EPR, przez co zwiększał się względny udział szumów pomiarowych w rejestrowanym widmie EPR. Przykładowe zapisy widm EPR zostały przedstawione na ryc. 19. Przy ustalonym arbitralnie prógu detekcji na poziomie  $\log S/N = 0,1$  zniekształcone widmo tempola jest wyraźnie widoczne (ryc. 19c) i w większości, choć nie wszystkich pomiarach, można je było bez trudu zidentyfikować przy  $\log S/N = 0,02$ .



Oszacowane stężenia tempola wynosiły: a) 9,31  $\mu\text{mol/kg}$ ; b) 260 nmol/kg; c) 80 nmol/kg; d) poniżej progu detekcji – ewidentny brak sygnału. *Estimated tempol concentrations: a) 9,31  $\mu\text{mol/kg}$ ; b) 260 nmol/kg; c) 80 nmol/kg; d) below the detection threshold – evident lack of signal*

Ryc. 19. Przykładowe widma EPR tempola, ilustrujące stosunek sygnału do szumu  $\log(S/N)$   
 Fig. 19. Examples of the EPR spectra showing the signal / noise ratio –  $\log(S/N)$



Ryc. 20. Zanik tempola we krwi i wybranych homogenatach tkankowych 120 min. po 24-godzinnym dawkowaniu doustnym ( $0,965 \pm 0,012$  mmol/kg)

Zacieniowane pola odpowiadają amplitudzie sygnału tempola poniżej arbitralnie przyjętego progu detekcji.

Fig. 20. Decay of tempol in blood and selected tissues 120 min after 24-hour oral dosage ( $0,965 \pm 0,012$  mmol/kg)

Shaded fields denote the amplitude of the EPR tempol spectrum below the arbitrary defined detection threshold.

Po 24-godzinnym podawaniu tempola (1 mmol/kg) w wodzie do picia stwierdzono występowanie charakterystycznego widma EPR tempola we krwi i we wszystkich testowanych tkankach (ryc. 20). Po dwóch godzinach od odstawienia tempola jego szacunkowe stężenie ( $\mu\text{mol/l}$ ) i czas zaniku sygnału (min.) wynosiły: 1,56  $\mu\text{mol/l}$  i 518 min. – w osoczu, 0,86  $\mu\text{mol/l}$  i 472 min. – w krwinkach czerwonych, 0,54  $\mu\text{mol/l}$  i 386 min. – w sercu, 0,36  $\mu\text{mol/l}$  i 429 min. w aorcie, 0,20  $\mu\text{mol/l}$  i 271 min. – w mięśniu płaszczkowatym, 0,16  $\mu\text{mol/l}$  i 253 min. – w mięśniu prostowniku długim palców, 0,095  $\mu\text{mol/l}$  i 188 min. w nerce oraz 0,11  $\mu\text{mol/l}$  i 176 min. w mózgu.

#### 4.1.3. DAWKOWANIE DOOTRZEWNOWE

Dwie godziny po dootrzewnym podaniu 100- $\mu\text{mol}$ owej dawki tempola największą amplitudę jego sygnału, odpowiadającą stężeniu 0,47  $\mu\text{mol/l}$  stwierdzono w osoczu (tab. 5).

Występowanie istotnych stężeń tempola stwierdzono we wszystkich testowanych tkankach, za wyjątkiem kory nerki, gdzie sygnał był nieregularny, a charakterystyczne widmo EPR tempola udało się zidentyfikować w 50% próbek. Tempol występował zarówno we frakcji wodnej, jak i lipidowej badanych tkanek, za wyjątkiem rdzenia nerki, gdzie sygnał tempola potwierdzono jedynie w homogenatach zawieszonych w środowisku buforu fosforanowego.

Tab. 5. Rozmieszczenie tempola we krwi i w wybranych homogenatach tkankowych 120 min. po dootrzewnym podaniu pojedynczej dawki (100  $\mu\text{mol/kg}$ )

Tab. 5. Distribution of tempol in blood and selected tissue homogenates 120 min after intraperitoneal administration of the single dose (100  $\mu\text{mol/kg}$ )

TKANKA <i>Tissue</i>	N	Frakcja wodna <i>Aqueous fraction</i>	Frakcja lipidowa <i>Lipid fraction</i>
		[Log sygnał / szum] <i>[Log signal / noise]</i>	[Log sygnał / szum] <i>[Log signal / noise]</i>
Osocze / <i>Plasma</i>	5	<b>0,70 ± 0,07</b>	
Krwinki czerwone / <i>Red blood cells</i>	5	<b>0,41 ± 0,03</b>	<b>0,48 ± 0,04</b>
Serce / <i>Heart</i>	5	<b>0,40 ± 0,06</b>	<b>0,44 ± 0,08</b>
Aorta / <i>Aorta</i>	5	<b>0,54 ± 0,05</b>	<b>0,47 ± 0,03</b>
Krezka / <i>Mesentery</i>	5	<b>0,45 ± 0,07</b>	<b>0,49 ± 0,10</b>
Mózg / <i>Brain</i>	4	<b>0,10 ± 0,03</b>	<b>0,13 ± 0,05</b>
Nadnercza / <i>Adrenals</i>	3	<b>0,23 ± 0,12</b>	<b>0,31 ± 0,08</b>
Rdzeń nerki / <i>Kidney medulla</i>	4	<b>0,27 ± 0,10</b>	0,03 ± 0,02
Kora nerki / <i>Kidney cortex</i>	4	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Mięsień płaszczkowaty / <i>Soleus muscle</i>	4	<b>0,19 ± 0,02</b>	<b>0,15 ± 0,03</b>

Zacieniowane pola odpowiadają amplitudzie sygnału tempola powyżej arbitralnie przyjętego progu detekcji.  
*Shaded fields denote the amplitude of the tempol spectrum above the arbitrary defined detection threshold.*

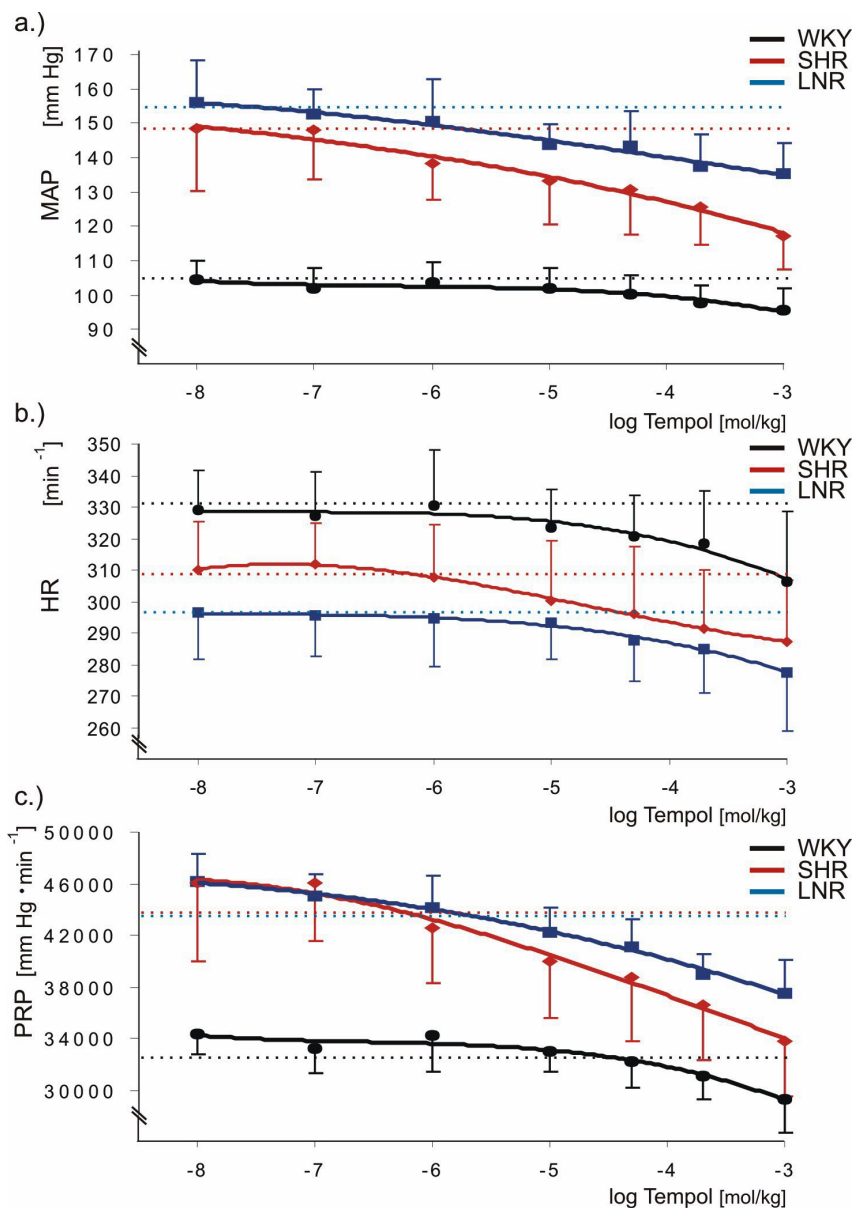
## 4.2 .Wpływ tempola na ciśnienie tętnicze i czynność serca

### 4.2.1. PRZEBIEG KRZYWYCH DAWKA – ODPOWIEDŹ PO PODANIU DOŻYLNYM

MAP było istotnie niższe, a HR i PRP były niższe w grupie WKY, w porównaniu do szczurów nadciśnieniowych SHR i LNR (ryc.21). We wszystkich grupach zwierząt tempol w sposób zależny od dawki obniżał MAP, zwalniał HR i zmniejszał PRP. W grupach SHR i LNR maksymalne obniżenie MAP i PRP, wyrażone w jednostkach bezwzględnych, było istotnie większe niż u ich odpowiedników normotensyjnych WKY ( $P < 0,01$ ), natomiast wpływ tempola na HR był we wszystkich grupach podobny. Przy odniesieniu efektu hipotensyjnego do wartości wyjściowych lub do zmiany PRP wyrażonej w procentach tych wartości tempol wywierał znamienne większy wpływ w grupie SHR w porównaniu do WKY. Takich różnic nie stwierdzono przy porównaniu szczurów WKY do LNR. W grupie SHR tempol obniżał MAP w sposób statystycznie znamieny, począwszy od dawki 100 nmol/kg, zaś u szczurów WKY i LNR – 1  $\mu$ mol/kg. Istotny wpływ na HR zaznacza się w grupach WKY i SHR przy dawce 10  $\mu$ mol/kg, zaś w grupie LNR od 55  $\mu$ mol/kg. Istotne obniżenie PRP zaznaczyło się we wszystkich grupach po zastosowaniu dawki 1  $\mu$ mol/kg i dawek większych.

### 4.2.2. WPŁYW 14-DNIOWEGO PODAWANIA TEMPOLA NA CIŚNIENIE TĘTNICZE I CZĘSTOŚĆ AKCJI SERCA

Przed rozpoczęciem podawania L-NNA (Procedura 3.2.2.2) SBP i HR były zbliżone w grupie WKY i LNR, natomiast szczury SHR wykazywały cechy nadciśnienia tętniczego (SBP:  $171,78 \pm 7,45$  mm Hg) i istotnie wolniejszą HR (tab. 6). Po 14 dniach obserwacji, SBP i HR nie zmieniło się znacząco w grupach WKY i SHR, natomiast w grupie LNR, której w tym okresie podawano L-NNA, stwierdzono podwyższone wartości SBP, nieco wyższe niż w grupie SHR, przy nieznacznym, lecz znamienym zwolnieniu HR. U szczurów otrzymujących tempol stwierdzono istotnie niższe wartości MAP, co było szczególnie widoczne w grupie SHR. We wszystkich grupach zaobserwowano odpowiedź sercową ( $\Delta$ HR), towarzyszącą efektowi hipotensyjnemu. U szczurów WKY i SHR HR uległa nieznacznemu, lecz znamienemu statystycznie zwolnieniu, podczas gdy w grupie LNR tempol wywołał istotne przyspieszenie HR. Porównania dokonane w 21 dniu doświadczenia wskazują, że w grupie LNR MAP było istotnie wyższe niż w SHR i WKY, przy czym szczury SHR miały znacznie wyższe MAP niż ich odpowiedniki normotensyjne WKY. HR była istotnie niższa w grupie SHR w porównaniu do WKY i LNR. U szczurów z nadciśnieniem tętniczym otrzymujących tempol: SHR i w mniejszym stopniu LNR, zarejestrowano niższe wartości MAP niż u ich odpowiedników, którym tempola nie podawano. Różnicy tej nie było w grupie normotensyjnej – WKY. Analogicznie do obserwacji 14-dniowej, po 21 dniach podawania tempola zanotowano nieznacznie wolniejszą HR w grupach SHR i WKY, natomiast u szczurów LNR otrzymujących tempol HR była istotnie szybsza niż u ich odpowiedników, które tempola nie otrzymywały.



Ryc. 21. Wpływ pojedynczych dożylnych dawek tempola na średnie ciśnienie tętnicze (MAP), częstość akcji serca (HR) i produkt podwójny ( $PRP = MAP \cdot HR$ )

Fig. 21. Effect of single intravenous doses of tempol on mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and double product ( $PRP = MAP \cdot HR$ )

Wyniki pomiarów uzyskanych pośrednią metodą pletyzmograficzną i oznaczeń dokonanych bezpośrednio w świetle tętnicy, porównano przy użyciu analizy regresji, a współczynniki korelacji liniowej przedstawiono w tab. 6. Wysokie współczynniki korelacji liniowej  $r$ , większe od 0,72 ( $P < 0,03$ ) przy porównaniu wartości ciśnienia tętni-



czego i większe od 0,85 ( $P < 0,007$ ) przy porównaniu HR wskazują na wysoką zbieżność obu metod pomiarowych. Zwraca uwagę fakt, że u szczurów otrzymujących tempol w grupach WKY i SHR wartości  $r$  są wyraźnie niższe, w porównaniu do ich odpowiedników, którym tempola nie podawano.

Tab. 6. Ciśnienie tętnicze skurczowe (SBP), średnie (MAP), częstość akcji serca (HR) oraz porównanie wartości SBP i MAP wyznaczonych przy pośredniej i bezpośredniej metodzie pomiaru  
Tab. 6. Systolic blood pressure (SBP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and comparison of the SBP and MAP values determined by the indirect and direct method of the assay

GRUPA	Tempol	N	Dzień 0 Day 0		Dzień 14 Day 14		$\Delta$ Dni $\Delta$ Days		Dzień 21 Day 21		Korelacje Correlations	
			SBP <sub>0</sub> [mm Hg]	HR <sub>0</sub> [min <sup>-1</sup> ]	SBP <sub>14</sub> [mm Hg]	HR <sub>14</sub> [min <sup>-1</sup> ]	$\Delta$ (SBP <sub>14</sub> - SBP <sub>0</sub> ) [mm Hg]	$\Delta$ (HR <sub>14</sub> - HR <sub>0</sub> ) [min <sup>-1</sup> ]	MAP [mm Hg]	HR [min <sup>-1</sup> ]	r MAP vs. SBP <sub>14</sub>	r HR <sub>21</sub> vs. HR <sub>14</sub>
WKY	-	9	126,82 ± 4,12	326,30 ± 10,20	127,13 ± 8,51	328,55 ± 7,29	0,31 ± 0,68	2,25 ± 2,01	96,00 ± 3,03	327,53 ± 6,33	0,9031	0,9313
	+	9	126,00 ± 5,45	327,92 ± 9,35	123,80 ± 9,35	320,50 ± 8,20	-2,20 ± 0,83 *	-7,42 ± 1,51 *	94,44 ± 3,44	318,75 ± 9,05	0,7277	0,9105
SHR	-	7	171,78 ± 7,45	279,63 ± 14,17	175,02 ± 3,23	287,81 ± 12,50	3,24 † ± 1,36	8,18 † ± 4,47	137,00 ± 4,74	280,45 ± 8,20	0,8833	0,8962
	+	7	174,02 ± 6,20	276,00 ± 5,85	160,48 ± 4,75	271,60 ± 9,30	-13,54 ± 3,61 *	-4,40 ± 2,23 *	125,29 ± 3,64	265,50 ± 7,35	0,7401	0,9018
LNR	-	8	127,38 ± 3,88	322,50 ± 8,11	184,00 ± 6,99	304,33 ± 11,01	46,62 † ± 8,52	-18,17 † ± 3,38	144,75 ± 4,82	312,50 ± 12,6	0,9002	0,8586
	+	7	128,12 ± 7,41	324,11 ± 9,35	179,85 ± 3,00	336,30 ± 13,87	41,73 ± 9,15 **	12,19 ± 6,07 *	140,50 ± 4,52	338,30 ± 10,9	0,8644	0,8723

SBP<sub>0</sub>, SBP<sub>14</sub> – SBP na początku (0) i w 14 dniu doświadczenia (pomiar metodą pletyzmograficzną na tętnicy ogonowej); HR<sub>0</sub>, HR<sub>14</sub> – HR na początku (0) i w 14 dniu doświadczenia; MAP – mierzone bezpośrednio w 21 dniu doświadczenia;  $r$  – współczynnik korelacji Pearsona pomiędzy SBP<sub>14</sub> i MAP;

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  - tempol w stosunku do kontroli danej grupy; †  $P < 0,05$  SHR, lub LNR względem WKY. Nie zaznaczono nieistotnych różnic między grupami.

SBP<sub>0</sub>, SBP<sub>14</sub> – SBP at the beginning (0) and in day 14 of the experimental procedure (indirect plethysmographic method on tail artery); HR<sub>0</sub>, HR<sub>14</sub> – HR at the beginning (0) and in day 14 of the experiment; MAP – assessed directly in iliac artery in day 21 of the experiment;  $r$  – Pearson correlation coefficient between SBP<sub>14</sub> and MAP; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  - tempol vs control of the given group; †  $P < 0,05$  SHR, or LNR vs WKY. Insignificant differences has not been marked.

#### 4.2.3 WPŁYW PRZEWLEKŁEGO PODAWANIA TEMPOLA NA CIŚNIENIE TĘTNICZE SKURCZOWE (SBP), CZĘSTOŚĆ AKCJI SERCA (HR) I ADAPTACJĘ DO WYSIŁKU

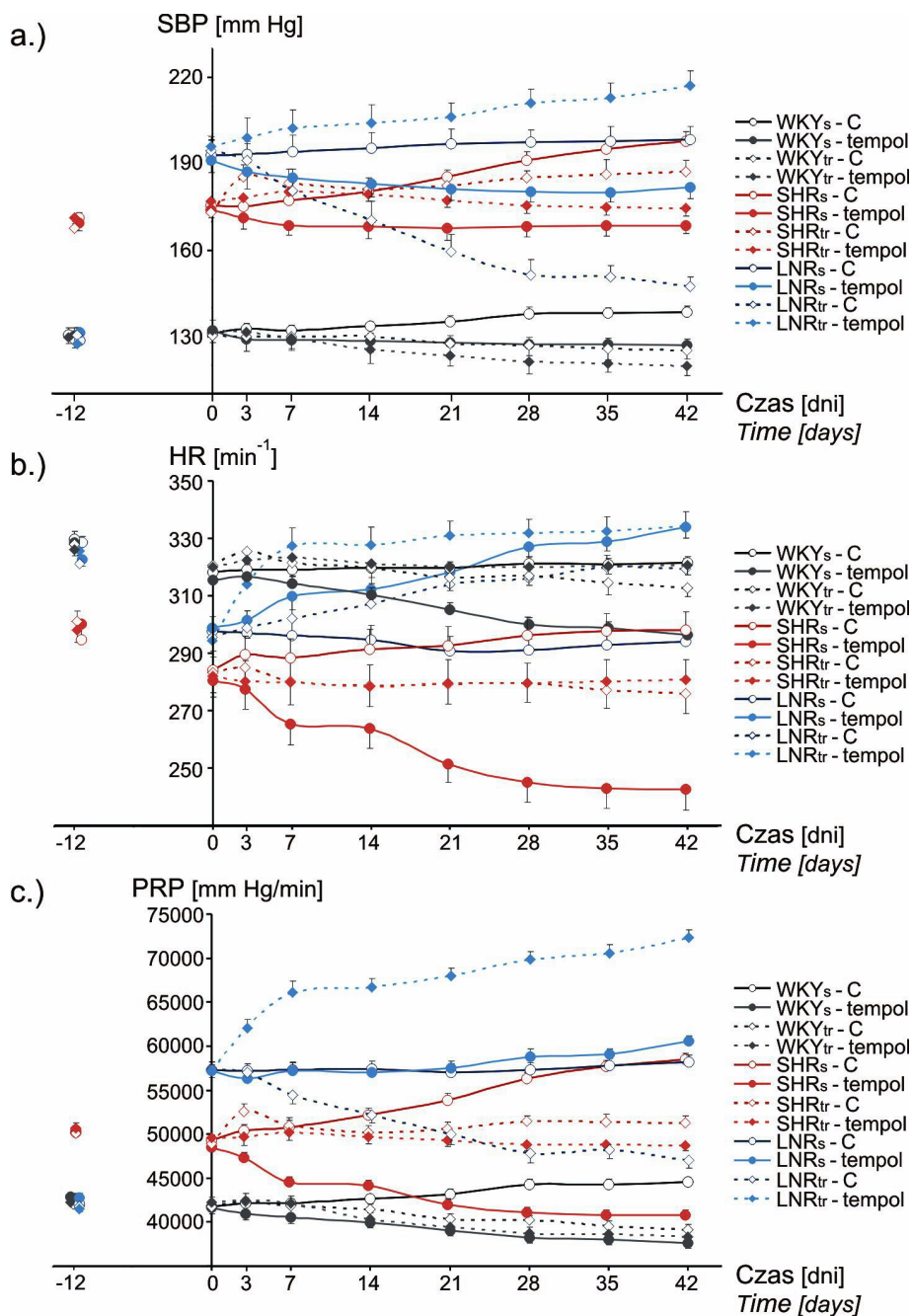
##### 4.2.3.1. SBP, HR i PRP u szczurów nietrenowanych, które nie otrzymywały tempola

Przed rozpoczęciem podawania L-NNA i tempola (Procedura 3.2.2.3) SBP, HR i produkt podwójny (PRP) nie różniły się od siebie w poszczególnych podgrupach WKY i

LNR (ryc. 22). W grupie SHR SBP było istotnie wyższe (+41 mm Hg), podobnie jak PRP (+20%), natomiast HR była znamienne wolniejsza ( $-28 \text{ min}^{-1}$ ). W grupie LNR SBP istotnie wzrosło do wartości wyższych niż w pozostałych grupach ( $193,79 \pm 3,24 \text{ mm Hg}$ ) w pierwszych 12 dniach podawania L-NNA, po czym w grupie WKYc-C – nietrebowanej przez kolejne 42 dni SBP wzrosło nieznacznie do  $198,43 \pm 4,50 \text{ mm Hg}$ . W grupach nietrebowanych w okresie 54-dniowej obserwacji SBP równomiernie wzrastało, o  $9,00 \pm 0,35 \text{ mm Hg}$  u szczurów WKYc-C i w istotnie większym stopniu o  $26,67 \pm 1,12 \text{ mm Hg}$  w grupie SHRC-C. W pierwszych 12 dniach podawania LNR (grupy LNRc-C i LNRtr-C) HR zmniejszyła się o  $28,25 \pm 3,21 \text{ min}^{-1}$  i w grupie nietrebowanej utrzymała się na poziomie praktycznie niezmiennym przez następne 42 dni ( $-3,52 \pm 2,15 \text{ min}^{-1}$ , NS). W grupie LNR stwierdzono znamienne wzrost PRP w pierwszych 12 dniach podawania L-NNA ( $+36,88 \pm 1,72\%$ ), zaś w kolejnych 42 dniach PRP ustabilizował się na osiągniętym wcześniej poziomie ( $+1,58 \pm 2,21\%$ , NS). W pierwszych 12 dniach pomiarów HR nieznacznie zmniejszyła się u szczurów WKY i SHR (WKY:  $-8,92 \pm 5,11 \text{ min}^{-1}$ , NS; SHR:  $-15,30 \pm 7,05 \text{ min}^{-1}$ , NS), natomiast w kolejnych 42 dniach stopniowo wzrastała (WKYc-C:  $+3,29 \pm 1,77 \text{ min}^{-1}$ , NS; SHRC-C:  $+15,55 \pm 2,05 \text{ min}^{-1}$ ,  $P = 0,026$ ). W obydwu grupach PRP początkowo utrzymywał się na jednolitym poziomie (WKY:  $-1,35\%$ , SHR:  $-1,95\%$  w pierwszych 12 dniach pomiarów), jednakże później, przez następne 42 dni równomiernie wzrastał, o  $6,65 \pm 2,71\%$  ( $P = 0,035$ ) w grupie WKYc-C i o  $18,92 \pm 6,25\%$  ( $P = 0,017$ ) u szczurów SHRC-C.

#### 4.2.3.2. Efekty hemodynamiczne tempola u szczurów nietrebowanych

W pierwszych 12 dniach obserwacji SBP, HR i PRP były we wszystkich grupach otrzymujących tempol zbliżone do ich odpowiedników kontrolnych. Jedynie w grupie SHR zaznaczyła się tendencja do niższego HR u szczurów, które otrzymywały tempol ( $-7,55 \text{ min}^{-1}$  vs SHRC-C; NS). W kolejnych tygodniach doświadczenia zaczęły się uwiadczać różnice między szczurami, które otrzymywały tempol i ich odpowiednikami, którym go nie podawano (ryc. 22). Po 54 dniach, zwierzęta które otrzymywały tempol miały istotnie niższe SBP ( $-12,38 \text{ mm Hg}$  WKYc-T vs WKYc-C,  $P < 0,01$ ;  $-10,18 \text{ mm Hg}$  LNRc-T vs LNRc-C;  $P < 0,05$ ), co szczególnie uwidoczniło się w grupie SHR ( $-27,29 \text{ mm Hg}$  SHRC-T vs SHRC-C;  $P < 0,001$ ). HR i PRP były w grupach WKY i SHR istotnie mniejsze u szczurów, którym podawano tempol. W grupie WKY HR było mniejsze o  $-23,33 \text{ min}^{-1}$  ( $P < 0,01$ ), a PRP o  $-15,95\%$  ( $P < 0,01$ ), zaś u SHR HR było mniejsze o  $-60,72 \text{ min}^{-1}$  ( $P < 0,001$ ), a PRP o  $-34,04\%$  ( $P < 0,001$ ). Różnice SBP, HR i PRP między szczurami które otrzymywały tempol i którym nie był on podawany były istotnie większe w grupie SHR w porównaniu do WKY ( $P < 0,01$ ). Po 54 dniach podawania tempola szczury LNR miały istotnie szybszą HR niż ich odpowiedniki, które go nie otrzymywały ( $+44,98 \text{ min}^{-1}$ ,  $P < 0,01$ ), natomiast PRP nie różnił się znamienne ( $+5,60\%$ , NS). Istotne statystycznie różnice między szczurami, którym podawano tempol i ich odpowiednikami kontrolnymi zaznaczyły się: przy porównaniu SBP od 19 dnia dawkowania w grupie SHR oraz od 26 dnia dawkowania u szczurów WKY i LNR, przy porównaniu HR od 15 dnia dawkowania w grupie SHR, 19 dnia u LNR i 26 u WKY, a także przy porównaniu PRP od 19 dnia dawkowania w grupie SHR oraz od 26 dnia u szczurów WKY.



Ryc. 22. Ciśnienie tętnicze skurczowe (MAP), częstość akcji serca (HR) i produkt podwójny (PRP = SBP · HR) podczas 40-dniowego podawania tempola

Fig. 22. Systolic blood pressure (SBP), heart rate (HR), and double product (PRP = SBP · HR) during continuous 40-day tempol administration

#### 4.2.3.3. Efekty hemodynamiczne tempola u szczurów obciążonych trenin- giem biegowym

Spośród 160 szczurów włączonych do Procedury 3.2.2.3. 3,75% nie przeżyło zaplanowanego cyklu eksperymentalnego. Martwe zwierzęta znajdowano rano w klatkach doświadczalnych: 1 w grupie nietrenowanej SHRc-T (7,69%), 1 w grupie nietrenowanej LNRc-T (7,69%), zaś pozostałe w grupach trenowanych: SHRtr-T - 1 (7,14%), LNRtr-T - 3 (21,43%). Z grupy LNRtr-T zostały ponadto wyłączone w piątym tygodniu doświadczeń 2 szczury: 1 z powodu wyraźnych cech infekcji (ropna wydzielina ze spojówek, pogłębione i przyspieszenie oddychania), i 1 z powodu znacznej utraty masy ciała (-19% w okresie 14 dni). Łącznie z 14 szczurów grupy LNRtr-T, które rozpoczęły Procedurę 3.2.2.3, 35,71% nie ukończyło doświadczeń.

W poszczególnych grupach odpowiedzi hemodynamiczne na intensywny trening biegowy typu aerobowego były zróżnicowane (ryc. 22). W grupach WKY i LNR zamiast przyrostu SBP, związanego z wiekiem, u zwierząt trenowanych stwierdzono obniżenie SBP. W trenowanej grupie SHR narastanie SBP było istotnie ograniczone. W grupie LNR efekty treningu były największe. Po 42 dniach od jego rozpoczęcia SBP było o -52,84 mm Hg niższe ( $P < 0,001$ ), HR o 27,67  $\text{min}^{-1}$  szybsza ( $P < 0,01$ ), a PRP o -19,83% mniejszy ( $P < 0,01$ ) niż u odpowiedników nietrenowanych. Istotne różnice między subpopulacją trenowaną (LNRtr-C) i nietrenowaną (LNRc-C) ujawniły się po 7 dniach treningu przy porównaniu SBP i po 14 dniach w przypadku HR i PRP. U trenowanych szczurów WKY SBP było niższe o -12,51 mm Hg ( $P < 0,01$ ), HR wolniejsza o -10,70  $\text{min}^{-1}$  ( $P < 0,01$ ), zaś PRP mniejszy o -12,87% ( $P < 0,01$ ). Istotne różnice między subpopulacją trenowaną (WKYtr-C) i nietrenowaną (WKYc-C) ujawniły się po 21 dniach treningu przy porównaniu SBP, 35 dniach w przypadku HR i po 28 dniach przy porównaniu PRP. W grupie trenowanej SHR stwierdzono istotnie niższe SBP (-9,42 mm Hg,  $P < 0,05$ ), wolniejszą HR (-22,02  $\text{min}^{-1}$ ,  $P < 0,01$ ) i istotnie mniejszy PRP (-13,98%,  $P < 0,001$ ). Znamienne różnice w SBP między subpopulacją trenowaną (SHRtr-C) i nietrenowaną (SHRc-C) ujawniły się po 35 dniach, przy czym w pierwszych dwóch tygodniach treningu szczury trenowane wykazywały wyższe wartości SBP. Od 7 dnia treningu HR była w grupie SHRtr-C istotnie niższa, a od 21 dnia PRP było istotnie mniejsze w porównaniu do SHRc-C.

#### 4.2.3.4. Wpływ treningu biegowego na wybrane parametry hemodynamiczne u szczurów, które otrzymywały tempol

U trenowanych szczurów normotensyjnych WKY (WKYtr-T), które otrzymywały tempol stwierdzono większe obniżenie SBP w ciągu 42 dni, niż u ich odpowiedników nietrenowanych -WKYc-T (-7,31 mm Hg;  $P < 0,05$ ). Trening praktycznie zniósł wpływ tempola na HR i PRP (ryc. 22). W subpopulacjach SHR, trenowanej i nietrenowanej, SBP było po 42 dniach treningu zbliżone. Trening zniósł zwolnienie HR i prawie całkowicie ograniczył zmniejszenie PRP wywołane podawaniem tempola. Od 3 dnia treningu u szczurów trenowanych LNR otrzymujących tempol (LNRtr-T) wystąpił istotny wzrost SBP, który postępował w miarę trwania treningu, co jest reakcją odwrotną i istotnie różną od obserwowanej u szczurów LNRc-T (+22,28  $\pm$  4,15 mm Hg, *vs* -10,18  $\pm$  2,53 mm Hg;  $P < 0,001$ , LNRtr-T *vs* LNRc-T). Trening nie wpłynął na odpowiedź HR na przewlekłe dawkowanie tempola, natomiast od 3 dnia treningu PRP było istotnie więk-

sze w grupie LNRtr-T w porównaniu do szczurów nietrenowanych LNRc-T (maksymalna różnica w 42 dniu: +21,59%,  $P < 0,001$ ).

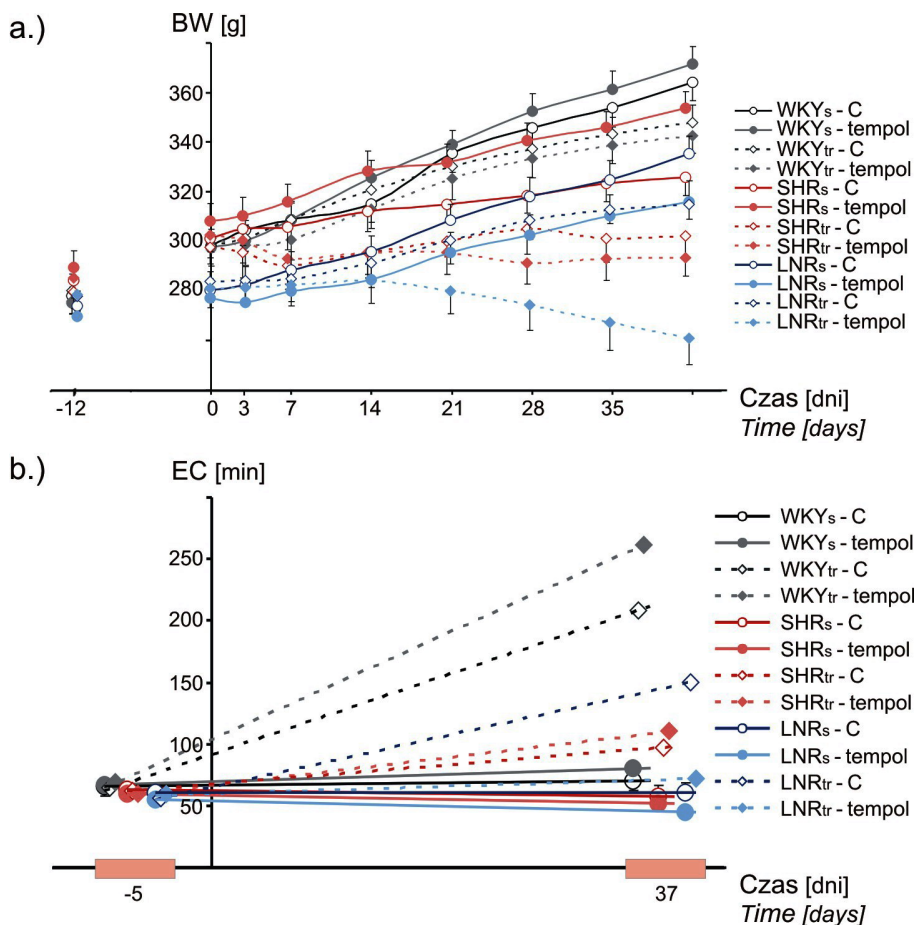
#### 4.2.3.5. Zmiany masy ciała i wydolności fizycznej (EC) pod wpływem treningu biegowego i tempola

Na początku doświadczeń (Procedura 3.2.2.3) masa ciała (BW) nie różniła się między poszczególnymi grupami i wynosiła u szczurów: WKY  $-277,36 \pm 10,86$  g, SHR  $-284,65 \pm 9,34$  g i LNR  $-275,31 \pm 11,21$  g (ryc. 23a). W okresie 14 dni poprzedzających trening u zwierząt, którym nie podawano tempola przyrosty BW były niejednakowe: od  $+21,07 \pm 3,65$  g w grupie WKY i  $+17,74 \pm 4,11$  g u SHR (WKY vs SHR – NS) do jedynie  $6,90 \pm 2,55$  g u LNR ( $P < 0,001$  vs WKY, lub SHR). W dalszym, 42-dniowym okresie obserwacji BW wzrastała, w największym stopniu w grupie WKY ( $+65,94 \pm 7,71$  g), nieznacznie mniejszym w LNR ( $+54,90 \pm 9,25$  g; NS vs WKY) i istotnie mniejszym w SHR ( $+24,95 \pm 6,63$  g;  $P < 0,001$  vs WKY i LNR). Całkowity przyrost BW w okresie 56 dni wynosił:  $+86,00 \pm 5,53$  g w grupie WKY i był istotnie większy niż u szczurów z nadciśnieniem tętniczym: SHR ( $+41,70 \pm 9,02$  g,  $P < 0,001$  vs WKY) i LNR ( $+61,15 \pm 9,23$  g,  $P < 0,01$  vs WKY i  $P < 0,05$  vs SHR).

U wszystkich szczurów trenowanych 42-dniowy przyrost BW był istotnie mniejszy niż u zwierząt nietrenowanych (WKYtr-C:  $41,30 \pm 4,55$  vs WKYc-C:  $65,94 \pm 7,71$ ,  $P = 0,0056$ ; SHRtr-C:  $4,40 \pm 4,95$  vs SHRc-C:  $24,95 \pm 6,63$ ,  $P = 0,0165$ ; LNRtr-C:  $30,87 \pm 5,08$  vs LNRc-C:  $54,90 \pm 9,25$ ,  $P = 0,0297$ ; ryc. 21a). W grupie SHR istotne różnice w przyroście BW stwierdzono w już w 3 dniu treningu, u WKY od 21, a u LNR od 7 dnia treningu. U nietrenowanych szczurów WKY i SHR otrzymujących tempol przyrost masy ciała był nieznacznie większy niż u ich odpowiedników, którym tempola nie podawano ( $+2,82\%$  WKYc-T vs WKYc-C, NS;  $+6,41\%$  SHRc-T vs SHRc-C,  $P \approx 0,05$ ), zaś w grupach trenowanych zaznaczyła się tendencja odwrotna ( $-2,95\%$  WKYtr-T vs WKYtr-C, NS;  $-4,51\%$  SHRtr-T vs SHRtr-C,  $P \approx 0,05$ ). Szczury LNR, którym podawano tempol wykazywały istotnie mniejsze przyrosty BW niż ich odpowiedniki, które nie otrzymywały tempola, co szczególnie uwidoczniło się u zwierząt trenowanych ( $-5,57\%$  LNRc-T vs WKYc-C,  $P < 0,05$ ;  $-18,00\%$  LNRtr-T vs WKYtr-C,  $P < 0,01$ ).

Wydolność fizyczna (EC) oceniana przez pomiar czasu biegu do wyczerpania nie różniła się między grupami i subpopulacjami wewnątrzgrupowymi na początku doświadczeń i wynosiła u szczurów: WKY  $-66,51 \pm 3,85$  min, SHR  $-61,13 \pm 4,55$  min ( $P = 0,3312$  vs WKY, NS) i  $63,00 \pm 5,23$  min ( $P = 0,5887$  vs WKY, NS; ryc. 21b). W grupach nietrenowanych, którym nie podawano tempola, EC nieznacznie wzrosła u szczurów WKY w 42-dniowym okresie doświadczalnym ( $+7,27 \pm 3,85\%$  NS), miernie obniżyła się w grupie SHR ( $-6,56 \pm 3,55\%$ , NS) i nie zmieniła się u LNR ( $-1,13 \pm 4,88\%$ , NS). Z kolei u szczurów, które otrzymywały tempol, EC: istotnie zwiększyła się w grupie WKY ( $+19,18 \pm 2,85\%$ ,  $P < 0,001$ ;  $P = 0,0161$ , WKYc-T vs WKYc-C), istotnie obniżyła się u SHR ( $-13,99 \pm 3,81\%$   $P = 0,0036$ ;  $P = 0,2952$ , SHRc-T vs SHRc-C) i z namiennie zmniejszyła się w grupie LNR ( $-18,24 \pm 4,47\%$ ,  $P = 0,0019$ ;  $P = 0,0089$ , LNRc-T vs LNRc-C). Po 37-dniowym treningu biegowym EC istotnie wzrosła, w stosunku do pomiaru początkowego (ryc. 23b). Największy przyrost EC zanotowano w grupie WKY, o  $+226,02 \pm 14,68\%$  ( $P < 0,0001$ ), z namiennie mniejszy u szczurów LNR ( $+152,78 \pm 28,08\%$ ,  $P < 0,001$ ;  $P = 0,0253$ , LNRtr-C vs WKYtr-C) i najmniejszy w grupie SHR ( $+55,60 \pm 10,25\%$ ,  $P < 0,001$ ;  $P = 0,0001$ , SHRtr-C vs WKYtr-C;  $P = 0,0026$ , LNRtr-C vs SHRtr-C). U szczurów trenowanych WKY i w mniejszym stopniu

SHR, którym podawano tempol, przyrost EC był w okresie treningowym większy, niż u ich odpowiedników nietrenowanych (WKYtr-T:  $+277,92 \pm 20,48\%$ ,  $P = 0,0485$  vs WKYtr-C; SHRtr-T:  $+83,49 \pm 13,36\%$ ,  $P = 0,1098$  vs SHRtr-C, NS). Odmienne, w grupie trenowanej LNR, otrzymującej tempol, przyrost EC był nieistotny ( $+19,45 \pm 12,59\%$ ,  $P = 0,1609$ , NS;  $P = 0,009$  vs LNRtr-C).



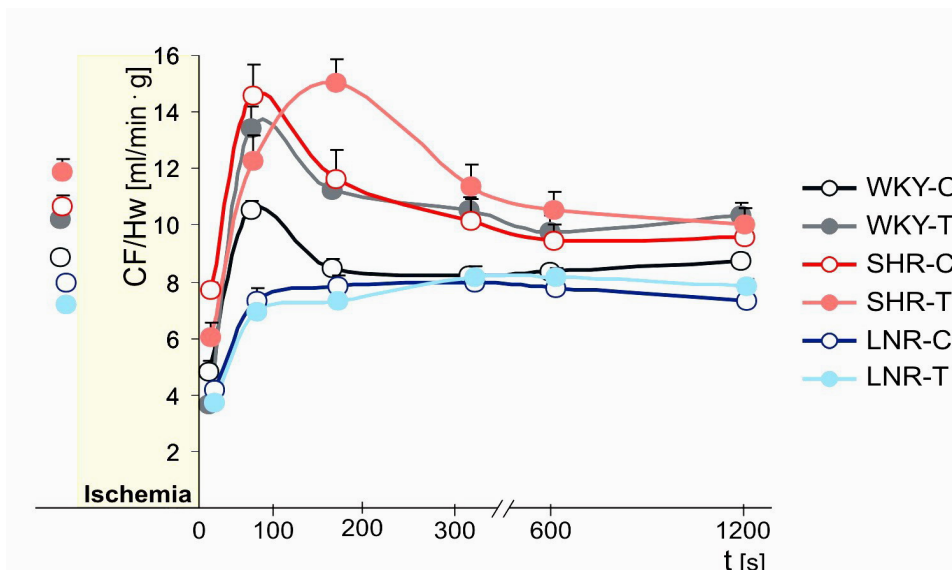
Ryc. 23. Zmiany: a) masy ciała (BW), b) wydolności fizycznej (EC) w okresie treningu.

Fig. 23. Changes in: a) body weight (BW), endurance capacity (EC) during the training.

### 4.3. Wpływ podawania tempola na czynność izolowanego serca poddanego ischemii i reperfuzji

Przepływ wieńcowy (CF) przeliczony na masę serca (HW) przedstawia ryc. 24. W warunkach podstawowych CF/HW był istotnie większy w grupie SHR w porównaniu do WKY ( $P = 0,0044$ ), natomiast w grupie LNR był znacząco mniejszy zarówno względem WKY ( $P = 0,0391$ ), jak i SHR ( $P < 0,0001$ ). W sercach wyizolowanych z serc szczurów,

które otrzymywały tempol (Procedura 3.2.2.2) CF/Hw był istotnie większy w grupach WKY ( $P = 0,0029$ ) i SHR ( $P = 0,0016$ ), zaś w grupie LNR był nieznamienne mniejszy w porównaniu do serc kontrolnych. W pierwszych 45 sekundach od zakończenia ischemii CF był istotnie ograniczony ( $P < 0,0001$  vs wartości przed ischemią): o  $-46,06 \pm 7,28$  % w grupie WKY,  $-47,61 \pm 9,80$  % w sercach LNR (NS vs WKY) i w mniejszym stopniu o  $-25,24 \pm 7,03$  % w grupie SHR ( $P = 0,0494$  vs WKY i  $P < 0,0681$ , NS vs SHR). W sercach wyizolowanych ze szczurów WKY i SHR które otrzymywały tempol redukcja CF była w grupie SHR większa niż w sercach kontrolnych i wynosiła w grupie WKY:  $-49,37 \pm 9,39$  % (vs  $-25,24 \pm 7,03$ ,  $P = 0,0462$ ), a w grupie SHR  $-64,29 \pm 10,02$ % (vs  $-49,37 \pm 9,39$  %,  $P = 0,1378$ , NS). Tempol nie wpływał na ograniczenie CF po wznowieniu perfuzji w grupie LNR ( $-47,92 \pm 12,32$  % vs  $-47,61 \pm 9,80$  %, NS).



Ryc. 24. Przepływ płynu perfuzyjnego przez naczynia wieńcowe izolowanego serca (CF/Hw) perfundowanego płynem wieloelektrolitowym w układzie Langendorffa

Fig. 24 Coronary flow (CF/Hw) in isolated hearts perfused in the Langendorff setup with a multielectrolyte fluid

W okresie 45 – 135 s reperfuzji CF wzrastał (ryc. 24), przekraczając poziom sprzed ischemii w sercach WKY ( $+18,81 \pm 10,35$ %; NS) i SHR ( $+41,01 \pm 15,90$  %,  $P = 0,034$ ; NS vs WKY) oraz osiągając wartości wyjściowe w sercach LNR ( $-1,38 \pm 9,55$  %, NS;  $P = 0,034$  vs SHR; NS vs WKY). W sercach WKY uzyskanych od szczurów którym podawano tempol wzrost CF był nieznamienne większy ( $+31,41 \pm 14,17$ % vs  $+18,81 \pm 9,26$ %,  $P = 0,0575$ , NS) i utrzymywał się dłużej niż w sercach kontrolnych (6 min reperfuzji vs 90 s reperfuzji – serca WKY bez tempola). Po 20 min reperfuzji CF niemal osiągnął wielkość sprzed ischemii w grupie WKY ( $-1,46 \pm 6,17$ %, NS), natomiast utrzymywał się na nieznamienne obniżonym poziomie w sercach SHR ( $-7,35 \pm 4,70$  %, NS;  $P = 0,0552$ , NS vs WKY) i LNR ( $-7,67 \pm 4,92$ %, NS;  $P = 0,0473$  vs WKY). W sercach WKY uzyskanych od szczurów którym podawano tempol CF nie różnił się w 20 min reperfuzji od serc kontrolnych. W sercach SHR CF był istotnie mniejszy w 20 min reper-

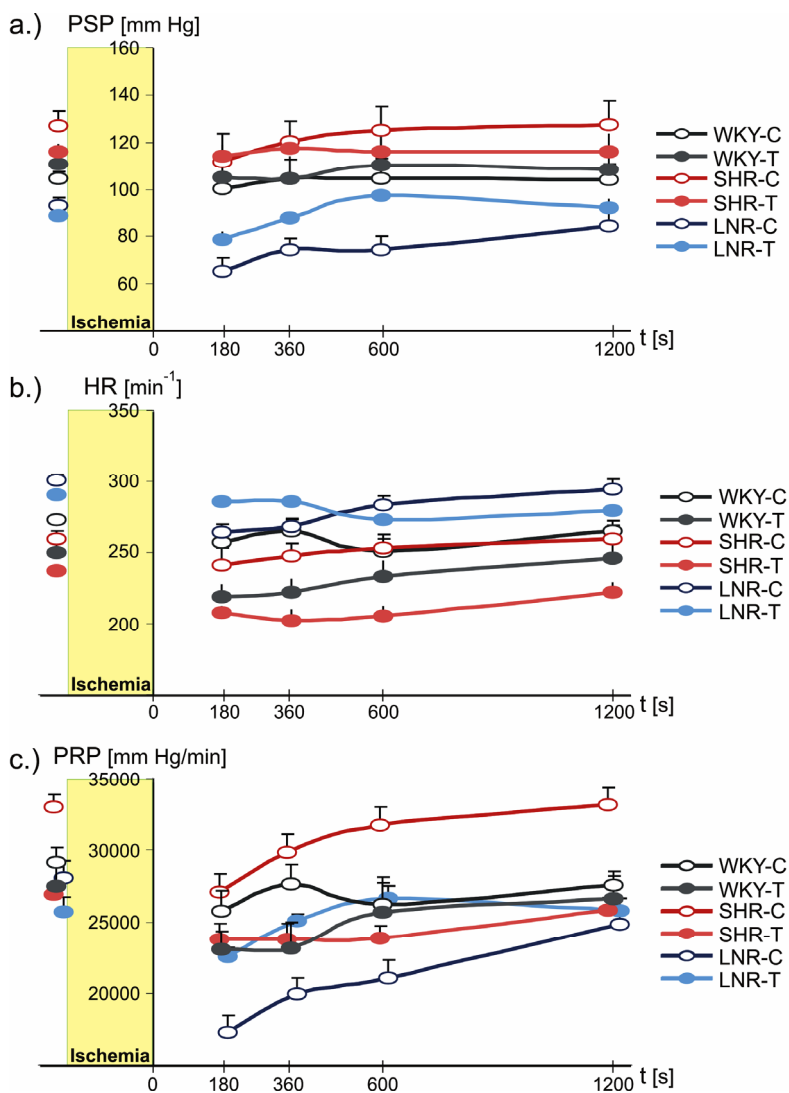
fuzji w grupie, która otrzymywała tempol ( $-15,33 \pm 3,02\%$ , vs serca kontrolne SHR: ( $-7,35 \pm 4,70\%$ ;  $P = 0,033$ ), natomiast w sercach LNR obserwowano nieznacznie zwiększony CF ( $+9,31 \pm 3,55\%$ ,  $P = 0,0007$ ), istotnie różny od obserwowanego w grupie, której nie podawano bez tempola ( $-7,67 \pm 4,92\%$ ,  $P = 0,0395$ ;) i ten efekt tempola był istotnie różny od obserwowanego w sercach WKY ( $P = 0,0374$ ) i SHR ( $P = 0,008$ ).

Rycina 25 przedstawia maksymalne ciśnienie w lewej komorze serca izolowanego podczas skurczu (PSP), częstość spontanicznego rytmu serca (HR) oraz produkt podwójny (PRP), będący iloczynem PSP i HR: przed ischemią i podczas reperfuzji. Z analizy wyłączono pierwsze 180 s reperfuzji z uwagi na zaburzenia rytmu serca, które występowały w tym okresie u większości preparatów.

W warunkach podstawowych PSP było istotnie wyższe w grupie SHR w porównaniu do WKY i LNR ( $127,15 \pm 6,22$  mm Hg,  $P = 0,0016$  vs WKY  $104,76 \pm 2,59$  mm Hg,  $P = 0,0002$  vs LNR  $93,09 \pm 3,47$  mm Hg; ryc. 25a). Różnica PSP pomiędzy WKY i LNR nie była istotna statystycznie. Po 3 minutach reperfuzji PSP było istotnie obniżone, w największym stopniu w sercach LNR ( $-29,59 \pm 6,65\%$ ,  $P = 0,0044$ ), ponad dwukrotnie mniejszym w grupie SHR ( $-12,00 \pm 2,18\%$ ,  $P = 0,0015$ ;  $P = 0,0189$  vs LNR) i niewielkim w sercach WKY ( $-4,40 \pm 1,11\%$ ,  $P = 0,0042$ ;  $P = 0,0016$  vs SHR;  $P = 0,0004$  vs LNR). Po 20 min reperfuzji PSP powróciło do wartości wyjściowych w grupach WKY ( $-0,87 \pm 1,72\%$ , vs wartości sprzed ischemii, NS) i SHR ( $0,41 \pm 1,37\%$ , NS), natomiast w sercach LNR pozostało obniżone ( $-9,50 \pm 3,25\%$ ,  $P = 0,0266$ ;  $P = 0,0247$  vs WKY;  $P = 0,0104$  vs SHR). W grupach otrzymujących tempol PSP nie różniło się istotnie w warunkach podstawowych od kontroli nie przyjmującej tempola, aczkolwiek w obu grupach nadciśnieniowych zaznaczyła się tendencja do niższych wartości PSP. Podczas reperfuzji PSP odpowiadało wartościom grupy kontrolnej w sercach WKY wyizolowanych od szczurów, którym podawano tempol. W grupie SHR otrzymującej tempol praktycznie nie stwierdzono obniżenia PSP podczas reperfuzji ( $-1,42 \pm 1,64\%$ , NS), a w grupie LNR maksymalna redukcja PSP po ischemii była o  $-63,25\% \pm 15,57\%$  mniejsza ( $P = 0,0015$ ) od obserwowanej w sercach uzyskanych od szczurów LNR, które nie otrzymywały tempola ( $-10,87 \pm 2,53\%$ ,  $P = 0,0052$ ). W warunkach podstawowych w sercach wyizolowanych od szczurów, którym nie podawano tempola nie stwierdzono istotnych różnic HR pomiędzy grupami. Zaznaczyła się nieistotna tendencja do szybszego rytmu serca w grupie LNR ( $P = 0,1025$  vs WKY, NS). Przed ischemią we wszystkich grupach, które otrzymywały tempol HR była wyraźnie, jakkolwiek nieistotnie pod względem statystycznym wolniejsza niż u ich odpowiedników kontrolnych (WKY:  $-22,00$  min<sup>-1</sup>; SHR:  $-19,12$  min<sup>-1</sup>; LNR:  $-10,04$  min<sup>-1</sup>; ryc. 23b). Po ischemii we wszystkich grupach zanotowano zwolnienie HR, szczególnie w sercach LNR ( $-38,20 \pm 11,20$  min<sup>-1</sup>;  $P = 0,0769$ , NS), w mniejszym stopniu w WKY ( $-14,44 \pm 6,93$  min<sup>-1</sup>,  $P = 0,0705$ , NS) i SHR ( $-16,87 \pm 4,27$  min<sup>-1</sup>;  $P = 0,0073$ ). W sercach wyizolowanych ze szczurów WKY i SHR, które otrzymywały tempol redukcja HR po ischemii była istotnie większa (WKY-tempol:  $-29,82 \pm 9,77$  min<sup>-1</sup>,  $P = 0,0226$  vs. WKY-kontrola; SHR-tempol  $-31,44 \pm 5,21$  min<sup>-1</sup>,  $P = 0,0102$  vs. SHR-kontrola), natomiast w sercach uzyskanych ze szczurów LHR, którym podawano tempol nie stwierdzono istotnego zwolnienia HR po ischemii ( $-4,50 \pm 11,53$  min<sup>-1</sup>, NS). Po 20-minutowej reperfuzji HR zbliżyła się do wartości wyjściowych we wszystkich grupach, za wyjątkiem serc SHR wyizolowanych od szczurów, którym podawano tempol ( $-17,06 \pm 5,38$  min<sup>-1</sup>,  $P = 0,0193$ ) i w mniejszym stopniu LNR uzyskanych od szczurów otrzymujących tempol  $-11,94 \pm 6,62$  min<sup>-1</sup>, NS). W warunkach podstawowych PRP był istotnie większy w grupie SHR niż WKY ( $P = 0,0373$ ) i LNR ( $P = 0,0141$ ; ryc. 25c).



W sercach wyizolowanych od szczurów którym podawano tempol PRP był niższy niż u ich odpowiedników kontrolnych: w grupie SHR o -12,95% ( $P = 0,0373$ ), LNR o -8,39% ( $P = 0,0861$ , NS), zaś WKY zaledwie o -2,85% (NS).



Ryc. 25. Maksymalne ciśnienie w lewej komorze serca izolowanego podczas skurczu (PSP), częstość spontanicznego rytmu serca (HR) oraz produkt podwójny (PRP = PSP·HR) przed i po 30-minutowej ischemii serca.

Fig. 25. Maximal systolic pressure in the left ventricle of the isolated heart (PSP), spontaneous heart rate (HR), and pressure arte product (PRP = PSP·HR) before and following the 30-min. heart ischemia.

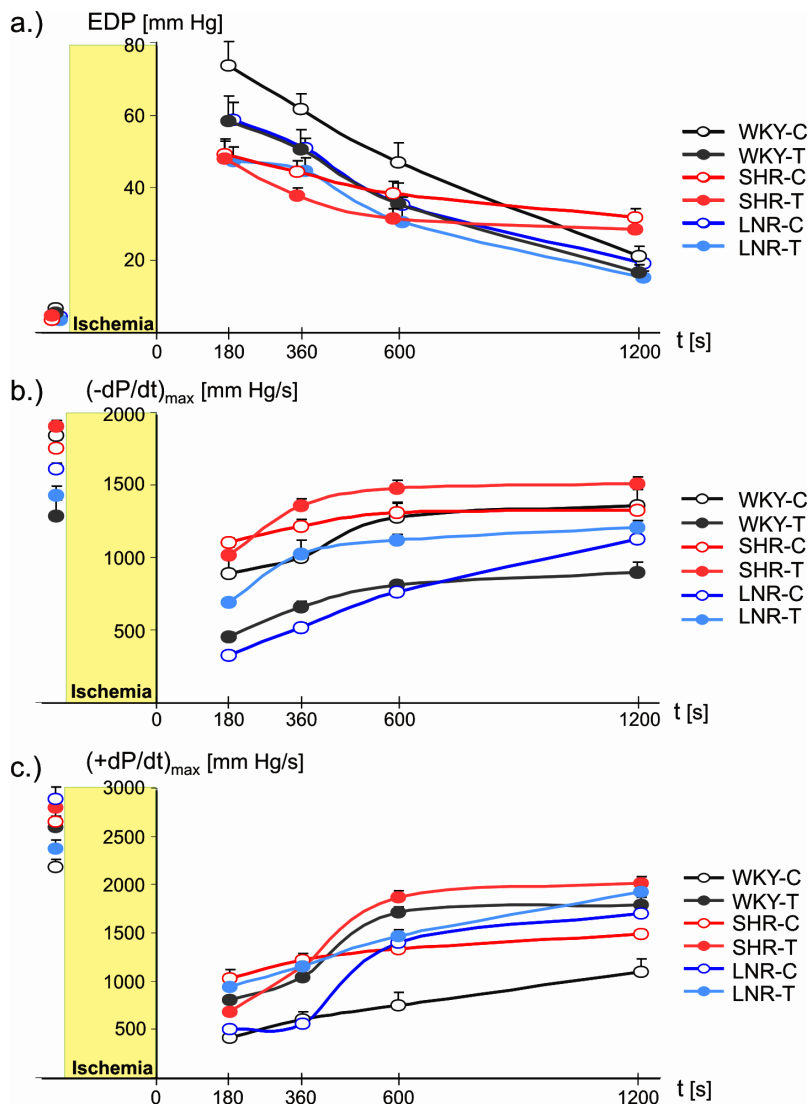
Po 3 min od rozpoczęcia reperfuzji PRP był obniżony: o  $-9,59 \pm 2,41$  % w grupie WKY ( $P = 0,0042$ ),  $-17,75 \pm 2,55$  w SHR ( $P = 0,0005$ ;  $P = 0,0275$  vs WKY) i w LNR o -

-38,30 ± 9,82 % (P = 0,008; P = 0,004 vs WKY; P = 0,0493 vs SHR). W sercach SHR i LNR uzyskanych od szczurów, którym podawano tempol redukcja PRP była mniejsza niż u ich odpowiedników, którym tempola nie podawano: w grupie SHR był obniżony o -14,38 ± 3,81% (P = 0,0092; NS vs SHR-kontrola), zaś w LNR o -12,25 ± 5,95%, P = 0,0851; P = 0,0306 vs LNR-kontrola). Z kolei w sercach wyizolowanych od szczurów WKY otrzymujących tempol PRP był w 3 min reperfuzji nieistotnie mniejszy niż u ich odpowiedników kontrolnych (-16,68 ± 4,38 %, P = 0,0074; P = 0,1521 vs WKY-kontrola). Po 20 min od zakończenia ischemii jedynie w sercach SHR pochodzących od szczurów, którym nie podawano tempola oraz w sercach wyizolowanych od szczurów LNR, które otrzymywały tempol, PRP osiągnęło poziom wyjściowy (ryc. 25c). W pozostałych grupach obliczone wartości PRP były niższe: w grupie WKY bez tempola o -4,02 ± 0,89% (P = 0,002; P = 0,0022 vs SHR), WKY otrzymującej tempol o -3,62 ± 1,74 % (P = 0,0711, NS; NS vs WKY-kontrola), w grupie SHR której podawano tempol o -7,09 ± 2,00%, P = 0,0121; P = 0,0026 vs SHR-kontrola), zaś w grupie LNR bez tempola o -11,62 ± 3,51 %, P = 0,0162; P = 0,0237 vs WKY-kontrola; P = 0,003 vs SHR-kontrola; P = 0,0121 vs LNR-tempol).

W warunkach podstawowych maksymalna szybkość narastania ciśnienia w lewej komorze podczas skurczu, +(dP/dt)max, była istotnie większa w grupie SHR w porównaniu do WKY (2655,22 ± 111,33 mm Hg / s vs 2187,20 ± 71,03 111,33 mm Hg / s, P = 0,0014), a także LNR względem WKY (2841,25 ± 117,28 mm Hg / s vs 2187,20 ± 71,03 111,33 mm Hg / s, P = 0,0002; ryc. 26c). W grupie LNR otrzymującej tempol +(dP/dt)max była istotnie niższa niż w sercach wyizolowanych ze szczurów, którym go nie podawano (P = 0,0068). Po ischemii zaobserwowano znamienne obniżenie +(dP/dt)max we wszystkich sercach: w grupach, które nie otrzymywały tempola o: -80,83 ± 2,55% w sercach WKY, -61,27 ± 3,16% w SHR (P = 0,0135 vs WKY) i -82,21 ± 4,02 % w LNR (NS vs WKY). W sercach WKY i LNR wyizolowanych ze szczurów, które otrzymywały tempol redukcja +(dP/dt)max była mniejsza: -55,27 ± 3,15% w grupie WKY (P = 0,0096 vs kontrola), a w sercach LNR -60,47 ± 4,95 % (P = 0,0245 vs LNR-kontrola), natomiast w grupie SHR była nieistotnie większa. Po 20 min reperfuzji we wszystkich sercach stwierdzono istotnie niższe +(dP/dt)max niż przed ischemią: w grupie WKY +(dP/dt)max wynosiło 49,99 ± 4,45% wartości sprzed ischemii, w SHR -55,95 ± 3,11% (NS vs WKY), a w LNR 59,93 ± 5,05% (NS vs WKY). We wszystkich grupach, którym podawano tempol w 20 min reperfuzji +(dP/dt)max było większe niż u odpowiedników bez tempola (WKY-tempol: 77,42 ± 3,08 %, vs 49,99 ± 4,45% WKY bez tempola, P = 0,00755; SHR-tempol 71,96 ± 2,73, vs 55,95 ± 3,11% SHR bez tempola P = 0,0205; LNR-tempol 81,03 ± 2,11% vs 59,93 ± 5,05% LNR bez tempola, P = 0,005 vs LNR bez tempola).

W warunkach podstawowych ciśnienie końcowo-rozkurczowe w lewej komorze (EDP) zawierało się w przedziale od 3,99 ± 1,93 do 5,97 ± 1,03 mm Hg i nie różniło się między grupami. We wszystkich preparatach zarejestrowano dramatyczny wzrost EDP po ischemii, po czym w trakcie dalszej 20-minutowej reperfuzji EDP obniżało się, nie osiągając poziomu wyjściowego (ryc. 26a). Po 3 min. reperfuzji EDP było istotnie większe w grupie WKY w porównaniu do SHR (73,56 ± 6,81 mm Hg vs 49,15 ± 4,18 mm Hg, P = 0,0091) i LNR (73,56 ± 6,81 mm Hg vs 58,63 ± 4,55 mm Hg, P = 0,0351, NS: LNR vs SHR), natomiast po 20 min reperfuzji było istotnie większe w grupie SHR niż WKY (31,88 ± 2,40 mm Hg vs 21,20 ± 2,66 mm Hg, P = 0,0081) i LNR (31,88 ± 2,40 mm Hg vs 18,97 ± 1,46 mm Hg, P = 0,0004; NS: LNR vs WKY). We wszystkich okresach reperfuzji w sercach wyizolowanych ze szczurów, którym podawano tempol, EDP było wyraźnie niższe niż u odpowiedników, które tempola nie otrzymywały. Różnice

między poszczególnymi grupami nie były co prawda istotne statystycznie, ale występowały we wszystkich porównaniach międzygrupowych. Po 3 min reperfuzji w grupach, które otrzymywały tempol EDP było niższe od ich kontroli o: -20,81% w grupie WKY ( $P = 0,0919$ ; NS), - 20,12 % w SHR ( $P = 0,1130$ , NS) i o -19,58 % w LNR ( $P = 0,0698$ , NS), zaś po 20 minutach reperfuzji o: -21,95% w grupie WKY ( $P = 0,2240$ ; NS), - 10,32 % w SHR ( $P = 0,1736$ , NS) i o -15,25% w LNR ( $P = 0,1310$ , NS).



Ryc. 26. Ciśnienie końcowo-rozkurczowe w lewej komorze serca izolowanego (EDP), maksymalna szybkość spadku ciśnienia w lewej komorze serca podczas rozkurczu  $(-dP/dt)_{max}$ , maksymalna szybkość wzrostu ciśnienia w lewej komorze serca podczas skurczu  $(+dP/dt)_{max}$ ,

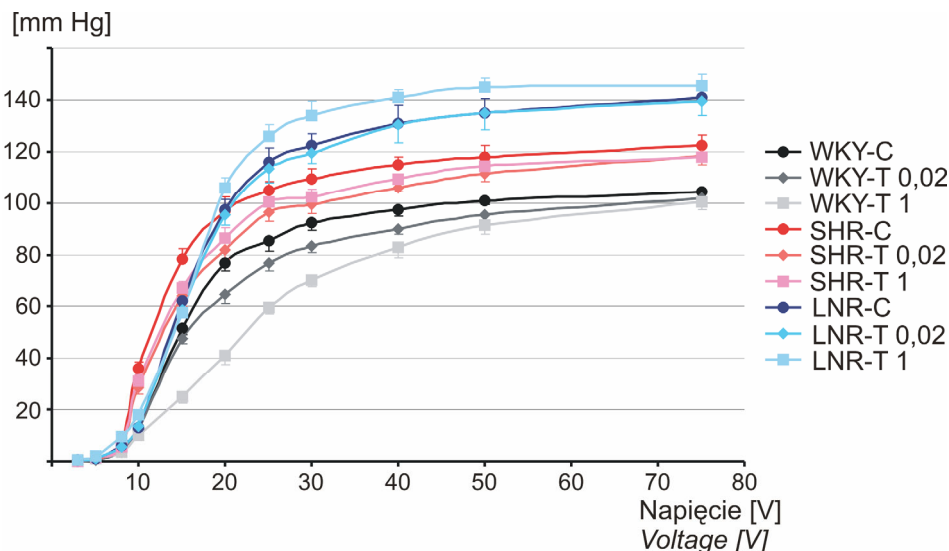
Fig. 26. Left ventricle end-diastolic pressure (EDP), maximal velocity of the left ventricle pressure decay in diastole  $(-dP/dt)_{max}$ , maximal velocity of the systolic left ventricle pressure development  $(+dP/dt)_{max}$ ;

W warunkach podstawowych maksymalna szybkość spadku ciśnienia w lewej komorze serca w rozkurczu  $-(dP/dt)_{max}$  była nieznacznie niższa w grupach SHR i LNR w porównaniu do WKY (SHR:  $1751,23 \pm 55,26$  mm Hg / s vs WKY:  $1838,50 \pm 178,36$  mm Hg / s, NS; LNR:  $1608,50 \pm 114,48$  mm Hg / s vs  $1838,50 \pm 178,36$  mm Hg / s, NS; ryc. 24b). W sercach wyizolowanych ze szczurów WKY i LNR, które otrzymywały tempol,  $-(dP/dt)_{max}$  było przed ischemią istotnie mniejsze niż u ich odpowiedników, które go nie otrzymywały (WKY-tempol:  $-1286,95 \pm 108,67$  mm Hg / s vs WKY-kontrola:  $-1838,50 \pm 178,36$  mm Hg / s,  $P = 0,0003$ ; LNR-tempol:  $-1429,37 \pm 61,08$  mm Hg / s vs LNR-kontrola:  $-1608,50 \pm 114,48$  mm Hg / s,  $P = 0,0267$ ), natomiast w obrębie grupy SHR  $-(dP/dt)_{max}$  było większe w grupie, której podawano tempol (SHR-tempol:  $-1901,34 \pm 41,12$  mm Hg / s vs WKY-kontrola:  $-1751,23 \pm 55,26$  mm Hg / s,  $P = 0,0365$ ). We wszystkich preparatach zarejestrowano znaczące zmniejszenie  $-(dP/dt)_{max}$  po ischemii, po czym w trakcie dalszej 20-minutowej reperfuzji  $-(dP/dt)_{max}$  wzrastało nie osiągając poziomu wyjściowego. Po 3 min reperfuzji redukcja  $-(dP/dt)_{max}$  była największa w grupie LNR ( $-79,57 \pm 6,65\%$ ), umiarkowana w sercach WKY ( $-51,73 \pm 5,05\%$ ,  $P = 0,0012$  vs LNR) i najmniejsza w grupie SHR ( $-37,05 \pm 5,89\%$ ,  $P < 0,0001$  vs LNR;  $P = 0,1398$ , NS vs WKY), natomiast po 20 min reperfuzji różnice międzygrupowe uległy zatarciu (WKY:  $-26,34 \pm 5,15\%$ , SHR:  $-20,83 \pm 6,15\%$ , LNR:  $-30,07 \pm 4,77\%$ ). W grupie WKY otrzymującej tempol  $-(dP/dt)_{max}$  podczas reperfuzji było istotnie mniejsze niż w sercach wyizolowanych od szczurów, którym go nie podawano i wynosiło po 3 min reperfuzji:  $-456,25 \pm 79,68$  mm Hg / s (vs WKY-kontrola:  $-887,53 \pm 125,28$  mm Hg / s,  $P = 0,0026$ ), a po 20 min reperfuzji:  $-900,46 \pm 71,17$  mm Hg / s (vs WKY-kontrola:  $-1354,28 \pm 112,07$  mm Hg / s,  $P = 0,0023$ ). W grupie SHR nie stwierdzono istotnych różnic między grupą której podawano tempol i jej kontrolą (po 3 min reperfuzji SHR-tempol:  $-1015,23 \pm 75,93$  mm Hg / s vs SHR-kontrola:  $-1102,45 \pm 135,36$  mm Hg / s, NS; po 20 min reperfuzji SHR-tempol:  $-1505,25 \pm 51,36$  mm Hg / s vs SHR-kontrola:  $-1325,78 \pm 65,45$  mm Hg / s, NS). W grupie LNR po 3 min reperfuzji  $-(dP/dt)_{max}$  było istotnie większe w grupie, której podawano tempol (LNR-tempol:  $-689,97 \pm 11,98$  mm Hg / s vs LNR-kontrola:  $-328,56 \pm 31,15$  mm Hg / s,  $P < 0,0001$ ), natomiast po 20 min od zakończenia ischemii różnic pomiędzy grupami nie stwierdzono (LNR-tempol:  $-1205,17 \pm 45,57$  mm Hg / s vs LNR-kontrola:  $-1124,71 \pm 69,04$  mm Hg / s, NS).

## 4.4. Preparat izolowanych tętnic krezkowych szczura

### 4.4.1. WPŁYW TEMPOLA NA PRZEBIEG ZALEŻNOŚCI MIĘDZY NAPIĘCIEM BODŹCA ELEKTRYCZNEGO I ODPOWIEDZIĄ NACZYNIOKURCZĄCĄ

Ciśnienie perfuzyjne (PP) przed stymulacją elektryczną wynosiło:  $38,25 \pm 2,25$ ,  $42,75 \pm 1,93$  oraz  $44,75 \pm 2,78$  mm Hg w grupach WKY, SHR i LNR. Tendencja do wyższych wartości PP w preparatach uzyskanych ze szczurów z nadciśnieniem tętniczym (SHR, LNR) była nieistotna pod względem statystycznym ( $P = 0,21$  SHR vs WKY i  $P = 0,08$  LNR vs. WKY). Wszystkie preparaty poddane stymulacji elektrycznej zareagowały wzrostem PP na stymulację elektryczną. Amplitudę odpowiedzi naczyniokurczących wywołanych przez stymulację elektryczną przedstawia ryc. 27. W zakresie bodźców o napięciu od 15 do 30V krzywe napięcie-odpowiedź są przesunięte w lewo w grupach SHR i LNR w stosunku do WKY.

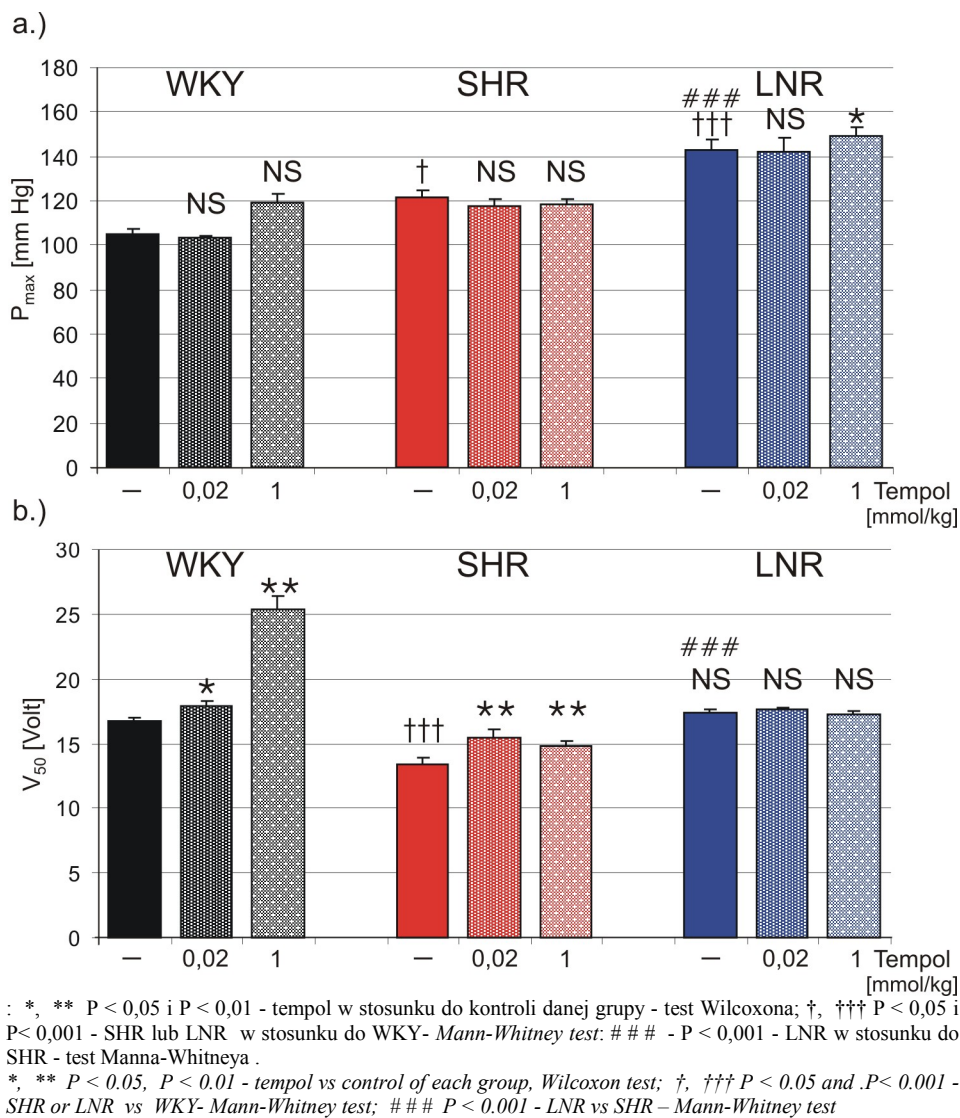


Ryc. 27. Wpływ tempola na krzywe napięcie bodźca – odpowiedź naczyniokurcząca wyznaczone przy stymulacji elektrycznej preparatu krezkowego. Sekwencje drażnienia – 30 s, częstotliwość 20 Hz, czas bodźca – 3 ms.

Fig. 27. Effect of tempol on the voltage – vasoconstrictive response plots assessed from the electrical stimulation of the mesenteric preparation 30 s trains, stimulation frequency – 20 Hz, stimulus duration – 3 ms.

Obie grupy nadciśnieniowe charakteryzuje większa odpowiedź maksymalna ( $P_{max}$ , ryc. 28a). W porównaniu do grup WKY i SHR, preparaty grupy LNR wykazywały istotnie większą wrażliwość na bodźce elektryczne, o czym świadczy większy maksymalny przyrost ciśnienia perfuzyjnego przypadający na jednostkę napięcia  $(dP/dV)_{max}$ ; ryc. 2 a), obserwowany w przedziale bodźców 10 – 20V. Natomiast  $(dP/dV)_{10-90\%}$  – średni przyrost odpowiedzi naczyniokurczącej przypadający na jednostkę napięcia, obliczony dla przedziału odpowiedzi od 10 do 90%  $P_{max}$ , (ryc. 29b), nie różnicuje poszczególnych grup. Napięcie bodźca wywołujące połowę odpowiedzi maksymalnej ( $V_{50}$ ) było najniższe w grupie SHR i było istotnie mniejsze niż w grupach WKY i LNR ( $P < 0,001$  vs WKY i  $P = 0,036$  vs LNR; (ryc 28b, tab.7).

Tempol nie wpłynął istotnie na maksymalną odpowiedź na stymulację elektryczną (ryc. 28a). W preparatach pochodzących od szczurów WKY i SHR tempol w sposób zależny od stężenia spowodował przesunięcie w prawo krzywej napięcie – odpowiedź (ryc. 27) oraz znamienne zwiększenie  $V_{50}$  (ryc. 28b, tab. 7). Natomiast w grupie LNR wpływ wysokiego, 1-milimolowego stężenia tempola na przebieg zależności między napięciem bodźca i odpowiedzią naczyniową był jakościowo odmienny: zarejestrowano zwiększenie przyrostu PP w odpowiedzi na bodźce w przedziale napięcia od 25 do 50V, przy nieistotnym zwiększeniu  $P_{max}$ . (ryc. 27). Największa szybkość przyrostu ciśnienia perfuzyjnego przypadającego na jednostkę bodźca  $-(dP/dV)_{max}$ , która określa wrażliwość preparatu, występowała w zakresie napięć od 10 do 20V.



Ryc. 28. Wpływ tempola na maksymalną odpowiedź naczyniokurczącą na stymulację elektryczną ( $P_{max}$ ) preparatu krezkowego i na napięcie bodźca wywołujące połowę odpowiedzi maksymalnej ( $V_{50}$ ).

Fig. 28. Effect of tempol on maximal vasoconstrictive response to electrical stimulation ( $P_{max}$ ) of the mesenteric preparation and on stimulus voltage which evokes half of the maximal response ( $V_{50}$ ).

Tab. 7. Napięcie bodźca elektrycznego wywołujące 50% (V50) maksymalnej odpowiedzi naczyniokurczącej

Tab. 7. Voltage of the electrical stimulation responsible for 50% (V50) of the maximal by vasoconstrictive response

<b>V50 jako % kontroli WKY (WKY-C)</b> V50 as a percent WKY-C									
Grupa Group	WKY			SHR			LNR		
Tempol [mmol/kg]	-	0,02	1	-	0,02	1	-	0,02	1
	100,0 ± 1,21			85,0 ±1,78			105,2 ±1,12		
P				<0,001†			0,036† <0,001#		

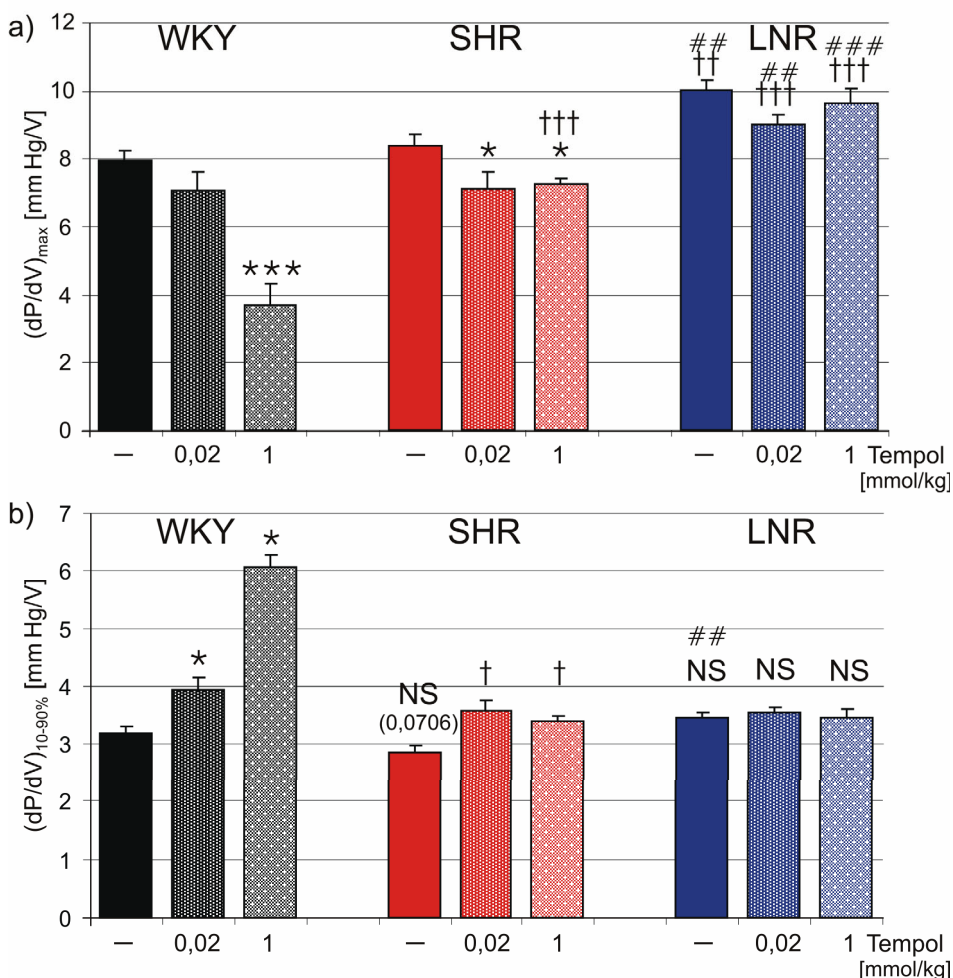
  

<b>V50 jako % kontroli danej grupy</b> V50 as a percent of the control of each group									
Grupa Group	WKY			SHR			LNR		
Tempol [mmol/kg]	-	0,02	1	-	0,02	1	-	0,02	1
	100,0 ±1,21	105,9 ±2,34	143,5 ±2,93	100,0 ±2,09	111,5 ±3,58	108,5 ±1,68	100,0 ±1,06	101,5 ±0,84	101,3 ±1,47
P		0,042*	0,018*		0,035*	0,021*		NS*	NS*

ANOVA z testami post hoc : \* tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; † SHR lub LNR w stosunku do WKY- test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR - test Fishera.

ANOVA followed by post-hoc tests: \* tempol vs. control of each group - Bonferroni test; † SHR or LNR vs. WKY - Dunnett test; # LNR vs. SHR - F test.

We wszystkich grupach zaobserwowano obniżenie wrażliwości preparatów krezki na bodźce elektryczne podczas perfuzji roztworem tempola (ryc 27), przy czym zmiana ta była statystycznie istotna w grupie WKY jedynie przy zastosowaniu 1-milimolowego stężenia, w grupie SHR - obu testowanych stężeń, zaś w preparatach LNR zaznaczyła się jedynie nieznamienista tendencja. Z kolei przy uwzględnieniu  $(dP/dV)_{10-90\%}$  -średniego przyrostu PP, odnoszącego się do niemal całego zakresu odpowiedzi naczyniokurczącej, tempol zwiększał w grupach WKY i SHR odpowiedź preparatu przypadającą na jednostkę bodźca.



ANOVA z testami post hoc : \*, \*\*\*  $P < 0,05$  i  $P < 0,001$  - tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; †, ††, †††  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$  - SHR lub LNR w stosunku do WKY- test Dunnetta; ##, ### -  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  - LNR w stosunku do SHR - test Fishera.

ANOVA followed by post-hoc tests: \*, \*\*\*  $P < 0,05$ ,  $P < 0,001$  - tempol vs control of each group, Bonferroni test; †, ††, †††  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  - SHR or LNR vs WKY- Dunnett test; ##, ###  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  - LNR vs SHR - F test.

Ryc. 29. a) Maksymalny przyrost ciśnienia perfuzyjnego (PP) przypadający na jednostkę przyrostu napięcia bodźca elektrycznego – (dP/dV)<sub>max</sub>; b) uśredniony przyrost PP przypadający na jednostkę przyrostu napięcia bodźca, w przedziale od 10 do 90% maksymalnej odpowiedzi naczyniokurczącej – (dP/dV)<sub>10-90%</sub>.

Fig. 29. a) Maximal increase of perfusion pressure (PP) with respect to the unit of increment in voltage of electrical stimulation – (dP/dV)<sub>max</sub>; b) averaged increase of PP with respect to the unit increment of the stimulation voltage, within the range of 10 – 90% of the maximal vasoconstrictive response – (dP/dV)<sub>10-90%</sub>.



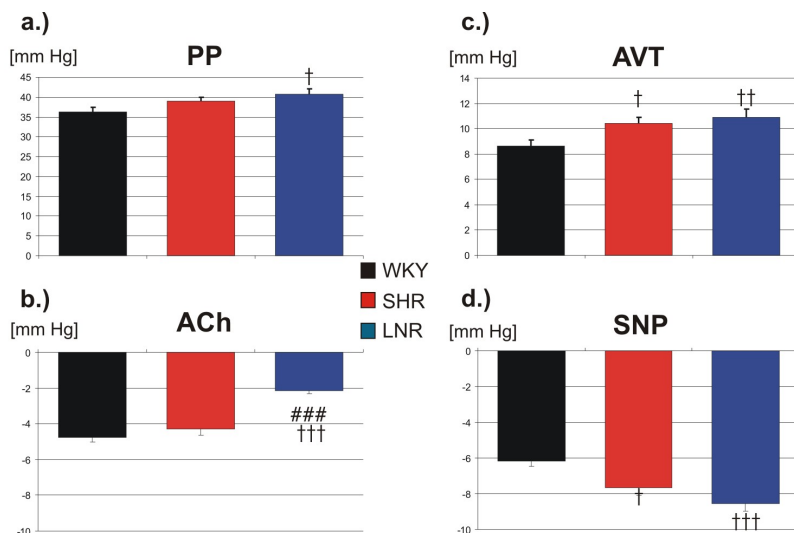
#### **4.4.2. WPŁYW ELIMINACJI ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO NA PRÓG POBUDLIWOŚCI I ODPOWIEDZI NACZYNIOKURCZĄCE PREPARATÓW KREZKOWYCH NA STYMULACJĘ ELEKTRYCZNĄ**

##### **4.4.2.1. Wpływ tempola na ciśnienie perfuzyjne, napięcie czynne mięśniówki naczyniowej preparatu krezkowego, odpowiedzi naczynioruchowe na acetylocholinę (ACh), nitroprusydek sodowy (SNP) i fenylefrynę (PE)**

W doświadczeniach opartych na Procedurach 3.3.2.2 i 3.3.2.3 odpowiedzi naczynioruchowe na acetylocholinę (ACh), nitroprusydek sodowy (SNP) i papawerynę (PAP) były bardzo zbliżone, co wynikało ze zbliżonych warunków eksperymentalnych. Dlatego dane liczbowe uzyskane z obu doświadczeń połączono, a wyniki obliczeń przedstawiono na ryc. 30.

Ciśnienie perfuzyjne ( $\Delta PP$ ), napięcie czynne mięśniówki gładkiej (AVT) oraz odpowiedź wazorelaksacyjna na ( $\Delta SNP$ ) były istotnie większe w grupach LNR i SHR w porównaniu do WKY (LNR > SHR > WKY) i nie różniły się istotnie pomiędzy preparatami LNR i SHR. Odpowiedź wazorelaksacyjna na ACh ( $\Delta ACh$ ) była znamienne większa w grupie WKY w porównaniu do preparatów SHR i LNR, przy czym w preparatach LNR była w przybliżeniu dwukrotnie mniejsza niż w SHR. Stwierdzono, że istnieje zależność między AVT a PP,  $\Delta ACh$  i  $\Delta SNP$ . W warunkach podstawowych AVT wynosiło  $8,62 \pm 0,48$  mm Hg w grupie WKY,  $10,42 \pm 0,50$  mm Hg w grupie SHR ( $P = 0,022$  vs WKY) i  $10,90 \pm 0,65$  mm Hg w grupie LNR ( $P = 0,0038$  vs WKY). W grupie WKY zaznaczył się słaby związek między AVT a PP i amplitudą testowanych odpowiedzi wazodepresyjnych na ACh i SNP, o czym świadczą niskie wartości współczynników korelacji liniowej  $r$ , o poziomie istotności zbliżonym do przyjętego za znamienne (tab. 8). W obu grupach nadciśnieniowych: SHR i LNR występowała silna odwrotna zależność między AVT i  $\Delta SNP$ , na poziomie istotności statystycznej mniejszym od 0,001, a także między AVT i  $\Delta ACh$ , co szczególnie zaznaczyło się w preparatach grupy SHR.

Tempol zwiększał odpowiedź wazorelaksacyjną na ACh i SNP oraz obniżał PP. Ogólny, zależny od stężenia, ilościowy profil modulującego działania tempola był podobny w badanych grupach preparatów (ryc. 30a-c). Tempol nasilał odpowiedź wazorelaksacyjną na ACh (ryc. 31), w największym stopniu w grupie SHR. W preparatach WKY istotny wpływ tempola zaznaczył się przy jego 0,1 i 1 milimolowych stężeniach, zaś maksymalny efekt modulujący (zwiększenie odpowiedzi o  $12,21 \pm 4,35\%$ ) wystąpił w stężeniu 0,1 milimolowym tempola. W grupie SHR znamienne wpływ tempola uwidocznił się w szerszym zakresie stężeń, od 20  $\mu\text{mol/l}$  do stężenia 1 milimolowego, zaś maksymalny efekt, pogłębienie odpowiedzi o  $22,90 \pm 5,06\%$ , zaznaczył się przy stężeniu 0,1 milimolowym i był o 87,55 % większy niż w grupie WKY. W grupie LNR wpływ tempola na odpowiedź na ACh był w poszczególnych preparatach zróżnicowany, o czym świadczą względnie wysokie wartości błędu standardowego średniej arytmetycznej (SEM). Stąd też jedynie nasilenie odpowiedzi na ACh ( $22,85 \pm 6,88$  %) przez 1-milimolowe stężenie tempola było statystycznie znamienne (zwiększenie odpowiedzi o  $22,85 \pm 6,88\%$ ) i było o 87,14% większe niż w grupie WKY.

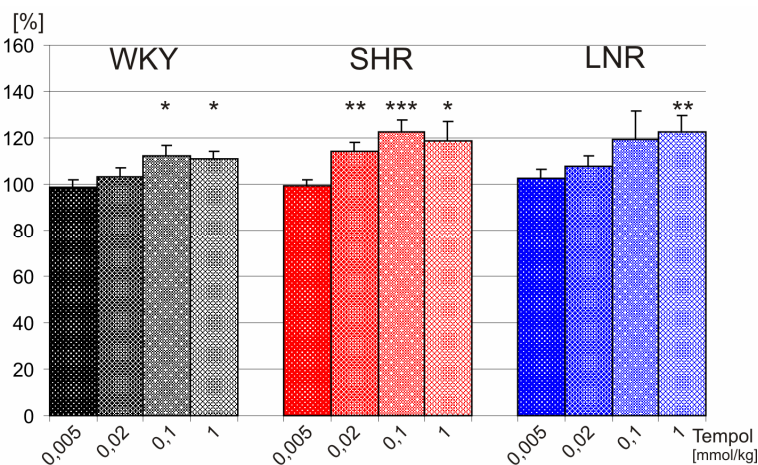


ANOVA z testami post hoc : †, ††, †††  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$  - SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Dunnetta; ### -  $P < 0,001$  - LNR w stosunku do SHR - test Fishera. /

ANOVA followed by post-hoc tests: †, ††, †††  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  - SHR or LNR vs WKY - Dunnett test;; ###  $P < 0,001$  - LNR vs SHR - F test.

Ryc. 30. Ciśnienie perfuzyjne (PP), napięcie czynne mięśniówki naczyniowej (AVT) oraz odpowiedzi wazorelaksacyjne na acetylocholinę (ACh) i nitroprusydek sodowy (SNP) w preparatach izolowanych tętnic krezkowych.

Fig. 30. Perfusion pressure (PP), active vascular tone (AVT), vasodepressive responses to acetylcholine (ACh), and sodium nitroprusside (SNP) in the isolated system of arterial mesenteric vessels.

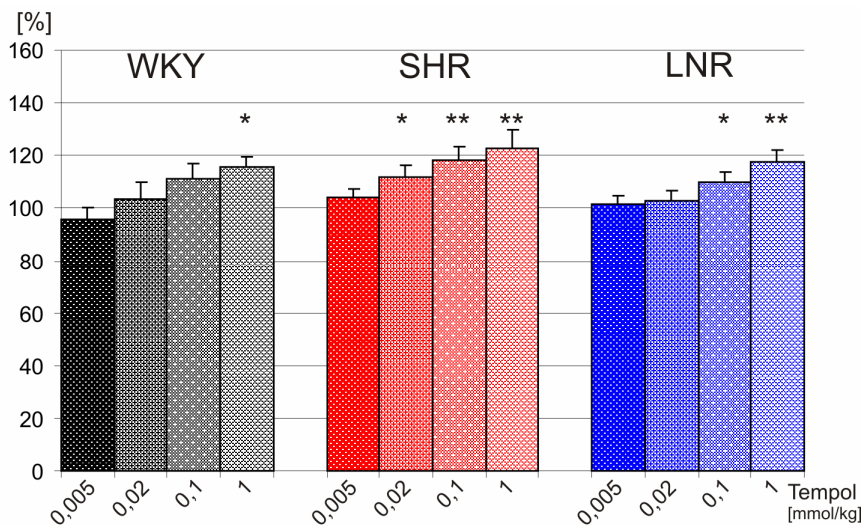


ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05$ ,  $0,01$  i  $0,001$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni;

ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05$ ,  $0,01$  i  $0,001$  tempol vs control of each group, Bonferroni test;

Ryc. 31. Wpływ tempola na odpowiedź wazorelaksacyjną na acetylocholinę (ACh), wyrażony w wartościach procentowych odpowiedzi kontrolnej.

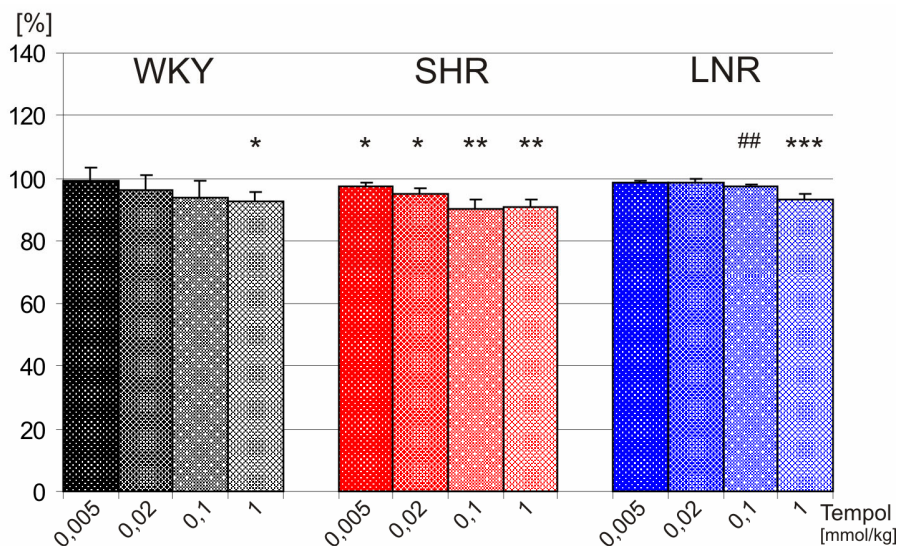
Fig. 31. Effect of tempol on the vasodepressive response to acetylcholine (ACh) expressed as a percent of the control response.



ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05, 0,01$  i  $0,001$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05, 0,01$  i  $0,001$  tempol vs control of each group, Bonferroni test;

Ryc. 32. Wpływ tempola na odpowiedź wazoreksacyjną na nitroprusydek sodowy (SNP), wyrażony w wartościach procentowych odpowiedzi kontrolnej.

Fig. 32. Effect of tempol on the vasodepressive response to sodium nitroprusside (SNP) expressed as a percent of the control response.



ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05, 0,01$  i  $0,001$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; #  $P < 0,05$  LNR w stosunku do SHR / ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05, 0,01$  i  $0,001$  tempol vs control of each group, Bonferroni test; #  $P < 0,05$  LNR vs SHR

Ryc. 33. Wpływ tempola na ciśnienie perfuzyjne (PP), wyrażony w wartościach procentowych odpowiedzi kontrolnej.

Fig. 33. Effect of tempol on perfusion pressure (PP) expressed as a percent of the control response.

Tab. 8. Współczynniki korelacji ( $r$ ) między napięciem czynnym naczyń preparatu krezkowego (AVT) a ciśnieniem perfuzyjnym (PP), odpowiedzią wazorelaksacyjną na acetylocho-linę (ACh) i nitroprusydek sodowy (SNP).

Tab. 8. Correlation coefficients of the relationships between active vascular tone (AVT) of the mesenteric preparation, perfusion pressure (PP), vasodepressive response to acetyl-choline (ACh), and sodium nitroprusside (SNP).

Zmienne / Variables			Grupa / Group		
x	y		WKY	SHR	LNR
AVT [mm Hg]	PP [mm Hg]	$r$	0,3830	0,4583	0,4913
		$P$ (N = 26)	0,0534; NS	0,0212	0,0108
	$\Delta$ ACh [mm Hg]	$r$	- 0,4621	- 0,7466	- 0,5153
		$P$ (N = 25)	0,0177	< 0,00002	0,0071
	$\Delta$ SNP [mm Hg]	$r$	- 0,3618	- 0,7241	- 0,8453
		$P$ (N = 26)	0,0693; NS	< 0,00005	< 0,00001

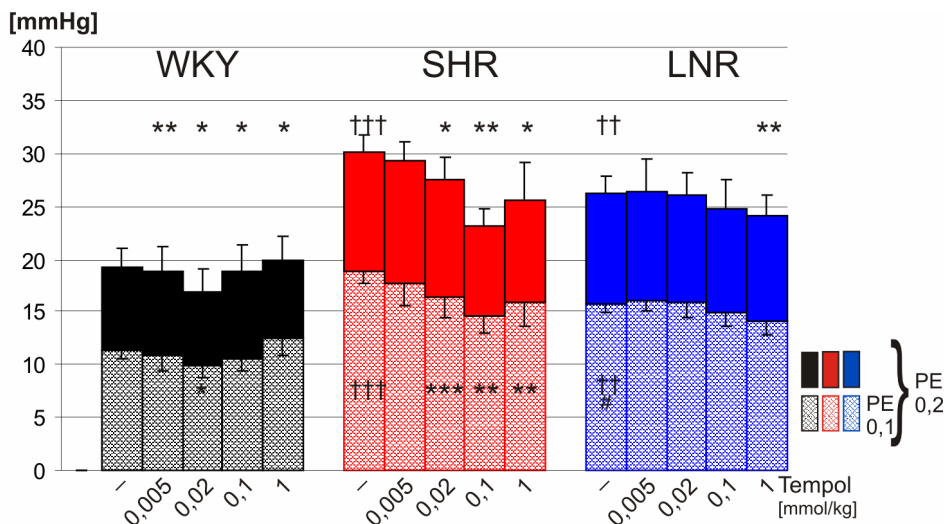
AVT – różnica między ciśnieniem perfuzyjnym (PP) przed stymulacją elektryczną a najniższym PP zarejestrowanym po podaniu papaweryny;  $\Delta$  ACh,  $\Delta$  SNP – największa zmiana PP po podaniu ACh (1  $\mu$ g), lub SNP (1  $\mu$ g);  $r$  – współczynnik korelacji Pearsona;  $P$  – poziom istotności  $r$ .

AVT – difference between perfusion pressure (PP) prior to the electrical stimulation and the lowest PP recorded after papaverine administration;  $\Delta$  ACh,  $\Delta$  SNP – maximal change of PP after ACh, or SNP administration;  $r$  – Pearson linear correlation coefficient;  $P$  – significance level of  $r$ .

We wszystkich grupach tempol pogłębiał odpowiedź wazorelaksacyjną na SNP w sposób proporcjonalny do logarytmu jego stężenia (ryc. 32). W grupie WKY znamiennej wpływ tempola zaznaczył się jedynie w przy stężeniu tempola 1-milimolowym, w grupie LNR – 0,1 i 1-milimolowym, zaś w preparatach SHR w zakresie stężeń od 20 $\mu$ - do 1-milimolowego. W porównaniu do grupy WKY, w której maksymalny efekt tempola oznaczał zwiększenie odpowiedzi o  $15,91 \pm 3,50\%$  w stosunku do kontroli, w preparatach SHR i LNR maksymalne działanie było nieznamienne większe (SHR:  $+22,79 \pm 6,88\%$ ; LNR:  $+17,35 \pm 4,63\%$ ).

W preparatach krezki wyizolowanych ze szczurów WKY i LNR tempol obniżał PP w sposób statystycznie znamiennej jedynie w stężeniu 1-milimolowym (obniżenie PP o  $6,52 \pm 3,15\%$  i  $6,46 \pm 1,40\%$ ; ryc. 33). Natomiast w grupie SHR umiarkowany, lecz statystycznie istotny wpływ tempola zaznaczył się w całym testowanym przedziale stężeń (0,005 – 1 mmol/l), zaś maksymalny efekt – obniżenie PP o  $9,43 \pm 2,88\%$  odpowiedzi wyjściowej, występował przy stężeniu 100- $\mu$ molowym.

Wszystkie preparaty krezki zareagowały wzrostem PP na fenylefrynę (PE). Odpowiedzi naczyniokurczące na obie testowane dawki PE: 0,1 i 0,2 ng były istotnie większe w grupie SHR w stosunku do WKY (o 62,50 i 55,82%; dawki PE – 0,1 i 0,2 ng), także w preparatach LNR w stosunku do WKY (o 38,02 i 35,99%; dawki PE – 0,1 i 0,2 ng), przy czym przyrosty PP pod wpływem PE były znamiennej większe w grupie SHR w porównaniu do LNR (ryc. 34).



ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05, 0,01$  i  $0,001$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; #  $P < 0,05$  LNR w stosunku do SHR; ††, †††  $P < 0,01$  i  $< 0,001$  - SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Dunnetta; # -  $P < 0,05$  - LNR w stosunku do SHR - test Fishera.

ANOVA: \*, \*\*, \*\*\*  $P < 0,05, 0,01$  i  $0,001$  tempol vs control of each group, Bonferroni test; #  $P < 0,05$  LNR vs SHR; †, ††, †††  $P < 0,05, .P < 0,01, P < 0,001$  - SHR or LNR vs WKY - Dunnett test; # -  $P < 0,05$  - LNR vs SHR - F test.

Ryc. 34. Wpływ tempola na odpowiedzi naczyniokurczące na fenylefrynę (PE)

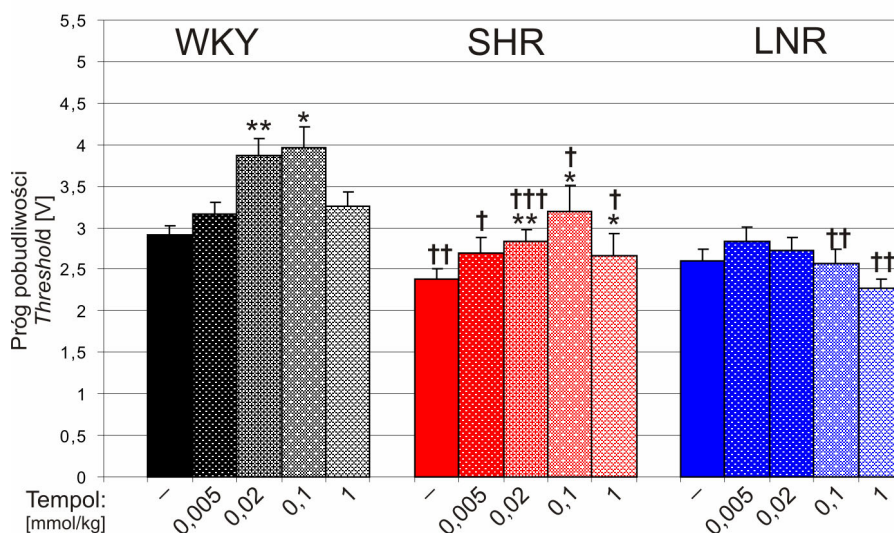
Fig. 34. Effect of tempol on the vasoconstrictive responses to phenylephrine (PE)

W preparatach WKY tempol jedynie w stężeniu 20- $\mu$ molowym zmniejszył odpowiedź naczyniokurczącą na obie dawki PE (-13,55% i -12,47%; dawki PE – 0,1 i 0,2 ng), w stężeniu niższym (5- $\mu$ mol/l) i wyższych (0,1 i 1mmol/l) praktycznie nie wywierał wpływu. Począwszy od stężenia 20- $\mu$ molowego tempola w grupie LNR zaznaczyła się tendencja do hamowania przez tempol odpowiedzi na PE, ale dopiero efekt 1-milimolowego stężenia tempola był statystycznie znamienne (-0,38% i -9,07%; dawki PE – 0,1 i 0,2 ng). W preparatach SHR tempol istotnie ograniczał odpowiedź naczyniokurczącą na PE w przedziale stężeń od 20 $\mu$ mol/l do 1 mmol/l, a maksymalny efekt hamowania wystąpił przy stężeniu 100- $\mu$ molowym (-22,41% i -23,09%; dawki PE: 0,1 i 0,2 ng).

#### 4.4.2.2. Wpływ tempola na próg pobudliwości preparatów tętnic krezkowych na stymulację elektryczną

Próg pobudliwości preparatów krezkowych na stymulację elektryczną był istotnie niższy w grupie SHR w porównaniu do WKY (-18,51%,  $P = 0,004$ ) i nieznamiennie niższy od w grupie LNR w stosunku do (-10,86%;  $P = 0,2212$ ; ryc. 35). Tempol istotnie zwiększył próg pobudliwości w grupie WKY, w stężeniach 0,1 i 1-milimolowym (maksymalnie o 35,96%;  $P = 0,012$ ) i w grupie SHR, w przedziale stężeń 0,02 – 1 mmol/l (maksymalnie o 34,45%;  $P = 0,026$ ), natomiast jego wpływ w preparatach LNR był statystycznie pomijalny. Zwraca uwagę obserwacja, że grupie LNR 1-milimolowe stęże-

nia tempola przyczyniło się do nieistotnego obniżenia progu pobudliwości, o -12,81% do wartości  $2,27 \pm 0,12$  V, najniższej w przebiegu doświadczenia.



ANOVA: \*, \*\*\*  $P < 0,05$  i  $< 0,01$  - tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; †, ††, †††  $P < 0,05$ ,  $< 0,01$  i  $< 0,001$  - SHR lub LNR w stosunku do odpowiadającego WKY- test t-Studenta, ANOVA: \*, \*\*  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  - tempol vs control of each group, Bonferroni test; †, ††, †††  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  - SHR or LNR vs respective WKY- t test.

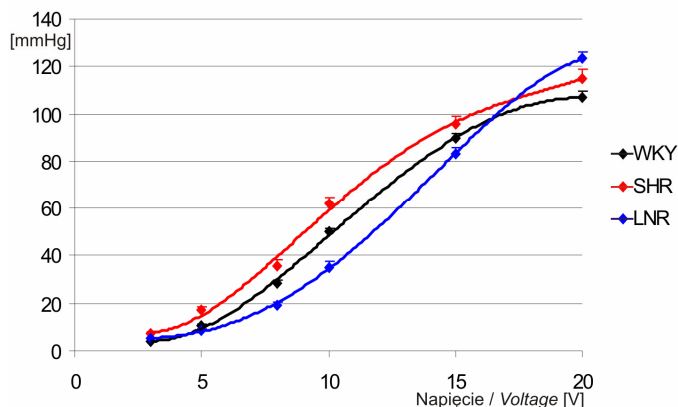
Ryc. 35. Wpływ tempola na próg pobudliwości izolowanych tętnic krezkowych na stymulację elektryczną.

Fig. 35. Effect of tempol on threshold of the isolated mesenteric arteries to electrical stimulation.

Analogicznie, w grupach WKY i SHR próg pobudliwości przy zastosowaniu 1-milimolowego stężenia tempola był istotnie niższy od obserwowanego przy stężeniu o rząd niższym (-17,63% –WKY; -16,57% – SHR; tempol 1 mmol/l vs 0,1 mmol/l). W poszczególnych grupach doświadczalnych nie wykazano istotnego związku między progiem pobudliwości na stymulację elektryczną a: odpowiedzią wazorelaksacyjną na ACh (WKY:  $r = 0,0399$ , NS; SHR:  $r = 0,0985$ , NS; LNR:  $r = 0,4282$ , NS), odpowiedzią wazorelaksacyjną na SNP (WKY:  $r = 0,0995$ , NS; SHR:  $r = 0,1263$ , NS; LNR:  $r = 0,1052$ , NS), napięciem czynnym mięśniówki naczyniowej (AVT; WKY:  $r = 0,5434$ , NS; SHR:  $r = 0,1493$ , NS; LNR:  $r = 0,2334$ , NS). W preparatach WKY i SHR podwyższenie przez tempol progu pobudliwości na stymulację elektryczną ( $\Delta$  próg pobudliwości) było odwrotnie proporcjonalne od odpowiedzi wazorelaksacyjnej na ACh, szczególnie przy 0,1-milimolowym stężeniu tempola (WKY:  $r = -0,8534$ ;  $P = 0,031$ ; SHR:  $r = -0,8703$ ,  $P = 0,024$ ), zaś w grupie LNR znaczącej korelacji nie stwierdzono (największa wartość  $r = 0,4656$ ,  $P = 0,356$ , NS, tempol 0,1 mmol/l). Nie wykazano istotnego związku między AVT i odpowiedzią wazorelaksacyjną na SNP a modulującym wpływem tempola na próg pobudliwości stymulacji elektrycznej, o czym świadczą niskie wartości współczynników korelacji ( $r < 10,65$ ;  $P > 0,15$ ).

#### 4.4.2.3. Wpływ tempola na charakterystykę odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną

Rycina 36 przedstawia krzywe napięcie – reakcja naczyniokurcząca dla zakresu bodźców zastosowanych w Procedurze 3.3.2.3. (3–20V).



Ryc. 36. Porównanie krzywych: napięcie bodźca – odpowiedź naczyniokurcząca wyznaczonych przy stymulacji elektrycznej preparatu kręzkowego. Sekwencje drażnienia – 30s, częstotliwość 10 Hz, czas bodźca – 4 ms.

*Fig. 36. Comparison of the voltage – vasoconstrictive response plots assessed from the electrical stimulation of the mesenteric preparation. 30 s trains, stimulation frequency – 10 Hz, stimulus duration – 4 ms.*

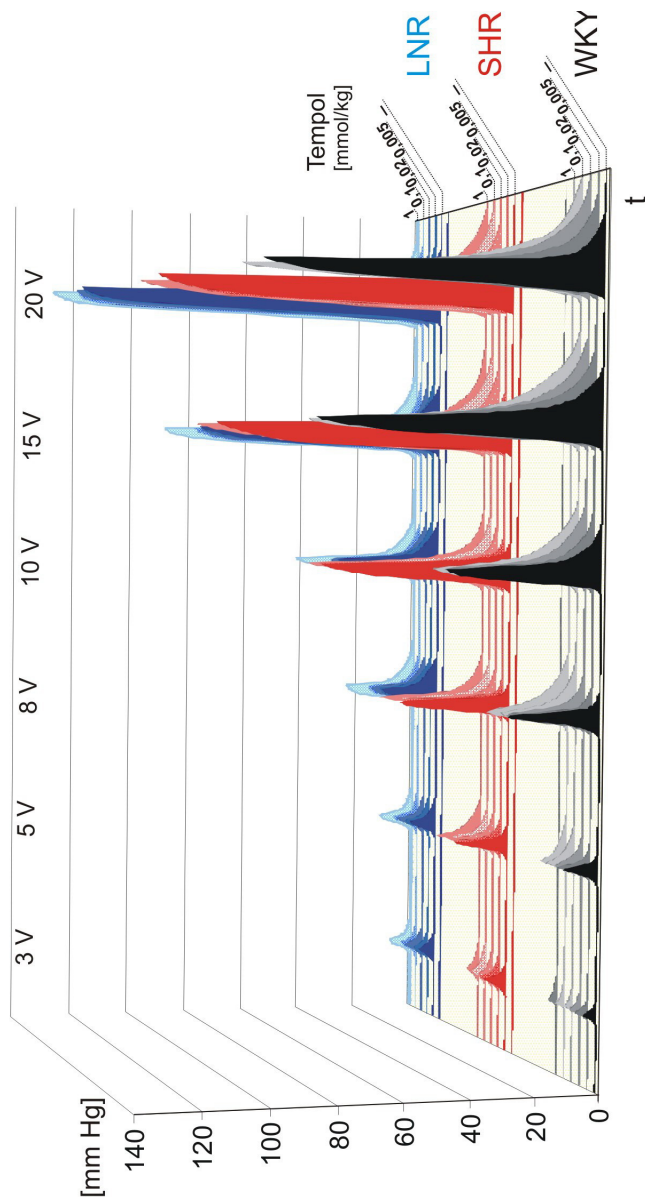
W stosunku do krzywej grupy WKY, krzywa w grupie SHR jest istotnie przesunięta w lewo w całym zakresie bodźców, zaś grupy LNR w prawo, w zakresie napięć od 5 do około 17 V (ryc. 36, tab. 9). W preparatach LNR odpowiedź naczyniokurcząca na bodźce o napięciu 20V jest znamienne większa od wywołanej w grupie SHR i WKY. Preparaty wyizolowane ze szczurów nadciśnieniowych: SHR i LNR wykazały istotnie większą odpowiedź na najniższy ze stosowanych bodźców, o napięciu 3V (SHR: +92,8%, LNR: +37,07% względem WKY; tab. 10).

Przebieg w czasie odpowiedzi naczyniokurczących na poszczególne serie bodźców elektrycznych zestawiono zbiorczo na ryc. 37. Niezależnie od napięcia bodźca w grupach WKY i SHR tempol wyraźnie wydłużał czas powrotu PP do wartości wyjściowych.

W grupie WKY w przedziale napięć od 5 do 20V, a w grupie SHR w zakresie od 3 do 15V tempol istotnie zmniejszał amplitudę odpowiedzi naczyniokurczącej. Ograniczenie tej odpowiedzi miało charakter marginalny, przy najwyższym z zastosowanych stężeń tempola – 1-milimolowym: w grupie WKY przy reakcji na bodziec 20V, zaś w SHR także na 10 i 15V (ryc. 38; tab.10). W preparatach LNR tempol w stężeniu 0,02 i 0,1 mmol/l nieznacznie, choć w sposób znamieny statystycznie zmniejszał amplitudę odpowiedzi na serię bodźców 8-woltowych, nie wpływając na pozostałe reakcje naczyniokurczące wywoływane przez bodźce o napięciu 3, 5 i 10V. Zwraca uwagę fakt istotnego nasilenia przez 0,1 i 1-milimolowe stężenie tempola odpowiedzi naczyniokurczącej indukowanej przez stymulację o napięciu 15 V oraz przez 5 i 20- $\mu$ molowe stężenia tempola reakcji wywołanej przez 20-woltowe napięcie bodźca.

Ryc. 37. Przebieg odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną  
*Fig. 37. Time-course of the vasoconstrictive response to electrical stimulation*

Sekwencje drażnienia – 30 s, częstotliwość 10 Hz, czas bodźca – 4 ms  
 Zwraca uwagę wydłużenie powrotu do wyjściowego ciśnienia perfuzyjnego pod wpływem tempola  
 30 s trains, stimulation frequency – 10 Hz, stimulus duration – 4 ms  
 Prolongation of the recovery from the increase of perfusion pressure is here the outstanding point



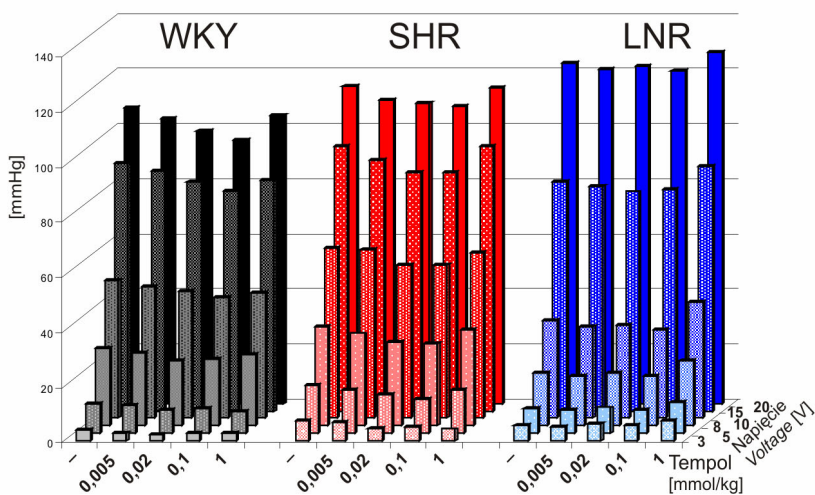


Tab. 9. Porównanie odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną układu izolowanych tętnic kręgowych perfundowanego ze stałą szybkością.

Tab. 9. Comparison of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation of the isolated system of mesenteric arteries perfused at a constant flow

Napięcie Voltage [V]	WKY [mm Hg]	SHR [mm Hg]	LNR [mm Hg]
3	3,75 ± 0,47	7,23 ± 0,56	5,14 ± 0,38
	N=16	N=13 P<0,001†	N=14 P=0,039† P=0,004#
5	10,56 ± 0,72	17,00 ± 1,42	8,79 ± 0,49
	N=16	N=13 P<0,001†	N=14 P=0,049† P<0,001#
8	28,13 ± 1,32	35,85 ± 2,18	19,21 ± 1,12
	N=16	N=13 P=0,002†	N=14 P=0,002† P<0,001#
10	49,94 ± 1,78	61,92 ± 2,60	35,21 ± 2,12
	N=16	N=13 P<0,001†	N=14 P<0,001† P<0,001#
15	89,63 ± 2,25	96,08 ± 3,15	83,21 ± 2,96
	N=16	N=13 NS †	N=14 NS † P=0,003#
20	107,00 ± 2,75	114,92 ± 3,76	123,21 ± 3,19
	N=16	N=13 NS †	N=14 P<0,001† NS #

ANOVA: † SHR lub LNR w stosunku do WKY, test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR, test Fishera.  
ANOVA: † SHR or LNR vs WKY - Dunnett test; # LNR vs SHR - F test.



Ryc. 38. Amplituda odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną.

Fig. 38. Amplitude of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation.

Tab. 10. Wpływ tempola na odpowiedzi naczyniokurczące na stymulację elektryczną.  
 Tab. 10. Effect of tempol on the vasoconstrictive responses to electrical stimulation.

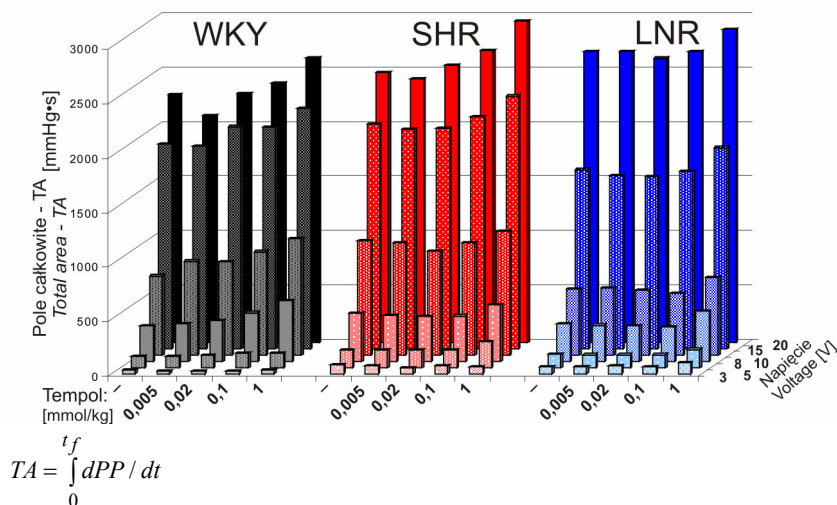
Napięcie Voltage [V]	Tempol [mM/kg]	WKY		SHR		LNR	
		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]	
3	0,005	-26,56 ± 9,18 N=8 NS		-19,17 ± 5,73 N=6 P=0,019		-2,38 ± 4,97†# N=7 NS	
	0,02	-5,79 ± 6,17 N=8 NS		-13,07 ± 3,82† N=6 P=0,017		-7,38 ± 3,95# N=7 NS	
	0,1	-5,90 ± 2,52 N=8 NS		-10,96 ± 3,62† N=6 P=0,019		-5,35 ± 3,48# N=7 NS	
	1	-5,33 ± 2,47 N=8 NS		-4,55 ± 2,60 N=6 NS		-3,97 ± 2,23 N=7 NS	
5	0,005	-2,75 ± 0,86 N=8 P=0,014		-6,23 ± 2,92† N=6 NS		-1,88 ± 1,70# N=7 NS	
	0,02	-3,65 ± 1,05 N=8 P=0,006		-5,73 ± 1,17 N=6 P=0,002		-1,67 ± 0,91# N=7 NS	
	0,1	-48,44 ± 10,56 N=8 P=0,025		-39,08 ± 5,90 N=7 P=0,003		12,99 ± 5,56†# N=7 NS	
	1	-22,41 ± 7,35 N=8 P=0,018		-19,57 ± 5,72 N=7 P=0,005		1,39 ± 6,70†# N=7 NS	
8	0,005	-19,32 ± 4,91 N=8 P=0,003		-16,53 ± 1,82 N=7 P<0,001		-3,59 ± 3,32†# N=7 NS	
	0,02	-8,68 ± 3,30 N=8 P=0,025		-10,20 ± 2,90 N=7 P=0,014		-6,51 ± 2,30 N=7 P=0,018	
	0,1	-7,59 ± 1,98 N=8 P=0,005		-9,37 ± 3,00 N=7 P=0,022		-7,22 ± 1,72 N=7 P=0,004	
	1	-7,57 ± 1,23 N=8 P<0,001		-5,95 ± 2,29 N=7 P=0,044		-2,55 ± 1,17†# N=7 NS	
10	0,005	-34,52 ± 8,42 N=8 P=0,011		-29,64 ± 4,34 N=7 P=0,05		8,23 ± 5,59†# N=8 NS	
	0,02	-19,02 ± 4,75 N=8 P=0,009		-22,70 ± 3,55 N=7 P=0,007		0,35 ± 3,27†# N=8 NS	
	0,1	-14,98 ± 4,14 N=8 P=0,009		-14,51 ± 6,04 N=7 P=0,049		-3,12 ± 3,58†# N=8 NS	
	1	-12,86 ± 2,80 N=8 P=0,0012		-8,00 ± 4,79† N=7 NS		-6,31 ± 3,16† N=8 NS	
15	0,005	-10,97 ± 1,70 N=8 P<0,001		-8,54 ± 4,37 N=7 NS		-0,67 ± 1,22†# N=8 NS	
	0,02	-11,12 ± 2,14 N=8 P=0,0014		-4,03 ± 1,32† N=7 P=0,0183		0,49 ± 1,07†# N=8 NS	
	0,1	-30,06 ± 15,86 N=8 NS		-42,35 ± 8,38 N=6 P=0,0051		37,22 ± 8,24 N=6 P=0,019	
	1	-27,23 ± 7,29 N=8 P=0,007		-10,30 ± 10,24† N=6 NS		27,78 ± 4,68†# N=6 P=0,007	
20	0,005	-7,71 ± 6,45 N=8 P=0,05		-5,82 ± 10,86 N=6 NS		18,04 ± 4,88†# N=6 P=0,032	
	0,02	-9,28 ± 2,98 N=8 P=0,021		-4,59 ± 7,34 N=6 NS		14,88 ± 2,51# N=6 P=0,009	
	0,1	-6,21 ± 2,63 N=8 P=0,044		-3,11 ± 5,14 N=6 NS		4,91 ± 3,40†# N=6 NS	
	1	-2,96 ± 2,75 N=8 NS		-1,05 ± 1,96 N=6 NS		2,80 ± 1,18†# N=6 NS	

ANOVA: - P – poziom istotności różnic: tempol względem kontroli dla danego napięcia; test Bonferroniego

ANOVA: P – significance level: tempol vs control of each voltage; Bonferroni test

† - P<0,05 SHR, LNR vs. WKY - Dunnett test; # P<0,05 LNR vs. SHR - F-test

Pole powierzchni odpowiedzi naczyniokurczącej w czasie (TA) na stymulację elektryczną wzrasta proporcjonalnie ze wzrostem napięcia bodźca (tab. 11). W porównaniu do preparatów WKY, TA jest istotnie większe w grupie SHR w przedziale napięć od 3 do 10 V i LNR w zakresie bodźców 3 i 5 V. TA wyznaczona dla odpowiedzi na stymulację elektryczną 10 i 15 V była istotnie mniejsza w grupie LNR w stosunku do WKY. Zestawienie zbiorcze pól powierzchni odpowiedzi naczyniokurczących w czasie na stymulację elektryczną (TA) przedstawiono na ryc. 39. Wpływ tempola na TA jest zróżnicowany i zależy od jego stężenia, napięcia bodźca i testowanej grupy (tab.12). Tempol zmniejsza TA w preparatach grupy WKY stymulowanych serią bodźców o napięciu 5 V (stężenie tempola 0,02 i 0,1 mmol/l), w grupie SHR – bodźcami 8 V (0,005 i 0,2 mmol/l), zaś LNR – bodźcami w przedziale 5 do 10 V (5 V – 1 mmol/l; 8 V – 0,005 mmol/l; 10 V – od 0,02 do 1 mmol/l). Tempol istotnie zwiększa TA w preparatach WKY pobudzanych bodźcami o napięciu 10 – 20 V (10 V – stężenia: 0,02 – 1 mmol/l; 15 V: stężenia 0,1 i 1 mmol/l, 20 V – w całym zakresie stosowanych stężeń), a także w preparatach SHR i LNR stymulowanych bodźcami o napięciu 15 i 20 V (SHR: 0,02 – 1 mmol/l; LNR: 15 V – 0,1 do 1 mmol/l, 20V – 0,005 do 0,2 mmol/l).



0 – czas rozpoczęcia 30-sekundowej stymulacji elektrycznej  $t_f$  – czas zakończenia odpowiedzi naczyniokurczącej, PP – ciśnienie perfuzyjne / 0 – initiation of 30-s electrical stimulation,  $t_f$  – final time of the vasoconstrictive response; PP – perfusion pressure

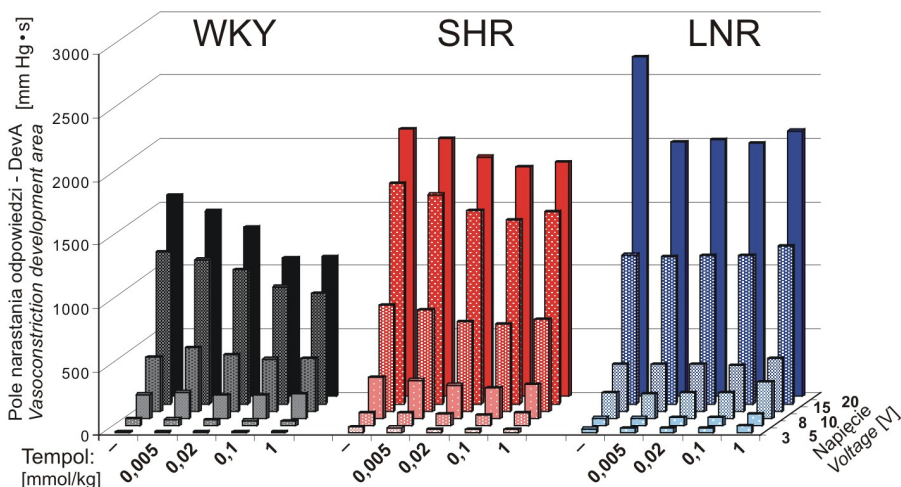
Ryc. 39. Pole odpowiedzi naczyniokurczących (TA) na stymulację elektryczną  
 Fig. 39. Total area (TA) of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation

Zestawienie zbiorcze pól powierzchni narastania w czasie odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną (IncrA) przedstawiono na ryc. 40. W całym zakresie zastosowanych bodźców elektrycznych, od 3 do 20 V, pole narastania odpowiedzi naczyniokurczącej (IncrA), wyodrębnione z TA, było znamienne większe w grupie SHR w porównaniu do WKY (tab. 13). Preparaty LNR rozwijały IncrA większe niż WKY przy stymulacji bodźcami elektrycznymi o napięciach 3 i 20 V. Tempol zmniejszał IncrA w szerokim zakresie stosowanych stężeń zarówno w grupie SHR, jak też WKY, przy czym w preparatach SHR efekt ten wystąpił w pełnym zakresie testowanych stężeń i odnosił się do pełnego przedziału zastosowanych bodźców elektrycznych (tab 13).

Tab. 11. Porównanie całkowitych pól odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną układu izolowanych tętnic krezkowych perfundowanego ze stałą szybkością.  
 Tab. 11. Comparison of the total area of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation of the isolated mesenteric arteries perfused at a constant flow.

Napięcie Voltage [V]	WKY [mm Hg * s]	SHR		LNR	
		[%WKY dla danego V] [%WKY at a given V]		[%WKY dla danego V] [%WKY at a given V]	
3	33,9 ± 3,1	232,0 ± 4,2		197,9 ± 3,9	
	N=16	N=13	P<0,0001†	N=14	P<0,0001† P=0,0121#
5	112,3 ± 9,6	143,2 ± 4,3		111,9 ± 2,9	
	N=16	N=13	P=0,0004†	N=14	P=0,0205† P=0,0025#
8	342,2 ± 18,6	128,6 ± 4,7		101,7 ± 4,1	
	N=16	N=13	P=0,0004†	N=14	NS† P=0,0012#
10	760,5 ± 29,2	138,5 ± 2,8		80,0 ± 4,2	
	N=16	N=13	P<0,0001†	N=14	P=0,0036† P<0,0001#
15	1966,0 ± 64,2	105,2 ± 2,1		83,7 ± 2,1	
	N=16	N=13	NS†	N=14	P<0,0001† P<0,0001#
20	2393,0 ± 87,1	103,9 ± 1,8		111,7 ± 1,8	
	N=16	N=13	NS†	N=14	P=0,0042† NS#

ANOVA z testami post hoc : \* tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; † SHR lub LNR w stosunku do WKY- test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR - test Fishera.  
 ANOVA followed by post-hoc tests: \* tempol vs. control of each group - Bonferroni test; † SHR or LNR vs. WKY - Dunnett test; # LNR vs. SHR - F test.



Ryc. 40. Pole narastania odpowiedzi naczyniokurczących (DevA) na stymulację elektryczną.  
 Fig. 40. Area of development of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation.

Tab. 12. Wpływ tempola na całkowite pole odpowiedzi naczyniowej na stymulację elektryczną.  
 Tab. 12. Effect of tempol on total area of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation.

Napięcie Voltage [V]	Tempol [mmol/kg]	WKY		SHR		LNR	
		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]	
3	0,005	-34,81 ± 10,97 N=8 0,0157		-7,65 ± 3,77† N=6 NS		-5,63 ± 5,17† N=7 NS	
	0,02	-5,32 ± 7,03 N=8 NS		-3,40 ± 5,41 N=6 NS		-7,08 ± 1,80 N=7 P=0,0076	
	0,1	4,19 ± 2,37 N=8 NS		-5,08 ± 2,40† N=6 NS		-3,63 ± 2,12† N=7 NS	
	1	14,90 ± 2,55 N=8 P=0,0006		-1,92 ± 0,91† N=6 NS		2,65 ± 2,64† N=7 NS	
5	0,005	-3,14 ± 1,46 N=8 NS		-2,48 ± 1,15 N=6 NS		-3,55 ± 1,28 N=7 P=0,0324	
	0,02	-11,24 ± 0,99 N=8 P<0,0001		-2,83 ± 1,92† N=6 NS		0,30 ± 1,74† N=7 NS	
	0,1	-51,19 ± 15,10 N=8 P=0,0006		-26,87 ± 4,56† N=7 P=0,0020		-0,29 ± 8,60†# N=7 NS	
	1	-1,55 ± 8,11 N=8 NS		-2,35 ± 5,55 N=7 NS		-9,77 ± 3,92†# N=7 P=0,0468	
8	0,005	8,79 ± 3,61 N=8 P=0,0448		-8,03 ± 1,75 N=7 P=0,0038		-6,69 ± 2,59 N=7 P=0,0414	
	0,02	14,62 ± 4,12 N=8 P=0,0095		-8,48 ± 1,24† N=7		-3,03 ± 2,52† N=7 NS	
	0,1	5,43 ± 2,57 N=8 NS		-2,36 ± 1,49† N=7 NS		-4,39 ± 1,87† N=7 NS	
	1	-2,27 ± 0,90 N=8 P=0,0398		2,41 ± 1,28† N=7 NS		-3,06 ± 2,39# N=7 NS	
10	0,005	-23,55 ± 16,96 N=8 NS		-8,08 ± 3,08† N=7 P=0,0005		2,56 ± 2,24†# N=8 NS	
	0,02	20,52 ± 5,34 N=8 P=0,0063		3,32 ± 1,50† N=7 NS		-4,42 ± 1,27†# N=8 P=0,0133	
	0,1	32,43 ± 7,01 N=8 P=0,0024		-0,44 ± 3,25† N=7 NS		-7,35 ± 1,91† N=8 P=0,0086	
	1	24,92 ± 4,24 N=8 P=0,0006		-1,45 ± 1,17† N=7 NS		-4,64 ± 1,44† N=8 P=0,0180	
15	0,005	3,41 ± 3,57 N=8 NS		4,54 ± 3,28 N=7 NS		0,17 ± 0,76 N=8 NS	
	0,02	-0,50 ± 4,44 N=8 NS		8,92 ± 1,31† N=7 P=0,0005		1,16 ± 1,59# N=8 NS	
	0,1	-17,10 ± 21,53 N=8 NS		-22,06 ± 4,31 N=6 P=0,0022		41,02 ± 10,51†## N=8 P=0,0080	
	1	21,44 ± 11,34 N=8 NS		44,39 ± 11,33 N=7 P=0,0078		31,92 ± 6,27 N=8 P=0,0014	
20	0,005	65,68 ± 12,35 N=8 P=0,0011		17,95 ± 8,02† N=7 NS		28,13 ± 3,33† N=8 P=0,0001	
	0,02	42,18 ± 6,75 N=8 P=0,0004		5,73 ± 3,67† N=7 NS		13,71 ± 2,26†# N=8 P=0,0005	
	0,1	12,78 ± 5,07 N=8 P=0,0398		11,29 ± 3,72 N=7 P=0,0228		11,81 ± 1,89 N=8 P=0,0004	
	1	14,38 ± 4,88 N=8 P=0,0214		18,30 ± 2,02 N=7 P=0,0001		7,15 ± 2,46†# N=8 P=0,0227	

ANOVA: - P – poziom istotności różnic: tempol względem kontroli dla danego napięcia; test Bonferroniego  
 ANOVA: P – significance level: tempol vs control of each voltage; Bonferroni test  
 † - P<0,05 SHR, LNR vs WKY - Dunnett test; # P<0,05 LNR vs SHR - F-test

Tab. 13. Porównanie pól narastania odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną układu izolowanych tętnic krezkowych perfundowanego ze stałą szybkością.

Tab. 13. Comparison of the area of development of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation of the isolated system of mesenteric arteries perfused at a constant flow.

Napięcie Voltage [V]	WKY [mm Hg * s]	SHR [%WKY dla danego V] [%WKY at a given V]	LNR [%WKY dla danego V] [%WKY at a given V]
<b>3</b>	12,21 ± 0,66 N=16	46,43 ± 2,48 N=13 P<0,0001†	32,12 ± 1,86 N=14 P<0,0001† P=0,0001#
<b>5</b>	54,56 ± 4,33 N=16	103,3 ± 5,18 N=13 P<0,0001†	59,28 ± 2,07 N=14 NS† P<0,0001#
<b>8</b>	188,70 ± 9,35 N=16	325,52 ± 15,76 N=13 P<0,0001†	198,93 ± 9,82 N=14 NS† P<0,0001#
<b>10</b>	427,70 ± 13,36 N=16	836,93 ± 20,25 N=13 P<0,0001†	366,90 ± 14,06 N=14 P=0,0083† P<0,0001#
<b>15</b>	1199,01 ± 23,60 N=16	1733,05 ± 34,23 N=13 P<0,0001†	1172,25 ± 25,07 N=14 NS† P<0,0001#
<b>20</b>	1583,00 ± 30,26 N=16	2106,04 ± 31,46 N=13 P<0,0001†	1996,99 ± 31,37 N=14 P<0,0001† P=0,0208#

ANOVA z testami post hoc : \* tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroniego; † SHR lub LNR w stosunku do WKY- test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR - test Fishera.

ANOVA followed by post-hoc tests: \* tempol vs control of each group - Bonferroni test; † SHR or LNR vs WKY - Dunnett test; # LNR vs SHR - F test.

Z kolei w grupie LNR stwierdzono zwiększenie IncrA pod wpływem tempola w odpowiedziach na stymulację elektryczną o napięciu 15 i 20 V.

Pole zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej na stymulację elektryczną (DecA) było proporcjonalne do zastosowanych napięć (ryc. 41, tab. 14) W zakresie napięć bodźców elektrycznych od 8 do 20 V, w grupie SHR i od 10 do 20 V w preparatach LNR, DecA było znamienne mniejsze niż u ich odpowiedników normotensyjnych – WKY (ryc. 41, tab. 14), przy czym DecA w grupie SHR było znacząco mniejsze od LNR. Przy stymulacji bodźcami słabszym: 3 V w grupie SHR oraz 3 i 5 V w grupie LNR, DecA było w tych grupach istotnie większe niż w preparatach WKY. Tempol w całym zakresie zastosowanych stężeń, od 0,005 do 1-milimolowego istotnie zwiększał DecA w grupach WKY i SHR, przy stymulacji bodźcami o napięciu od 8 do 20 V, a w stężeniu 1 mmol/l zwiększał także DecA na 3 i 5 V (tab. 15). Przy wyrażeniu zmiany pola odpowiedzi w wartościach procentowych, odnoszących się do kontroli danej grupy, zwiększenie DecA w zakresie bodźców od 8 do 20V było w obu grupach ponad trzykrotnie większe niż równoczesne ograniczenie IncrA. W grupie LNR tempol (stężenia 0,02 – 1 mmol/l) zwiększał DecA jedynie w przypadku stymulacji bodźcami o napięciu 20V.

Tab. 14. Wpływ tempola na pole narastania odpowiedzi naczyniokurczącej na stymulację elektryczną.

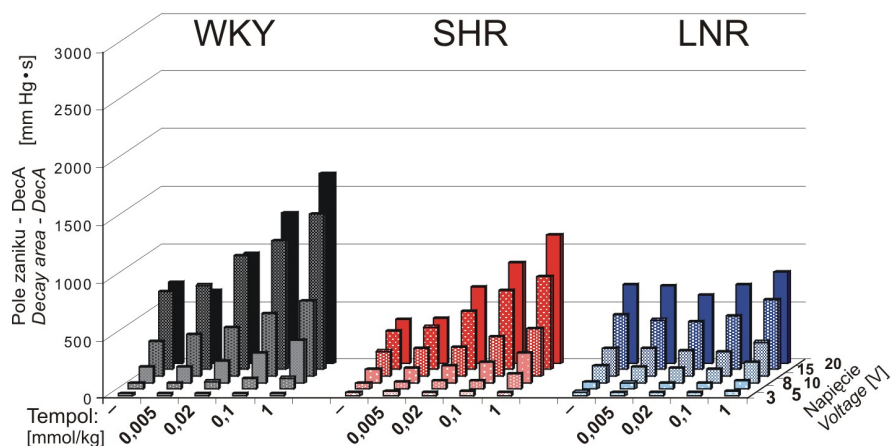
Tab. 14. Effect of tempol on the area of development of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation.

Napięcie Voltage	Tempol [mmol/kg]	WKY		SHR		LNR	
		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]	
3	0,005	-47,29 ± 8,98 N=8	P=0,0012	-18,31 ± 5,15† N=6	P=0,0163	3,57 ± 7,18† N=7	NS
	0,02	-5,78 ± 5,64 N=8	NS	-9,60 ± 5,14 N=6	NS	-0,27 ± 3,55†# N=7	NS
	0,1	10,40 ± 2,76 N=8	P=0,0070	-9,98 ± 1,84† N=6	P=0,0029	-2,79 ± 3,97† N=7	NS
	1	17,28 ± 3,02 N=8	P=0,0007	-5,63 ± 0,69† N=6	P=0,0004	0,83 ± 2,41† N=7	NS
5	0,005	-4,78 ± 1,58 N=8	P=0,0193	-4,87 ± 0,73 N=6	P=0,0012	-0,44 ± 1,72# N=7	NS
	0,02	-8,04 ± 1,54 N=8	P=0,0012	-3,50 ± 1,83† N=6	NS	0,23 ± 1,58† N=7	NS
	0,1	-60,83 ± 12,04 N=8	P=0,0015	-39,94 ± 5,35† N=7	P=0,0003	4,90 ± 9,47†# N=7	NS
	1	-24,84 ± 7,64 N=8	P=0,0140	-14,76 ± 3,64 N=7	P=0,0067	-1,90 ± 4,76†# N=7	NS
8	0,005	-5,91 ± 5,34 N=8	NS	-20,01 ± 1,60† N=7	P<0,0001	2,19 ± 2,48†# N=7	NS
	0,02	3,60 ± 3,81 N=8	NS	-15,54 ± 1,03† N=7	P<0,0001	-1,46 ± 3,56# N=7	NS
	0,1	-12,01 ± 2,59 N=8	P=0,0024	-12,64 ± 1,38 N=7	P=0,0001	-0,57 ± 1,69†# N=7	NS
	1	-15,71 ± 0,80 N=8	P<0,0001	-10,60 ± 0,88 N=7	P<0,0001	0,73 ± 2,57†# N=7	NS
10	0,005	-55,06 ± 9,73 N=8	P=0,0008	-38,03 ± 2,95† N=7	P<0,0001	26,28 ± 4,80†# N=8	P=0,0009
	0,02	-28,03 ± 3,83 N=8	P=0,0002	-16,00 ± 1,86† N=7	P=0,0001	7,05 ± 1,96†# N=8	P=0,0087
	0,1	1,27 ± 4,52 N=8	NS	-22,32 ± 3,75† N=7	P=0,0010	2,75 ± 2,64# N=8	NS
	1	-4,02 ± 3,08 N=8	NS	-17,18 ± 1,18† N=7	P<0,0001	0,81 ± 1,90# N=8	NS
15	0,005	-23,13 ± 1,14 N=8	P<0,0001	-15,70 ± 2,78 N=7	P=0,0013	0,08 ± 0,32†# N=8	NS
	0,02	-31,17 ± 1,56 N=8	P<0,0001	-13,41 ± 0,87† N=7	P<0,0001	1,05 ± 1,15†# N=8	NS
	0,1	-46,61 ± 13,81 N=8	P=0,0118	-42,80 ± 5,02 N=6	P=0,0004	65,51 ± 7,20# N=8	P<0,0001
	1	-32,35 ± 4,80 N=8	P=0,0003	-3,50 ± 7,54† N=7	NS	52,47 ± 4,14†# N=8	P<0,0001
20	0,005	5,13 ± 8,38 N=8	NS	-17,75 ± 6,71† N=7	P=0,0456	39,92 ± 0,71†# N=8	P=0,0001
	0,02	-2,19 ± 5,05 N=8	NS	-14,28 ± 2,85† N=7	P=0,0041	12,01 ± 0,82†# N=8	P=0,0038
	0,1	-27,49 ± 2,29 N=8	P<0,0001	-13,40 ± 2,34† N=7	P=0,0023	4,54 ± 0,91†# N=8	P=0,0487
	1	-30,27 ± 1,84 N=8	P<0,0001	-12,76 ± 0,69† N=7	P<0,0001	4,73 ± 0,91†# N=8	P=0,0423

ANOVA: - P – poziom istotności różnic: tempol względem kontroli dla danego napięcia; test Bonferroni

ANOVA: P – significance level: tempol vs control of each voltage; Bonferroni test

† - P<0,05 SHR, LNR vs WKY - Dunnett test; # P<0,05 LNR vs SHR - F-test



Ryc. 41. Pole zaniku odpowiedzi naczyniokurczących (DecA) na stymulację elektryczną  
**Fig. 41. Area of decay (DecA) of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation**

Tab. 15. Porównanie pól zaniku odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną układu izolowanych tętnic krezkowych perfundowanego ze stałą szybkością.

Tab. 15. Comparison of the area of decay of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation of the isolated system of mesenteric arteries perfused at a constant flow.

Napięcie Voltage [V]	WKY	SHR	LNR
	[mm Hg * s]	[%WKY dla danego V] [%WKY at a given V]	[%WKY dla danego V] [%WKY at a given V]
<b>3</b>	21,71 ± 2,63 N=16	148,6 ± 1,23 N=13 P<0,0001†	161,4 ± 1,29 N=14 P<0,0001† NS#
<b>5</b>	57,73 ± 5,33 N=16	99,52 ± 1,88 N=13 NS†	114,87 ± 1,83 N=14 P=0,0193† NS#
<b>8</b>	153,5 ± 9,71 N=16	74,71 ± 4,19 N=13 P=0,0054†	97,16 ± 4,82 N=14 NS† P=0,0432#
<b>10</b>	332,84 ± 17,16 N=16	64,95 ± 6,15 N=13 P<0,0001†	72,48 ± 8,61 N=14 P<0,0001† NS#
<b>15</b>	767,01 ± 44,36 N=16	43,61 ± 4,24 N=13 P<0,0001†	61,79 ± 6,30 N=14 P<0,0001† P=0,0437
<b>20</b>	810,03 ± 65,79 N=16	46,92 ± 6,36 N=13 P<0,0001†	83,39 ± 14,13 N=14 NS† P=0,0482#

ANOVA z testami post hoc : \* tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; † SHR lub LNR w stosunku do WKY- test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR - test Fishera.

ANOVA followed by post-hoc tests: \* tempol vs control of each group - Bonferroni test; † SHR or LNR vs WKY - Dunnett test; # LNR vs SHR - F test.



Tab. 16. Wpływ tempola na pole zaniku odpowiedzi naczyniowej na stymulację elektryczną.  
 Tab. 16. Effect of tempol on the area of decay of the vasoconstrictive response to electrical stimulation.

Napięcie Voltage	Tempol [mmol/kg]	WKY		SHR		LNR	
		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]		[% kontroli; %control]	
3	0,005	-27,88 ± 12,81 N=8 NS		8,30 ± 2,30† N=6 0,0154		-13,75 ± 3,71†# N=7 0,00995	
	0,02	-4,30 ± 9,01 N=8 NS		8,36 ± 7,41† N=6 NS		-12,72 ± 3,74# N=7 0,014409	
	0,1	-3,63 ± 2,86 N=8 NS		9,17 ± 6,00† N=6 NS		-4,86 ± 1,10# N=7 0,0045	
	1	12,40 ± 3,98 N=8 0,0169		13,04 ± 3,79 N=6 0,0184		6,18 ± 6,62 N=7 NS	
5	0,005	-0,45 ± 1,89 N=8 NS		9,91 ± 3,79† N=6 0,0474		-10,96 ± 1,68†# N=7 0,0006	
	0,02	-17,75 ± 2,79 N=8 0,0004		1,08 ± 3,20† N=6 NS		0,68 ± 3,36† N=7 NS	
	0,1	-45,67 ± 16,42 N=8 0,0272		-7,51 ± 5,71† N=7 NS		-4,99 ± 8,13† N=7 NS	
	1	21,98 ± 9,64 N=8 NS		20,72 ± 10,09 N=7 NS		-16,97 ± 3,78†# N=7 0,0041	
8	0,005	28,44 ± 4,75 N=8 0,0006		26,52 ± 5,42 N=7 0,0045		-17,88 ± 3,82†# N=7 0,0034	
	0,02	29,94 ± 6,29 N=8 0,0021		19,65 ± 3,14 N=7 0,0015		-4,93 ± 3,87†# N=7 NS	
	0,1	33,75 ± 3,22 N=8 P<0,0001		50,90 ± 3,56† N=7 P<0,0001		-13,62 ± 3,32†# N=7 0,0063	
	1	25,84 ± 1,71 N=8 P<0,0001		76,18 ± 8,03† N=7 P<0,0001		-14,29 ± 2,52†# N=7 0,0013	
10	0,005	-1,61 ± 25,76 N=8 NS		33,41 ± 3,79† N=7 0,0001		-17,32 ± 2,23†# N=8 0,0002	
	0,02	68,61 ± 8,78 N=8 0,0001		37,36 ± 5,28 N=7 0,0004		-14,17 ± 2,36†# N=8 0,0010	
	0,1	70,35 ± 10,88 N=8 0,0003		61,11 ± 2,44 N=7 P<0,0001		-20,50 ± 2,74†# N=8 0,0003	
	1	63,33 ± 8,72 N=8 0,0002		59,93 ± 1,75 N=7 P<0,0001		-12,60 ± 1,82†# N=8 0,0005	
15	0,005	46,56 ± 8,61 N=8 0,0010		110,52 ± 7,52† N=7 P<0,0001		0,60 ± 2,96†# N=8 NS	
	0,02	64,17 ± 12,93 N=8 0,0016		133,92 ± 4,09† N=7 P<0,0001		1,54 ± 3,13†# N=8 NS	
	0,1	2,05 ± 27,35 N=8 NS		7,11 ± 7,21 N=7 NS		20,49 ± 14,66# N=8 NS	
	1	74,04 ± 19,49 N=8 0,0067		130,96 ± 19,64† N=7 0,0006		14,08 ± 8,93†# N=8 NS	
20	0,005	139,22 ± 19,64 N=8 0,0002		119,65 ± 9,68 N=7 P<0,0001		13,72 ± 7,33†# N=8 NS	
	0,02	100,94 ± 13,67 N=8 0,0002		80,41 ± 6,58 N=7 P<0,0001		16,56 ± 4,39†# N=8 0,0093	
	0,1	77,97 ± 12,15 N=8 0,0004		139,51 ± 13,38† N=7 P<0,0001		30,20 ± 2,31†# N=8 P<0,0001	
	1	107,04 ± 15,75 N=8 0,0003		193,79 ± 10,41† N=7 P<0,0001		14,13 ± 4,56†# N=8 0,0212	

ANOVA:- P – poziom istotności różnic: tempol względem kontroli dla danego napięcia; test Bonferroni.

ANOVA: P – significance level: tempol vs control of each voltage; Bonferroni test.

† - P<0,05 SHR, LNR vs WKY - Dunnett test; # P<0,05 LNR vs SHR - F-test

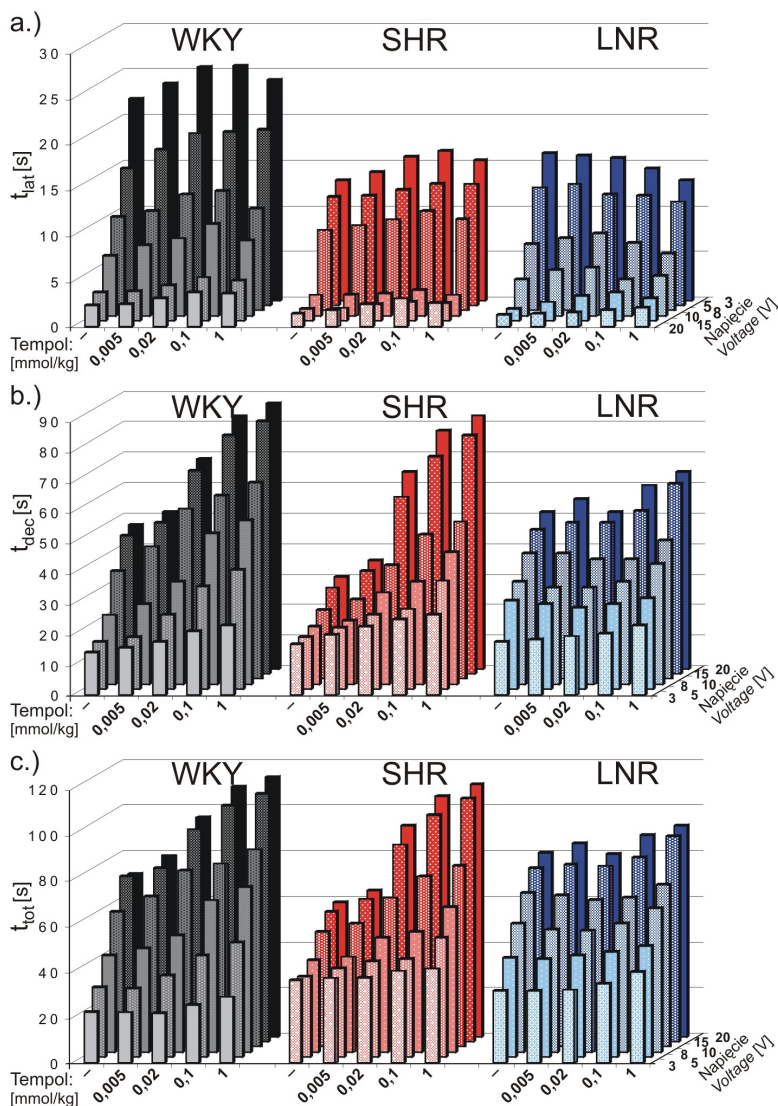
Przy bodźcach słabszych w przedziale napięć od 3 do 10 V tempol nieznacznie, lecz w sposób istotny statystycznie, zmniejszyła DecA w preparatach LNR.

Czas latencji ( $t_{lat}$ ) od zainicjowania stymulacji elektrycznej do początku wzrostu PP, był odwrotnie proporcjonalny do napięcia stymulacji elektrycznej (ryc. 42a) i wynosił: w grupie WKY od  $2,35 \pm 0,25$  s przy bodźcach 20-woltowych, do  $21,98 \pm 3,12$  s przy napięciu 3V, w grupie SHR, odpowiednio od  $1,43 \pm 0,21$  s. W całym zakresie zastosowanych bodźców elektrycznych  $t_{lat}$  był istotnie krótszy w preparatach wyizolowanych od szczerów nadciśnieniowych: SHR i LNR w porównaniu do ich odpowiedników normotensyjnych – WKY. W grupie SHR  $t_{lat}$  był przeciętnie o -39,61% krótszy niż WKY, przy czym dla poszczególnych napięć zakres różnicy wynosił od -14,34% (8 V) do -65,8% (10V). W preparatach grupy LNR  $t_{lat}$  był przeciętnie o -35,29% krótszy niż WKY, przy czym dla poszczególnych napięć zakres różnicy wynosił od -14,5% (5 V) do -56,83% (15V). Tempol znamienne, w sposób zależny od stężenia, przedłużył  $t_{lat}$  w grupie WKY (maksymalnie o 50,79% - 15V, stężenie 0,1 mmol/l) i w preparatach SHR (maksymalnie o 109,79%, 20V, stężenie 1 mmol/l), natomiast w grupie LNR skrócił  $t_{lat}$  odpowiedzi na 3 i 5V oraz przedłużył  $t_{lat}$  odpowiedzi na 10, 15 i 20 V, maksymalnie o 87,5% (15 V, 1 mmol/l).

Czas od rozpoczęcia stymulacji elektrycznej do wywołania połowy maksymalnej odpowiedzi naczyniokurczącej ( $t_{v50}$ ) był odwrotnie proporcjonalny do zastosowanego napięcia (ryc. 43) i był w grupie SHR istotnie krótszy niż w preparatach WKY, w zakresie bodźców od 8 do 20 V i w preparatach LNR (10 -20 V). W grupach WKY i SHR tempol w sposób zależny od stężenia wydłużył  $t_{v50}$  odpowiedzi na bodźce 15 i 20V w grupie WKY i 8 – 20 V, w grupie SHR;  $P < 0,05$ ), natomiast przy zastosowaniu słabszych bodźców, 5 – 10 V – w grupie WKY oraz 3 i 5 V w preparatach SHR, zaznaczyła się nieistotna tendencja do skrócenia  $t_{v50}$ . W grupie LNR tempol nie wywierał znaczącego wpływu na  $t_{v50}$ .

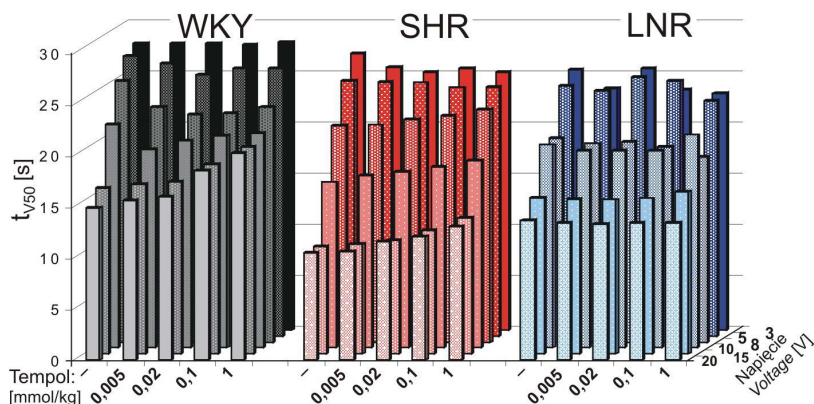
Całkowity czas odpowiedzi naczyniokurczącej na stymulację elektryczną zawierał się w przedziale od  $21,88 \pm 2,57$  do  $71,01 \pm 8,25$  s w grupie WKY, od  $35,93 \pm 4,55$  do  $58,53 \pm 7,12$  s w grupie SHR i od  $31,17 \pm 3,33$  do  $80,24 \pm 6,30$  s w grupie LNR (ryc. 42c). Tempol w sposób zależny od stężenia wydłużał czas całkowity odpowiedzi, w największym stopniu w grupie SHR (maksymalnie o 88,54%, 20V, 1 mmol/l), mniejszym w preparatach WKY (maksymalnie o 59,63%, 20V, 1 mmol/l) i niemal marginalnym w grupie LNR (17,97%, 15V, 1 mmol/l).

Czas zaniku odpowiedzi od zaprzestania stymulacji elektrycznej wynosił od  $13,86 \pm 1,35$  do  $47,03 \pm 5,25$  s w grupie WKY, od  $16,57 \pm 3,33$  do  $29,96 \pm 5,09$  s w grupie SHR i od  $17,23 \pm 3,03$  do  $51,52 \pm 6,25$  s w preparatach LNR (ryc. 42b). Porównanie między grupami wskazuje, że w zakresie napięć od 8 do 20V czas zaniku jest istotnie krótszy w grupie SHR w porównaniu do pozostałych preparatów. We wszystkich grupach tempol w sposób zależny od stężenia wydłużał czas zaniku, w największym stopniu w grupie SHR (maksymalnie o 178,71%, 15V, 1 mmol/l; maksymalna średnia różnic w zakresie napięć 3 – 20V: 129,08%, 1 mmol/l), w nieco mniejszym w grupie WKY (maksymalnie o 153,54%, 5 V, 1 mmol/l; maksymalna średnia różnic w zakresie napięć 3 – 20V: 100,42%, 1 mmol/l), w mniejszym stopniu w preparatach LNR (maksymalnie o 31,40%, 5 V, 1 mmol/l; maksymalna średnia różnic w zakresie napięć 3 – 20V: 19,48%, 1 mmol/l).



$t_{lat}$  – czas latencji, od rozpoczęcia stymulacji elektrycznej do początku odpowiedzi naczyniokurczącej;  
 $t_{dec}$  – czas zaniku, od zakończenia 30-s stymulacji elektrycznej do zakończenia odpowiedzi naczyniokurczącej;  
 $t_{tot}$  – czas całkowity, od rozpoczęcia do zakończenia odpowiedzi naczyniokurczącej.  
 $t_{lat}$  – lag time – from initiation of the electrical stimulation to initiation of the vasoconstrictive response;  
 $t_{dec}$  – time of decay, from termination of 30-s electrical stimulation to the end of the evoked vasoconstrictive response;  
 $t_{tot}$  – total time of the vasoconstrictive response, from its initiation to final.

Ryc. 42. Charakterystyka czasowa odpowiedzi naczyniokurzących na stymulację elektryczną.  
 Fig. 42. Time characteristics of the vasoconstrictive responses to electrical stimulation.



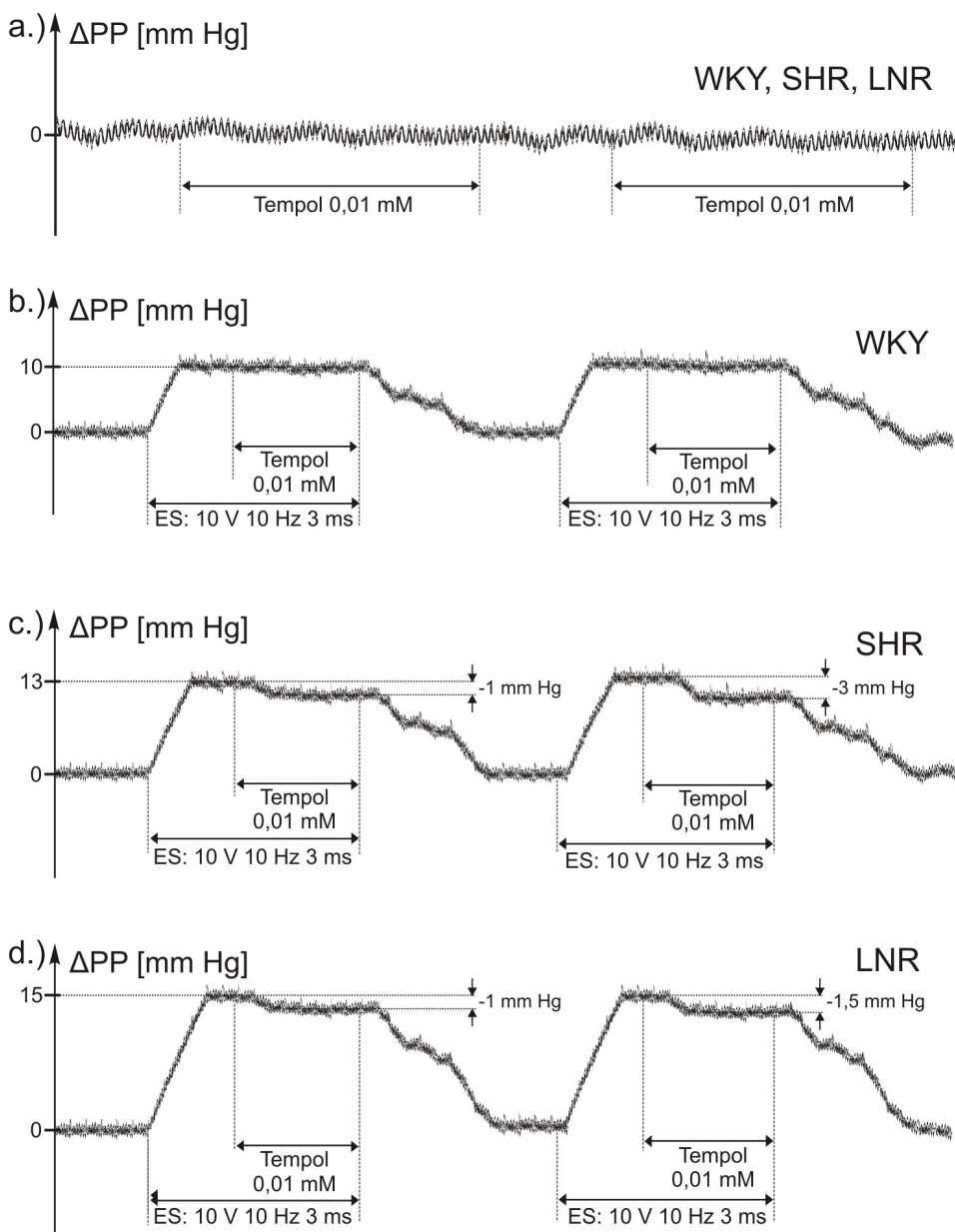
Ryc. 43. Czas osiągnięcia połowy odpowiedzi wazokonstrykcyjnej ( $t_{V50}$ ) przy stymulacji elektrycznej o danym napięciu.

Fig. 43. Time of assessment of the half of the vasoconstrictive response ( $t_{V50}$ ) on the electrical stimulation at a given voltage

Odpowiedzi naczyniokurczące na poszczególne napięcia stymulacji elektrycznej charakteryzował czas połowicznego zaniku ( $t_{1/2}$ ) wynoszący w grupach: WKY od  $3,17 \pm 0,20$  do  $4,64 \pm 0,45$  s, SHR od  $1,94 \pm 0,11$  do  $3,16 \pm 0,24$  s i LNR od  $2,49 \pm 0,22$  do  $5,63 \pm 0,38$  s (tab.16), przy czym w grupie SHR był on dla danego napięcia krótszy niż w preparatach WKY, zaś w grupie LNR dłuższy, w przedziale napięć 3 – 8 V. Tempol w sposób zależny od dawki istotnie wydłużał  $t_{1/2}$  w układzie naczyniowym krezki grup WKY (maksymalnie o 215,14%, 8 V, 1 mmol/l) i SHR (maksymalnie o 181,61%, 5V, 1 mmol/l). W preparatach LNR pod wpływem tempola doszło do skrócenia  $t_{1/2}$  odpowiedzi na bodźce 5, 8 i częściowo 3 V (maksymalnie o 41,03%, 8 V, 0,1 mmol/l), co nie występowało przy zastosowaniu większych napięć stymulacji, w przedziale 10 - 20 V.

#### 4.4.2.4. Wazorelaksacyjny efekt tempola ujawniony w warunkach podwyższonego napięcia czynnego układu naczyń tętniczych krezki.

Rycina 44 odzwierciedla ciśnienie perfuzyjne (PP) w doświadczeniach wykonanych według schematu Procedury 3.3.2.4. W warunkach podstawowych, przed stymulacją elektryczną tempol nie wywołał w żadnej z grup doświadczalnych zmian PP, które wyróżniałyby się na tle zmian o niewielkiej amplitudzie, zachodzących spontanicznie i wywołanych pulsacją pompy perfuzyjnej (ryc. 44a). Podczas przedłużonej, 10-minutowej stymulacji elektrycznej PP wzrastało, osiągając stan równowagi po 45 – 120 s od rozpoczęcia drażnienia. Przyrost PP był większy w preparatach pochodzących od szczurów nadciśnieniowych w porównaniu do ich normotensyjnych odpowiedników i wynosił: w grupie LNR  $15,00 \pm 0,98$  mm Hg ( $P = 0,0024$  vs WKY, NS vs SHR), w preparatach SHR  $12,94 \pm 1,00$  mm Hg ( $P = 0,0344$  vs WKY) i  $9,87 \pm 0,55$  mm Hg w grupie WKY.



Ryc. 44. Wpływ tempola na ciśnienie perfuzyjne (PP) izolowanego układu tętnic krezkowych przy zwiększonym napięciu mięśniówki naczyniowej wywołanym przez przedłużoną stymulację elektryczną.

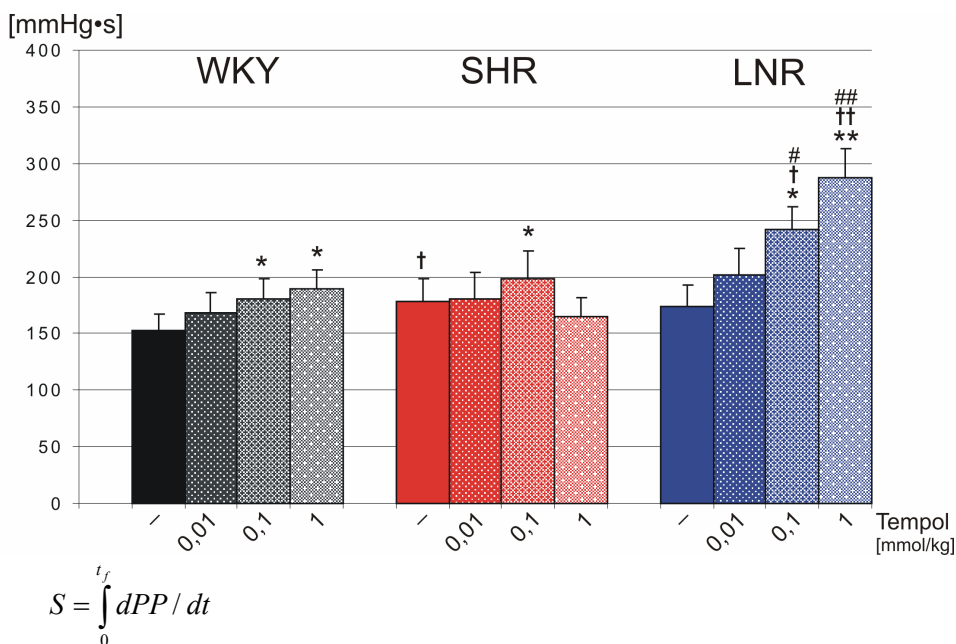
Fig. 44. Effect of tempol on perfusion pressure (PP) of the isolated system of mesenteric arteries during an increased active vascular tone due to prolonged electrical stimulation.

Podczas przedłużonej stymulacji elektrycznej tempol praktycznie nie wpłynął na PP w grupie WKY (0,02 mmol/l:  $-0,12 \pm 0,12$  mm Hg; 1 mmol/l:  $-0,19 \pm 0,12$  mm Hg), w

sposób zależny od stężenia stopniowo obniżył PP w grupie SHR (0,02 mmol/l:  $-1,12 \pm 0,24$  mm Hg,  $P = 0,05$  vs WKY, NS vs LNR; 1 mmol/l:  $-3,06 \pm 0,56$  mm Hg,  $P = 0,00052$  vs WKY, NS vs LNR) i nieistotnie obniżył PP w preparatach LNR (0,02 mmol/l:  $-0,94 \pm 0,48$  mm Hg, NS vs WKY; 1 mmol/l:  $-1,19 \pm 0,34$  mm Hg, NS vs WKY).

#### 4.4.2.5. Odpowiedź naczyniokurcząca po ischemii krezki

Bezpośrednio po wznowieniu perfuzji po 20-minutowej ischemii (Procedura 3.3.2.5.) we wszystkich preparatach wystąpił krótkotrwały wzrost PP (tab.17), którego amplituda była największa w grupie SHR, mniejsza w WKY, zaś najmniejsza w LNR (odpowiednio o  $29,22 \pm 1,81$ ,  $23,92 \pm 1,77$  i  $19,88 \pm 1,60$  mm Hg; tab. 17).



$$S = \int_0^{t_f} dPP / dt$$

0 - czas zakończenia 20-min ischemii;  $t_f$  - czas zakończenia odpowiedzi naczyniokurczącej; PP - ciśnienie perfuzyjne

0 - final time of the 20-min ischemia;  $t_f$  - final time of the vasoconstrictive response; PP - perfusion pressure

Ryc. 45. Pole zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej zarejestrowanej po bezpośrednio po zakończeniu ischemii preparatu naczyń krezkowych.

Fig. 45. Area of decay of the vasoconstrictive responses recorded immediately after termination of total ischemia of the mesenteric vessel preparation.

Tab. 17. Charakterystyka odpowiedzi naczyniokurczącej izolowanego preparatu tętnic kręzkowych występującej samoistnie bezpośrednio po zakończeniu ischemii.

Tab. 17. Characteristics of the vasoconstrictive response of the isolated preparation of mesenteric arteries to occur immediately after the ischemia.

Grupa Group	Tempol [mmol/kg]	$\Delta$ PP [mm Hg]	$t_{1/2}$ [s]	$t_{90\%}$ [s]
WKY	—	23,92 ± 1,77	6,16 ± 0,47	20,62 ± 1,98
	0,01	21,44 ± 2,02	6,50 ± 0,63	21,40 ± 3,06
	0,1	18,48 ± 2,43 *	7,35 ± 0,81	26,75 ± 2,26 *
	1	9,93 ± 2,44 *	9,22 ± 0,92 *	37,27 ± 5,11*
SHR	—	29,22 ± 1,81 †	5,23 ± 0,43	22,95 ± 2,00
	0,01	24,38 ± 3,01	5,89 ± 0,58	26,30 ± 1,58 *
	0,1	19,25 ± 2,16 *	6,85 ± 0,61 *	31,20 ± 3,31 * †
	1	13,75 ± 1,95 * †	8,82 ± 0,79 *	35,55 ± 4,55 *
LNR	—	19,88 ± 1,60 #	6,32 ± 0,45 #	25,15 ± 3,08
	0,01	21,43 ± 2,14	6,88 ± 0,61	27,16 ± 4,16
	0,1	23,62 ± 2,02	7,11 ± 0,73	31,85 ± 4,20
	1	19,67 ± 2,49 † #	6,90 ± 0,62 †	42,04 ± 6,33 *

$\Delta$ PP – różnica między maksymalnym ciśnieniem perfuzyjnym (PP) bezpośrednio po ischemii a PP ustabilizowanym po ischemii;  $t_{1/2}$  i  $t_{90\%}$  - czas połowicznego i 90-procentowego zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej.  $P < 0,05$ : ANOVA z testami post hoc: \* tempol w stosunku do kontroli danej grupy test Bonferroni; † SHR lub LNR w stosunku do WKY dla danego stężenia tempola - test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR dla danego stężenia tempola - test Fishera.

$\Delta$ PP – difference between maximal perfusion pressure (PP) immediately after the ischemia and a further steady state PP;  $t_{1/2}$  i  $t_{90\%}$  - time of half-decay and 90%-decay of the vasoconstrictive response.

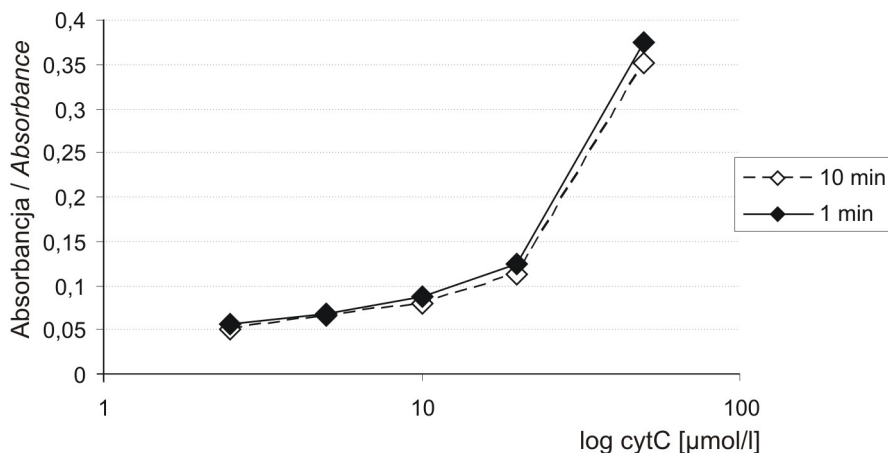
$P < 0,05$ : ANOVA with post-hoc tests: \* tempol vs. control of each group - Bonferroni test; † SHR or LNR vs. WKY for each tempol concentration - Dunnett test; # LNR vs. SHR - F test.

Na tle prazosyny (Procedura 3.2.7.3) postischemiczna odpowiedź naczyniokurcząca ujawniła się w szczytkowej postaci ( $\Delta$ PP = 3,00 ± 1,04 mm Hg), i wynosiła 12,54% amplitudy przy perfuzji bez prazosyny. W preparatach WKY i SHR tempol istotnie redukował wzrost PP po wznowieniu perfuzji (WKY: maksymalnie o 58,49% w stężeniu 1 mmol/l; SHR: maksymalnie o 52,94% w stężeniu 1 mmol/l). Efekt ten nie występował w grupie LNR. Przy perfuzji bez tempola kinetyka zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej była podobna w poszczególnych grupach, o czym świadczą zbliżone czasy:  $t_{1/2}$  – połowicznego zaniku i  $t_{90\%}$  - 90-procentowego zaniku odpowiedzi (tab. 17). Tempol istotnie przedłużył kinetykę zaniku w preparatach WKY ( $t_{1/2}$ : + 49,67% i  $t_{90\%}$ : + 80,75% - 1 mmol/l) i SHR ( $t_{1/2}$ : + 68,64% i  $t_{90\%}$ : +54,90 - 1 mmol/l), przy czym efekt statystycznie istotny występował w grupie SHR w szerszym zakresie stężeń tempola niż w grupie WKY. W grupie LNR tempol nie wpłynął na  $t_{1/2}$ , natomiast wydłużył  $t_{90\%}$  o 67,18% w stężeniu 1 mmol/l.

Pole powierzchni zaniku w czasie odpowiedzi naczyniokurczącej wywołanej wznowieniem perfuzji było większe w grupie SHR w porównaniu do WKY ( $P = 0,049$  vs WKY; ryc. 45). Tempol w sposób proporcjonalny do stężenia istotnie zwiększał pole zaniku postischemicznej odpowiedzi naczynioruchowej w grupie WKY i LNR (maksymalnie o 23,53% -WKY, tempol 1 mmol/l; +65,09% - LNR, tempol 1 mmol/l;  $P < 0,05$  LNR vs WKY), natomiast w preparatach SHR efekt ten był znaczący jedynie przy zastosowaniu 0,1-milimolowego stężenia tempola (+11,52%).

#### 4.4.2.6. Uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego po ischemii krezki

Absorbancja testowanych próbek cytochromu C wzrastała w sposób liniowy wraz ze wzrostem stężenia wyrażonego w postaci logarytmu, w zakresie stężeń od 2,5 do 20  $\mu\text{mol/l}$  (ryc. 46), natomiast próbki o stężeniu 50  $\mu\text{mol/l}$  wykazywały znacznie większą absorbancję od oszacowanej na podstawie przebiegu zależności między logarytmem stężenia a absorbancją, wyznaczoną dla przedziału stężeń 2,5 – 20  $\mu\text{mol/l}$ .



Ryc. 46. Krzywa kalibracyjna absorbancji ferricytochromu c – pomiary *in vitro*.

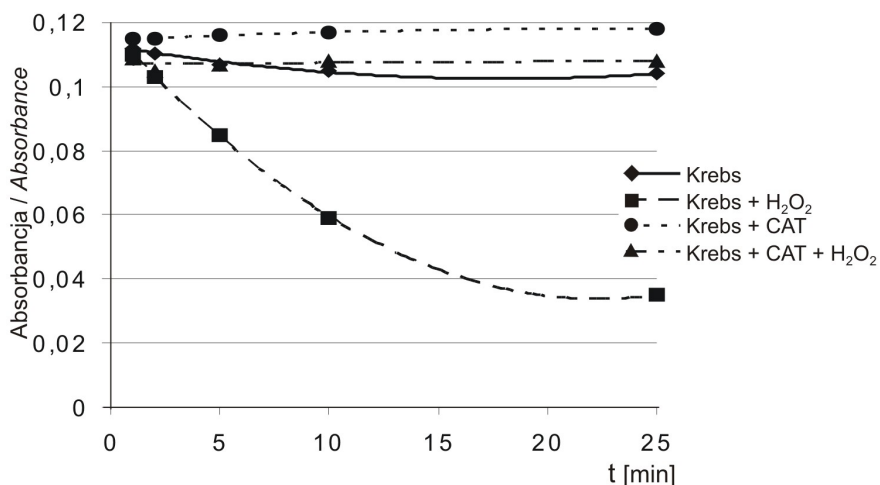
Fig. 46. Ferricytochrome c absorbance calibration curve – *in vitro* assay

W okresie 10 minut przechowywania próbek w temperaturze pokojowej absorbancja nie zmieniła się w sposób istotny. W 15- $\mu\text{mol}$ owych roztworach cytochromu C stwierdzono nieznaczne obniżenie absorbancji próbek w okresie 25-minutowej obserwacji (ryc. 47), natomiast w roztworach zawierających dodatkowo  $\text{H}_2\text{O}_2$  stwierdzono postępujący w czasie spadek absorbancji (Ryc 47). Absorbancja próbek płynu perfuzyjnego zawierających cytochrom C i katalazę była stabilna w 25-minutowym okresie obserwacji, niezależnie od ewentualnego dodania do roztworów  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ryc. 47).

Uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego do światła perfundowanego układu naczyń tętniczych było w warunkach podstawowej perfuzji istotnie większe w grupie SHR ( $3,15 \pm 0,46$  nmol/g tkanki/min), niż w preparatach WKY ( $2,25 \pm 0,34$  nmol/g tkanki/min;  $P = 0,03$ ) i LNR ( $1,78 \pm 0,40$  nmol/g tkanki/min;  $P = 0,0037$ ; ryc 46). Tempo, w sposób zależny od stężenia, ograniczył wytwarzanie  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , w największym stopniu w grupie SHR ( $-23,49 \pm 7,25\%$ ,  $-57,14 \pm 11,35$  i  $-60,95 \pm 9,33\%$ ; stężenia: 0,01, 0,1 i 1 mmol/l), nieco mniejszym w grupie WKY ( $-11,31 \pm 6,35\%$ ,  $-42,40 \pm 17,15\%$  i  $-54,30 \pm 18,77\%$ ; stężenia: 0,01, 0,1 i 1 mmol/l) i istotnie mniejszym w preparatach LNR ( $-6,40 \pm 6,06\%$ ,  $-16,75 \pm 10,28\%$  i  $-22,17 \pm 7,92\%$ ; stężenia: 0,01, 0,1 i 1 mmol/l). W pierwszych 45 sekundach od zakończenia ischemii uwalnianie  $\text{O}_2^{\bullet-}$  zaczęło wzrastać w grupie WKY ( $+20,97 \pm 21,51\%$ ) i SHR ( $+14,29 \pm 18,10\%$ ), natomiast w preparatach LNR

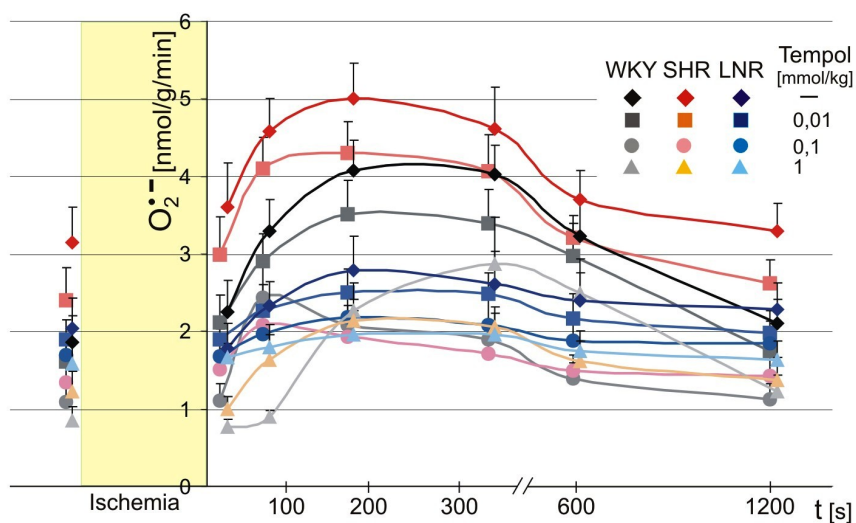


zmniejszyło się w stosunku do wartości sprzed ischemii ( $-12,32 \pm 15,76\%$ ). W kolejnych okresach po ischemii wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  znacząco wzrastało, osiągając szczyt między 2 i 3 minutą od wznowienia perfuzji (ryc 48, tab. 18, po czym stopniowo zmniejszało się, osiągając poziom zbliżony do wyjściowego po 20 minutach reperfuzji.



Ryc. 47. Wpływ katalazy (CAT) i nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) na absorbancję roztworu ferricytochromu c.

Fig. 47. Effect of catalase (CAT) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on the absorbance of the ferricytochrome c solution.



Obszar zacieniowany kolorem żółtym odpowiada okresowi ischemii  
Area shaded with yellow reflects the period of ischemia

Ryc. 48. Wpływ tempola na wytwarzanie anionorodnika nadtlenkowego w układzie izolowanych naczyń kręzkowych: przed i po ischemii preparatu.

Fig. 48. Effect of tempol on superoxide anion generation in the isolated system of mesenteric vessels, before and following ischemia.

Maksymalny przyrost  $O_2^{\bullet-}$  wystąpił w grupie WKY ( $+118,82 \pm 20,97\%$ ) i był znacznie większy niż w preparatach SHR i LNR ( $+59,05 \pm 14,29\%$  i  $+36,95 \pm 22,17\%$ ). Tempol (1 mmol/l) nieznacznie opóźnił wzrost wytwarzania  $O_2^{\bullet-}$  po wznowieniu perfuzji w grupach WKY i SHR. W preparatach WKY, w okresie między 2 – 10 min reperfuzy 0,1-milimolowe stężenie tempola w nieznacznym stopniu ograniczyło uwalnianie  $O_2^{\bullet-}$ , zaś stężenie o rząd większe – 1 mmol/l wywarło wpływ odwrotny (tab. 18). W grupie SHR do nieznacznego zwiększenia uwalniania  $O_2^{\bullet-}$  przyczyniło się 10- $\mu$ molowe stężenie tempola. Wyższe stężenia tempola nie wywarły istotnego wpływu na wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  po ischemii. W preparatach LNR tempol nie wpłynął w sposób znaczący na uwalnianie  $O_2^{\bullet-}$ .

Tab. 18. Uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego po 20-min niedokrwieniu krezki, wyrażone w procentach wartości przed ischemią.

Tab. 18. *Superoxide release following 20-min mesentery ischemia [% preischemic values].*

Tempol [mmol/kg]	Czas od ischemii [s] Time after ischemia [s]							
	Przed Before	0 – 45	45 - 90	135 -180	255 - 300	555 - 600	1155 - 1200	
WKY	-	100±18	121 ±22	177 ±22	219 ±21*	217 ±20*	174 ±25*	113 ±17
	0,01	100 ±17	128 ±22	176 ±21*	213 ±26*	205 ±27*	181 ±25*	106 ±17
	0,1	100 ±17	102 ±20	154±37*♦	181 ±23*	174 ±19*	129 ±19*♦	104 ±17
	1	100 ±20	91 ±11♦	105 ±11♦	266 ±42*	338 ±71*♦	288 ±52*♦	144 ±26*
SHR	-	100 ± 15☼	114 ±18	145 ±13*	159 ±14*†	146 ±17*†	117 ±12†	105 ±11
	0,01	100 ±17	124 ±20	170 ±17*	179 ±16*	169 ±20*	133 ±12*†	109 ±12
	0,1	100 ±19	112 ±27	154 ±24*†	143 ±16*†	127 ±19 †	110 ±15	106 ±20
	1	100 ±20	80 ±14*♦	133 ±27	176 ±24*†	164 ±21*†	133 ±21†	111±24†
LNR	-	100 ±20●	88 ±16†	115 ±15†	137 ±22*†	129 ±21†	119 ±18†	113 ±16
	0,01	100 ±13	98 ±15†	116 ±17†#	132±16*†#	131 ±14*†#	114 ±16†	105 ±15
	0,1	100 ±13	102 ±21	118 ±21†#	127 ±22†	124 ±20†	112 ±17†	105 ±17
	1	100 ±17	105 ±12	114 ±18	124 ±20†#	123 ±18†#	110 ±16†	103±15†

P < 0,05, ANOVA z testami post hoc,: \* wartości po ischemii w stosunku do przed ischemią dla danego stężenia tempola - test Bonferroniego; † SHR lub LNR w stosunku do WKY dla danego stężenia tempola - test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR dla danego stężenia tempola - test Fishera; ♦ tempol w stosunku do wartości w danym przedziale czasowym przy perfuzji bez tempola; test t-Studenta ☼ SHR w stosunku do WKY ● LNR względem SHR – wartości bezwzględne.

P < 0,05: ANOVA with post-hoc tests: \* postischemic values vs. the preischemic ones for each tempol concentration - Bonferroni test; † SHR or LNR vs. WKY for each tempol concentration - Dunnett test; # LNR vs. SHR - F test; ♦ tempol vs. no tempol for a given reperfusion period; Student t –test: ☼ SHR vs. WKY, ● LNR vs. SHR – absolute values.

#### 4.4.2.7. Uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego podczas stymulacji elektrycznej krezki

W doświadczeniach opartych na schemacie Procedury 3.3.2.6 uwalnianie  $O_2^{\bullet-}$  było w warunkach podstawowej perfuzji większe w grupie SHR ( $2,72 \pm 0,38$  nmol  $O_2^{\bullet-}$ /g tkanki/min), niż w preparatach WKY ( $1,71 \pm 0,27$  nmol  $O_2^{\bullet-}$ /g tkanki/min;  $P = 0,035$ ) i LNR ( $2,02 \pm 0,29$  nmol  $O_2^{\bullet-}$ /g tkanki/min; NS,  $P = 0,078$ ; ryc 47). Podczas stymulacji elektrycznej uwalnianie  $O_2^{\bullet-}$  wzrosło we wszystkich preparatach izolowanego układu tętnic krezkowych (ryc. 49), w największym stopniu w grupie LNR, nieco mniejszym w WKY i istotnie najmniejszym w SHR (tab. 19).

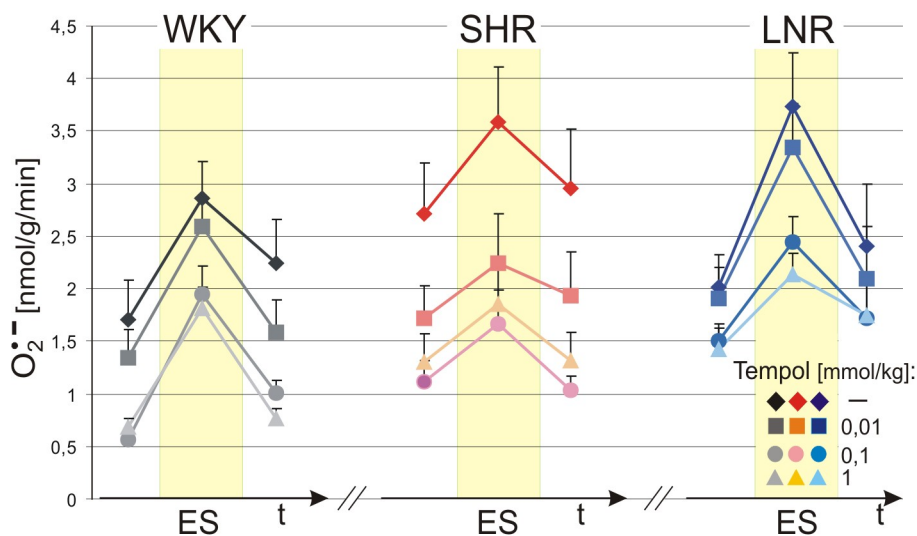
Tab. 19. Uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego: przed, po i w trakcie stymulacji elektrycznej (ES) krezki, wyrażone w procentach wartości początkowej.

Tab. 19. Superoxide release: before, during, an after electrical stimulation (ES) of mesentery, expressed as a percent of the initial values.

Grupa Group	Tempol [mmol/kg]	Przed ES Before ES	Podczas ES During ES	Po ES Following ES
WKY	—	100,00 ±21,64	167,25 ±20,47*	131,58 ±23,98
	0,01	100,00 ±19,26	191,85 ±17,78*	92,98 ±22,22
	0,1	100,00 ±12,50	348,21 ±46,43* ♦	180,36 ±21,43* ♦
	1	100,00 ±13,24	267,65 ±27,94* ♦	113,24 ±13,24
SHR	—	100,00 ±17,65☼	131,62 ±19,49* †	108,46 ±20,96
	0,01	100,00 ±18,02	130,81 ±27,33 †	112,79 ±23,84
	0,1	100,00 ±18,92	150,45 ±28,83* †	92,79 ±12,61 †
	1	100,00 ±20,77	142,31 ±29,23 †	101,54 ±20,00
LNR	—	100,00 ±15,35	184,65 ±25,74* #	119,31 ±29,21
	0,01	100,00 ±15,18	175,39 ±21,47* #	109,42 ±26,18
	0,1	100,00 ±11,33	163,33 ±15,33* †	114,67 ±22,00 †#
	1	100,00 ±13,29	149,65 ±13,99* †	121,68 ±27,27

$P < 0,05$ : ANOVA z testami post hoc,: \* ES, lub po ES względem wartości przed ES dla danego stężenia tempola - test Bonferroni; † SHR lub LNR w stosunku do WKY dla danego stężenia tempola - test Dunnetta; # LNR w stosunku do SHR dla danego stężenia tempola - test Fishera; ♦ tempol w stosunku do wartości w danym przedziale czasowym przy perfuzji bez tempola; test t-Studenta ☼ SHR w stosunku do WKY wartości bezwzględne.

$P < 0,05$ : ANOVA with post-hoc tests: \*ES or post-ES vs. the initial values for each tempol concentration - Bonferroni test; † SHR or LNR vs. WKY for each tempol concentration - Dunnett test; # LNR vs. SHR - F test; ♦ tempol vs. no tempol for a given reperfusion period; Student t-test: ☼ SHR vs. WKY - absolute values.



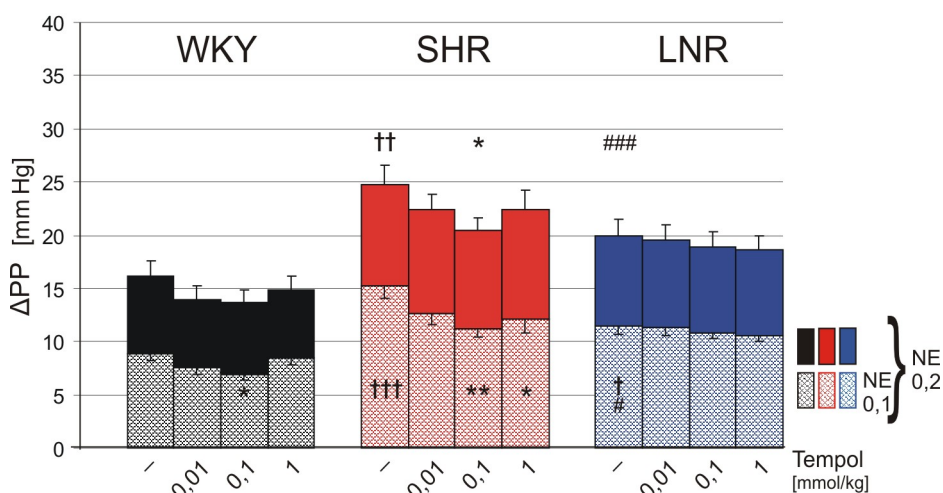
Obszar zacieniowany kolorem żółtym odpowiada okresowi stymulacji elektrycznej  
 Area shaded with yellow reflects the period of electrical stimulation

Ryc. 49. Wpływ tempola na wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego w układzie izolowanych naczyń krezkowych: przed, podczas i po stymulacji elektrycznej (ES) włókien nerwowych okołonaczyniowych.

Fig. 49. Effect of tempol on superoxide anion generation in the isolated system of mesenteric vessels challenged with electrical stimulation (ES) of the perivascular nerves: before, during, and after the perivascular ES.

W okresie 45 s od zakończenia drażnienia wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  zmniejszało się, szybciej przybliżając się do poziomu wyjściowego w grupach LNR i SHR, niż WKY, zaś tempol nie wywierał znaczącego wpływu na szybkość powrotu uwalniania  $O_2^{\bullet-}$  do poziomu sprzed drażnienia. Tempol (0,1 oraz 1 mmol/l) istotnie nasilał generowanie  $O_2^{\bullet-}$  podczas stymulacji elektrycznej w grupie WKY, czego nie wykazano w preparatach SHR. Natomiast w grupie LNR zaznaczyła się nieistotna statystycznie, zależna od stężenia, tendencja do ograniczania przez tempol wzrostu uwalniania  $O_2^{\bullet-}$  podczas stymulacji elektrycznej.

Wszystkie preparaty krezki zareagowały wzrostem PP na noradrenalinę (NE, ryc. 50). Odpowiedzi naczyniokurczące na obie testowane dawki NE: 0,1 i 0,2 ng były istotnie większe w grupie SHR w stosunku do WKY (o 72,70 i 53,12%;  $P = 0,0001$  i  $P = 0,0008$ ; dawki NE – 0,1 i 0,2 ng), także w preparatach LNR w stosunku do WKY (o 30,68% i 24,84%;  $P = 0,012$  i  $P = 0,0787$  – NS; dawki NE – 0,1 i 0,2 ng), przy czym odpowiedzi naczyniokurczące na NE znamienne większe w grupie SHR w porównaniu do LNR (o 32,17% i 24,62%;  $P = 0,0128$ ,  $P = 0,0457$ , dawki NE – 0,1 i 0,2 ng). Tempol zmniejszał odpowiedź naczyniokurczącą na testowane dawki NE: w grupie LNR w całym zakresie testowanych stężeń (0,01 – 1 mmol/l), zaś w preparatach WKY i SHR w stężeniach 0,01 i 0,1 mmol/l.



ANOVA: \*  $P < 0,05$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Bonferroni; ††  $P < 0,01$  SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Dunnetta; ###  $P < 0,001$  LNR w stosunku do SHR  
 ANOVA: \*  $P < 0,05$  tempol vs control of each group - Bonferroni test; ††  $P < 0,01$  SHR or LNR vs WKY - Dunnett test; ###  $P < 0,001$  LNR vs SHR

Ryc. 50. Wpływ tempola na odpowiedzi naczyniokurczące preparatu krezkowego na noradrenalinę (NE).

Fig. 50. Effect of tempol on the vasoconstrictive responses of the mesenteric preparation to norepinephrine (NE).

W porównaniu do preparatów WKY i SHR, w grupie LNR kinetyka zaniku odpowiedzi naczyniokurczących na obie testowane dawki NE była wolniejsza, o czym świadczą dłuższe czasy połowicznego zaniku ( $t_{1/2}$ ), czasu 90-procentowego zaniku ( $t_{90\%}$ ) oraz pół powierzchni odpowiedzi ciśnieniowej ( $S_{dec}$ ; tab 20). Na rycinach 51, 52 oraz szczegółowo w tab. 20 dokonano porównawczego zestawienia zmiennych charakteryzujących kinetykę zaniku odpowiedzi naczyniokurczących na: NE (Procedura 3.3.2.6), stymulację elektryczną (Procedura 3.3.2.3) i wznowienie perfuzji po ischemii (Procedura 3.3.2.5). Celem zestawienia było porównanie  $t_{1/2}$ ,  $t_{90\%}$  i  $S_{dec}$ , wyznaczonych dla odpowiedzi naczynioruchowych o tej samej amplitudzie, lecz powstałych w wyniku działania różnych czynników sprawczych.

Określono przebieg zależności między napięciem bodźca (Procedura 3.3.2.3), jak również amplitudą odpowiedzi na NE (Procedura 3.3.2.6), a każdą z porównywanych zmiennych charakteryzujących kinetykę zaniku odpowiedzi ( $t_{1/2}$ ,  $t_{90\%}$ ,  $S_{dec}$ ). W przebiegu linii regresji wyznaczono wartości zmiennych dokładnie odpowiadające amplitudzie odpowiedzi naczynioruchowej ( $\Delta PP$ ) na wznowienie ischemii. Uwzględniając przedział ufności wyznaczonych linii regresji porównano wartości wybranych zmiennych uzyskane z różnych procedur doświadczalnych (tab 20, ryc. 51, 52). Czas połowicznego zaniku ( $t_{1/2}$ ) odpowiedzi na wznowienie ischemii był istotnie dłuższy od odpowiedzi na NE we wszystkich grupach doświadczalnych, a także od odpowiedzi na ekwipotentną stymulację elektryczną w grupach WKY i SHR (tab 20, ryc. 51).

Tab. 20. Porównanie charakterystyki odpowiedzi naczyniokurczących na ischemię z równoważnymi odpowiedziami na stymulację elektryczną (ES) i na noradrenalinę (NE).

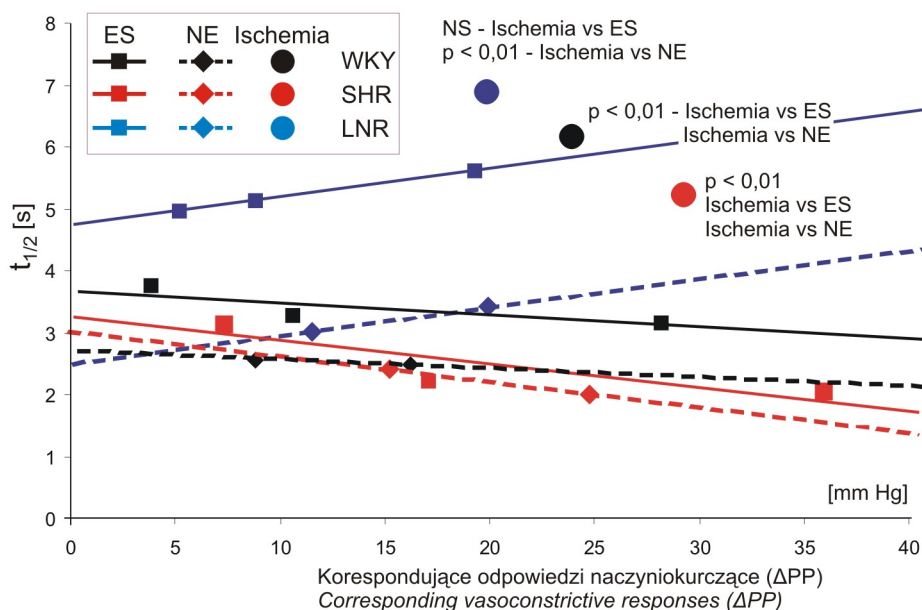
Tab. 20. Confrontation characteristics of the vasoconstrictive responses resulted from ischemia with the equipotent responses to electrical stimulation (ES) and norepinephrine (NE).

Czynnik Trigger		Grupa Group	$\Delta$ PP [mm Hg]	$t_{1/2}$ [s]	$t_{90\%}$ [s]	$\Delta$ PP - Pole zaniku $\Delta$ PP - Decay area [mm Hg · s]
Stymulacja elektryczna Electrical stimulation (ES)	5V	WKY	10,56 ± 0,72	3,30 ± 0,23	19,87 ± 0,96	57,73 ± 5,33
		SHR	17,00 ± 1,42	2,23 ± 0,13	17,28 ± 2,05	57,47 ± 2,98
		LNR	8,79 ± 0,49	5,15 ± 0,31	30,26 ± 1,98	66,32 ± 1,60
	8V	WKY	28,13 ± 1,32	3,17 ± 0,20	27,36 ± 1,55	153,50 ± 9,71
		SHR	35,85 ± 2,18	2,08 ± 0,14	22,57 ± 1,78	114,60 ± 1,89
		LNR	19,21 ± 1,12	5,63 ± 0,38	39,85 ± 2,56	149,10 ± 4,97
	Ext ES	WKY	23,92 N = 16	3,23 ± 0,22	25,56 ± 1,41	138,95 ± 7,25
		SHR	29,22 N = 13	2,12 ± 0,14	20,71 ± 1,94	101,21 ± 2,72
		LNR	19,88 N = 14	5,39 ± 0,37	41,23 ± 2,28	135,56 ± 3,85
Dawki noradrenaliny Doses of norepinephrine (NE)	0,1 ng	WKY	8,80 ± 0,58	2,55 ± 0,36	9,85 ± 0,77	37,71 ± 4,30
		SHR	15,20 ± 1,13	2,42 ± 0,25	8,65 ± 0,46	56,16 ± 5,52
		LNR	11,50 ± 0,83	3,01 ± 0,41	13,66 ± 1,01	49,95 ± 5,60
	0,2 ng	WKY	16,20 ± 1,39	2,46 ± 0,29	12,05 ± 0,84	79,38 ± 6,12
		SHR	24,80 ± 1,74	2,01 ± 0,26	10,12 ± 0,75	93,15 ± 6,75
		LNR	19,90 ± 1,65	3,42 ± 0,45	17,45 ± 1,42	136,08 ± 11,25
	Ext NE	WKY	23,92 N = 5	2,43 ± 0,34 NS vs. ES	14,34 ± 0,82 ##	122,85 ± 8,75 NS vs. ES
		SHR	29,22 N = 5	1,82 ± 0,25 NS vs. ES	10,80 ± 0,63 ###	110,18 ± 8,18 NS vs. ES
		LNR	19,88 N = 5	3,42 ± 0,44 #	17,44 ± 1,41 ##	135,87 ± 11,21 NS vs. ES
Po ischemii (PI) After ischemia (PI)	WKY	23,92 ± 1,77 N = 5	6,16 ± 0,47 *** ◆◆	20,62 ± 1,98 NS ◆	152,89 ± 10,05 NS NS	
	SHR	29,22 ± 1,81 N = 5	5,23 ± 0,43 *** ◆◆	22,95 ± 2,00 NS ◆◆◆	177,91 ± 6,63 *** ◆◆	
	LNR	19,88 ± 1,60 N = 5	6,32 ± 0,45 NS ◆◆	25,15 ± 3,08 *** ◆◆◆	174,00 ± 14,05 ** ◆◆	

$\Delta$ PP – różnica pomiędzy maksymalnym ciśnieniem perfuzyjnym (PP) bezpośrednio po ischemii a PP ustabilizowanym po ischemii.  $t_{1/2}$  i  $t_{90\%}$  - czas połowicznego i 90-procentowego zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej. Ext ES i Ext NE - odpowiedzi równoważne ( $\Delta$ PP) wyznaczone z liniowej zależności dawka-odpowiedź w danej procedurze. Test Fishera: \*, \*\*, \*\*\* -  $P < 0,05$ , 0,01, 0,001 – odpowiedzi po ischemii (PI) względem ES; ◆, ◆◆, ◆◆◆ -  $P < 0,05$ , 0,01 i 0,001 – PI względem NE; #, ## -  $P < 0,05$  i 0,01 równoważne odpowiedzi: NE względem ES.

$\Delta$ PP – difference between maximal perfusion pressure (PP) immediately after the ischemia and a further steady state PP.  $t_{1/2}$  i  $t_{90\%}$  - time of half-decay and 90%-decay of the vasoconstrictive response. Ext ES and Ext NE – equipotent ( $\Delta$ PP) responses obtained from the dose-response linear regression in a given procedure. F-test: \*, \*\*, \*\*\* -  $P < 0,05$ , 0,01 i 0,001 – postischemic responses (PI) vs. ES; ◆, ◆◆, ◆◆◆ -  $P < 0,05$ , 0,01 i 0,001 – PI vs. NE; #, ## -  $P < 0,05$  i 0,01 equipotent responses: NE vs. ES.

W preparatach WKY i LNR równoważne odpowiedzi naczyniokurczące trwały najdłużej, gdy były wyzwalane przez stymulację elektryczną, pośrednio – gdy zachodziły po wznowieniu perfuzji po ischemii i najkrócej, gdy były odpowiedzią na NE, o czym świadczą istotne różnice  $t_{90\%}$  (tab. 20). W grupie SHR odpowiedź na wznowienie ischemii charakteryzował  $t_{90\%}$  zbliżony do zarejestrowanego przy stymulacji elektrycznej oraz ponad dwukrotnie dłuższy w porównaniu odpowiedzi na NE. Pole zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej ( $S_{dec}$ ) było w preparatach SHR największe przy wznowieniu perfuzji, istotnie mniejsze w przypadku reakcji na NE, zaś najmniejsze, gdy odpowiedź była wyzwalana przez stymulację elektryczną (tab. 20, ryc. 52). W grupach WKY i LNR pole zaniku odpowiedzi na wznowienie perfuzji nie odbiegało w sposób istotny od zarejestrowanych przy stymulacji elektrycznej i po podaniu NE, przy czym pola zaniku równoważnych odpowiedzi na NE i na stymulację elektryczną były zbliżone.

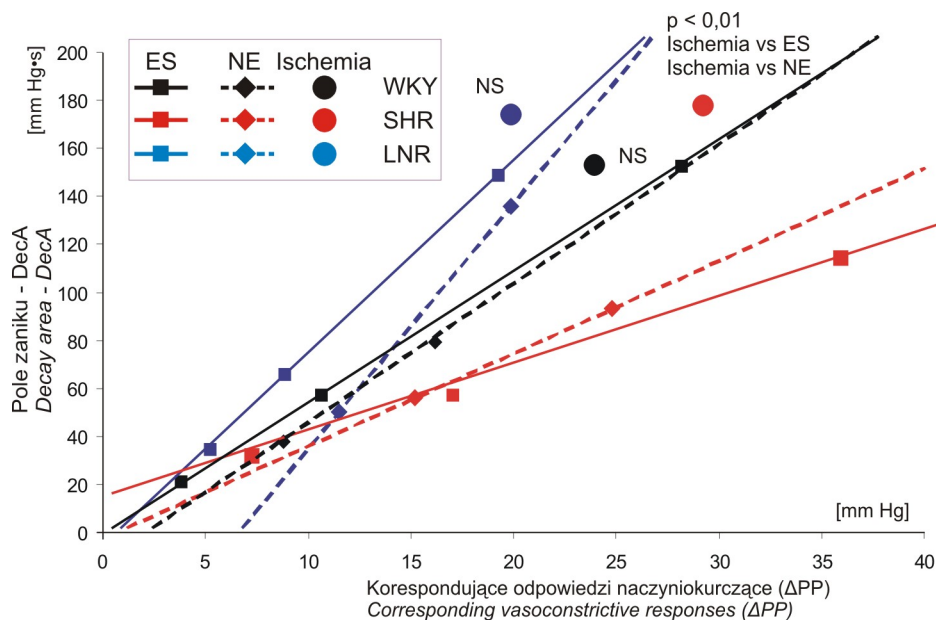


Linie regresji reprezentują zależność między odpowiedzią naczyniokurczącą ( $\Delta PP$ ) na noradrenalinę (NE) i dawką (0,1 i 0,2 ng) oraz między  $\Delta PP$  na stymulację elektryczną (ES; sekwencja 30 s, 10 Hz, 4 ms), a napięciem (5 i 8 V). Zgodny przebieg linii regresji w danej grupie świadczy o zbliżonym podłożu odpowiedzi naczyniokurczących. Znacząca odległość punktu reprezentującego odpowiedź na ischemię od linii regresji wyznaczonych z odpowiedzi na NE, lub ES jest wykładnikiem odmiennego mechanizmu tych odpowiedzi.

*Regression plots represent the relationship between the vasomotoric response ( $\Delta PP$ ) to norepinephrine (NE) and its dose (0.1 i 0.2 ng) as well as between  $\Delta PP$  to electrical stimulation (ES, 30 s trains, 10 Hz, 4 ms), and voltage (5 and, 8 V). High coherence of regression lines indicates similarity of mechanisms underlying the vasoconstrictive responses. Remarkable distance between the point representing the response to ischemia and the regression lines determined from the responses to NE or ES suggests different mechanisms of the both effects.*

Ryc. 51. Porównawcze zestawienie czasu połowicznego zaniku ( $t_{1/2}$ ) równoważnych odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną (ES), noradrenalinę (NE) i na wznowienie perfuzji po 20-min ischemii.

*Fig 51 Confrontation of time of half decay ( $t_{1/2}$ ) of the equipressor vasoconstrictive responses to the electrical stimulation, norepinephrine, and reintroduction of the perfusion after 20-min global ischemia*



Linie regresji reprezentują zależność między odpowiedzią naczyniokurczącą ( $\Delta PP$ ) na noradrenalinę (NE) i dawką (0,1 i 0,2 ng) oraz między  $\Delta PP$  na stymulację elektryczną (ES; sekwencja 30 s, 10 Hz, 4 ms), a napięciem (5 i 8 V). Zgodny przebieg linii regresji w danej grupie świadczy o zbliżonym podłożu odpowiedzi naczyniokurczących. Znacząca odległość punktu reprezentującego odpowiedź na ischemię od linii regresji wyznaczonych z odpowiedzi na NE, lub ES jest wykładnikiem odmiennego mechanizmu tych odpowiedzi.

*Regression plots represent the relationship between the vasomotoric response ( $\Delta PP$ ) to norepinephrine (NE) and its dose (0.1 i 0.2 ng) as well as between  $\Delta PP$  to electrical stimulation (ES, 30 s trains, 10 Hz, 4 ms), and voltage (5 and, 8 V). High coherence of regression lines indicates similarity of mechanisms underlying the vasoconstrictive responses. Remarkable distance between the point representing the response to ischemia and the regression lines determined from the responses to NE or ES suggests different mechanisms of the both effects.*

Ryc. 52. Porównawcze zestawienie pól zaniku równoważnych amplitudą odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną (ES), noradrenalinę (NE) i na wznowienie perfuzji po 20-min ischemii.

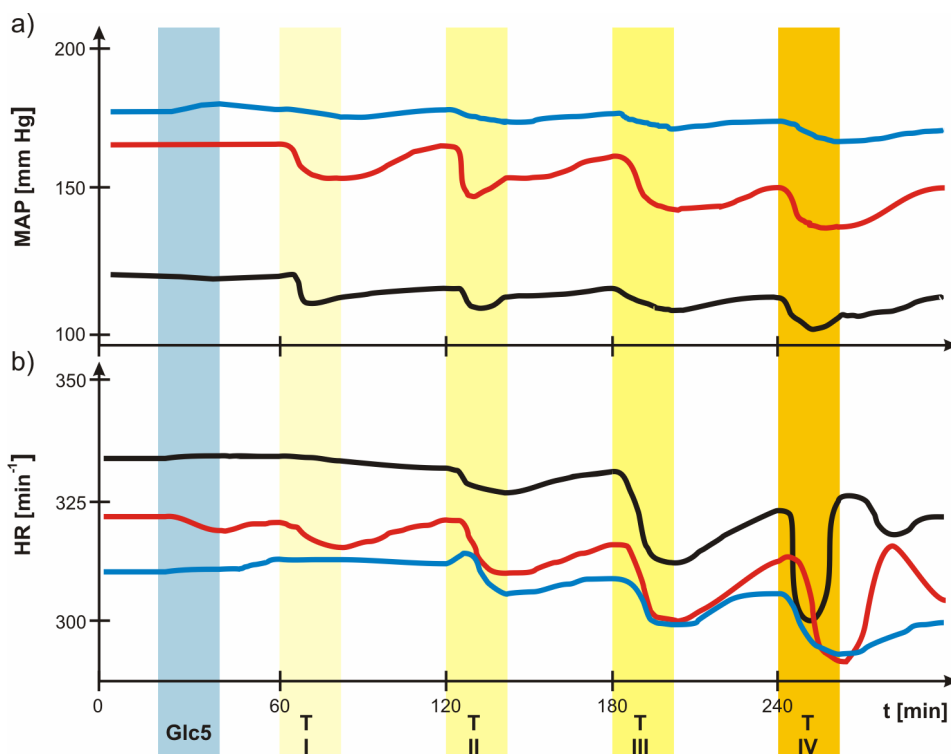
*Fig52 Confrontation of the decay area of the equipressor vasoconstrictive responses to the electrical stimulation (ES, norepinephrine (NE), and reintroduction of the perfusion after 20-min global ischemia.*

#### 4.5. Wpływ tempola na charakterystykę fali ciśnieniowej w aorcie

W ustabilizowanych warunkach początkowych Procedury 3.2.2.4 średnie ciśnienie tętnicze (MAP) and HR wynosiło  $118,25 \pm 6,25$  mm Hg w grupie WKY,  $164,45 \pm 8,07$  mm Hg w SHR i  $177,93 \pm 6,33$  mm Hg u szczurów LNR, zaś HR wynosiła:  $333,87 \pm 8,55$  w grupie WKY,  $320,54 \pm 11,20$  w grupie SHR i  $309,02 \pm 6,42$  mm Hg u szczurów LNR. Podczas 20-minutowej infuzji izotonicznym roztworem glukozy (Glc5; ryc. 53) MAP i HR nie zmieniły się w sposób istotny. Jedynie w grupie LNR zanotowano przejściowy, nieznamienisty wzrost SBP o  $2,65 \pm 1,30$  mm Hg. Podczas kolejnych infuzji roztworami tempola o wzrastającym stężeniu obserwowano stopniowy spadek MAP,



proporcjonalny do stężenia tempola, który był zaznaczony w największym stopniu w grupie SHR (maksymalnie o  $-27,31 \pm 5,22$  mm Hg) w mniejszym u szczurów LNR (maksymalnie o  $-18,57 \pm 4,25$  mm Hg) i WKY (maksymalnie o  $-16,11 \pm 4,60$  mm Hg; ryc. 53). Podczas infuzji tempola HR uległa znamiennej zmianie w obu grupach szczurów nadciśnieniowych i u szczurów WKY przy podawaniu dawek 0,2 i 2 mmol/kg/20min. W grupie WKY maksymalna zmiana HR wynosiła:  $-27,72 \pm 6,31$  min<sup>-1</sup>, w grupie SHR:  $-31,79 \pm 8,08$  min<sup>-1</sup>, zaś w LNR  $-17,69 \pm 6,50$  min<sup>-1</sup>. Po zakończeniu każdej z infuzji tempola występowała tendencja do powrotu MAP i HR do wartości wyjściowych (ryc. 53).



Pola zacieniowane odpowiadają 20-minutowym okresom podawania tempola, lub izotonicznej, 5% glukozy (Glc5). T I, T II, T III, T IV – kolejne dawki tempola podawane w 20-minutowej infuzji dożylniej: 0,002, 0,02, 0,2 i 2 mmol/kg. Linie: czarna – WKY, czerwona – SHR, niebieska – LNR  
 Shaded areas reflects 20-min tempol infusion periods, or 5% dextrose (Glc5) infusion. T I, T II, T III, T IV – subsequent tempol doses administered in 20-min infusion: 0,002, 0,02, 0,2 and 2 mmol/kg. Lines: black – WKY, red – SHR, blue – LNR.

Ryc. 53. MAP i HR podczas 20-min. infuzji dożylnych wzrastających dawek tempola.

Fig. 53. MAP and HR during 20-min infusions of increasing doses of tempol.

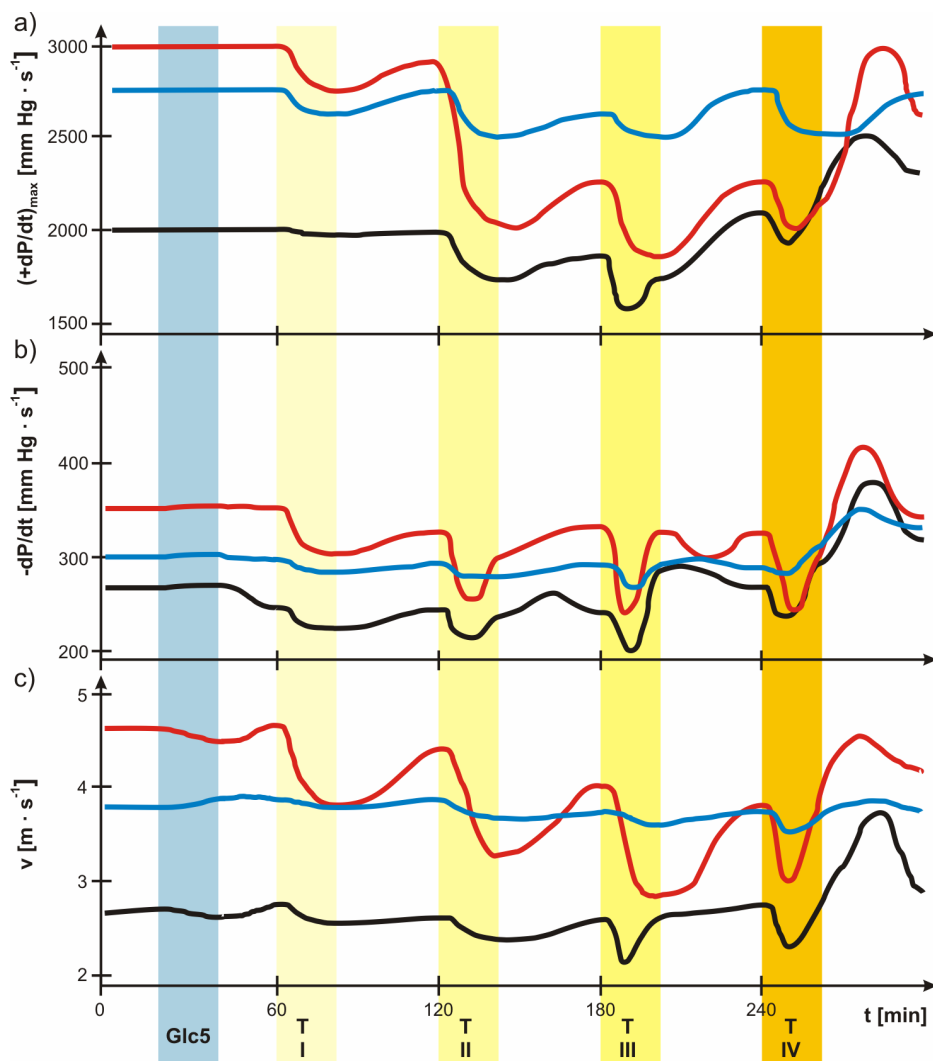
W warunkach standardowych u szczurów WKY maksymalna szybkość narastania ciśnienia tętniczego w aorcie (+dP/dt)<sub>max</sub> osiągnęła przeciętnie  $2001,50 \pm 97,37$  mm Hg·s<sup>-1</sup>; ryc 54a, szybkość rozkurczowego spadku ciśnienia tętniczego w aorcie (-dP/dt) wynosiła  $-267,50 \pm 34,15$  mmHg·s<sup>-1</sup>; ryc 54b), a fala tętna rozprzestrzeniła się w aorcie z szybkością (v)  $2,69 \pm 0,14$  m·s<sup>-1</sup>; ryc 54c). W obu grupach nadciśnieniowych: SHR

i LNR wartości  $(+dP/dt)_{max}$ ,  $-dP/dt$  i  $v$  były istotnie większe i wynosiły:  $(+dP/dt)_{max}$ :  $3028,50 \pm 135,53 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$  w grupie SHR ( $P < 0,001$  vs WKY),  $2738,21 \pm 171,55 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$  w grupie LNR ( $P < 0,01$  vs WKY; NS vs SHR);  $-dP/dt$ :  $-351,55 \pm 27,00 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$  w grupie SHR ( $P < 0,05$  vs WKY),  $-295,50 \pm 15,34 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$  w grupie LNR (NS vs WKY;  $P < 0,05$  vs SHR), zaś  $v$ :  $4,64 \pm 0,75 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  w grupie SHR ( $P < 0,001$  vs WKY) i  $3,67 \pm 0,69 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  w grupie LNR ( $P < 0,01$  vs WKY;  $P < 0,05$  vs SHR). Podczas 20-min infuzji 1 ml 5% glukozy i bezpośrednio po niej wartości  $(+dP/dt)_{max}$ ,  $-dP/dt$  i  $v$  nie uległy istotnej zmianie (ryc. 54).

Podczas 20-min infuzji roztworów tempola w zakresie dawek: 0,002 do 0,2 mmol/kg  $(+dP/dt)_{max}$  zmniejszała się w sposób proporcjonalny do podawanej dawki, w największym stopniu w grupie SHR ( $-39,85 \pm 10,33\%$ ), mniejszym w WKY ( $-19,89 \pm 4,04\%$ ) i najmniejszym w grupie LNR ( $-8,97 \pm 4,25\%$ , NS). Po zakończeniu kolejnych infuzji wartości  $(+dP/dt)_{max}$  stopniowo zbliżały się do wyjściowych, nie osiągając jednak ich poziomu (ryc. 54a). W okresie między około 8 -15 min od rozpoczęcia podawania największej z zastosowanych dawek tempola 2 mmol/kg, a 2 do 5 min. po zakończeniu infuzji szczury wykazywały objawy pobudzenia, wykazując znaczne zainteresowanie otoczeniem, intensywnie węsząc i przemieszczając się w obrębie klatek doświadczalnych. Podczas podawania tej dawki w grupach WKY i SHR obserwowano odpowiedź dwufazową: po trwającym do 5 do 8 min zmniejszeniu  $(+dP/dt)_{max}$  dochodziło do jego wzrostu, którego szczyt występował między 14 a 30 min po zakończeniu podawania tempola (WKY:  $+27,29 \pm 11,15\%$ ; SHR:  $-0,97 \pm 8,35\%$  względem warunków standardowych na początku doświadczenia). W grupie LNR nie zaobserwowano fazy wzrostu  $(+dP/dt)_{max}$  podczas podawania tempola.

Podczas podawania tempola  $-dP/dt$  ulegało istotnemu zmniejszeniu, proporcjonalnie do zastosowanych dawek, przy czym największa odpowiedź wystąpiła podczas podawania dawki 0,2 mmol/kg: w grupie WKY o  $-24,54 \pm 3,11\%$ , SHR:  $-31,84 \pm 3,05$  i LNR –  $5,47 \pm 1,86\%$  (ryc. 54b). Ze wzrostem dawki tempola skracał się czas po którym dochodziło do maksymalnej redukcji  $-dP/dt$ : 22 min od rozpoczęcia podawania dawki 0,002 mmol/kg (czyli przeciętnie 2 min po zakończeniu infuzji), 13 min – 0,02 mmol/kg, 7 min – 0,2 mmol/kg i 5 min – 2 mmol/kg. Po osiągnięciu lokalnego minimum  $-dP/dt$ , obserwowano drugą fazę odpowiedzi o kierunku przeciwnym, szczególnie wyraźnie zaznaczoną w końcowej fazie 20-min infuzji tempola w dawkach 0,2 i 2 mmol/kg i przy dawce 2 mmol/kg do 30 min po jej zakończeniu (ryc. 54b). Faza wzrostu  $-dP/dt$  była największa w grupie WKY ( $+9,68 \pm 4,25\%$  - tempol 0,2 mmol/kg,  $+42,25 \pm 13,30\%$  - tempol 2 mmol/kg), a w grupach SHR i LNR zaznaczyła się w sposób istotny po zakończeniu infuzji dawki 2 mmol/kg (SHR:  $+19,17 \pm 8,33\%$ , LNR:  $+17,05 \pm 6,88\%$ ).

Pod wpływem tempola szybkość rozprzestrzeniania fali tętna ( $v$ ) zmniejszała się proporcjonalnie do podawanej dawki (ryc. 54c), po czym obserwowano powolny trend powrotu do wartości wyjściowych. W grupach WKY i SHR największą zmianę  $v$  zanotowano w trakcie infuzji dawki 0,2 mmol/kg (odpowiednio:  $-25,28 \pm 4,59\%$  i  $-38,15 \pm 7,22\%$ ) a w grupie LNR - 2 mmol/kg ( $-7,78 \pm 3,61\%$ , NS). Przy podawaniu dawki tempola 2 mmol/kg, a także dawki – 0,2 mmol/kg w grupie WKY, po początkowym zmniejszeniu  $v$ , obserwowano fazę wzrostu, której szczyt występował między 11 a 25 min. od zakończenia 20-min infuzji (ryc. 54c). W stosunku do wartości standardowych z początku doświadczenia oraz wartości w momencie rozpoczęcia podawania tempola w dawce 2 mmol/kg, maksimum fazy wzrostu  $v$  osiągnęło: w grupie WKY  $+23,20 \pm 5,57\%$  i  $25,76 \pm 5,01\%$ , w grupie SHR:  $-3,31 \pm 7,00\%$  i  $+15,72 \pm 4,02\%$ , zaś w grupie LNR:  $+3,49 \pm 4,41\%$  i  $6,04 \pm 3,05\%$  (NS).



a)  $(+dP/dt)_{max}$  – maksymalna szybkość narastania ciśnienia w aorcie, b)  $-dP/dt$  – szybkość rozkurczowego spadku ciśnienia w aorcie, c)  $v$  – szybkość rozprzestrzeniania fali ciśnienia w aorcie.

Pola zacieniowane odpowiadają 20-minutowym okresom podawania tempola, lub izotonicznej, 5% glukozy (Glc5). T I, T II, T III, T IV – kolejne dawki tempola podawane w 20-minutowej infuzji dożylniej: 0,002, 0,02, 0,2 i 2 mmol/kg. Linie: czarna – WKY, czerwona – SHR, niebieska – LNR

a)  $(+dP/dt)_{max}$  – maximal dynamics of the increase of pressure in aorta b)  $-dP/dt$  – dynamics of the diastolic fall of pressure in aorta c)  $v$  – velocity of the aortal pressure wave

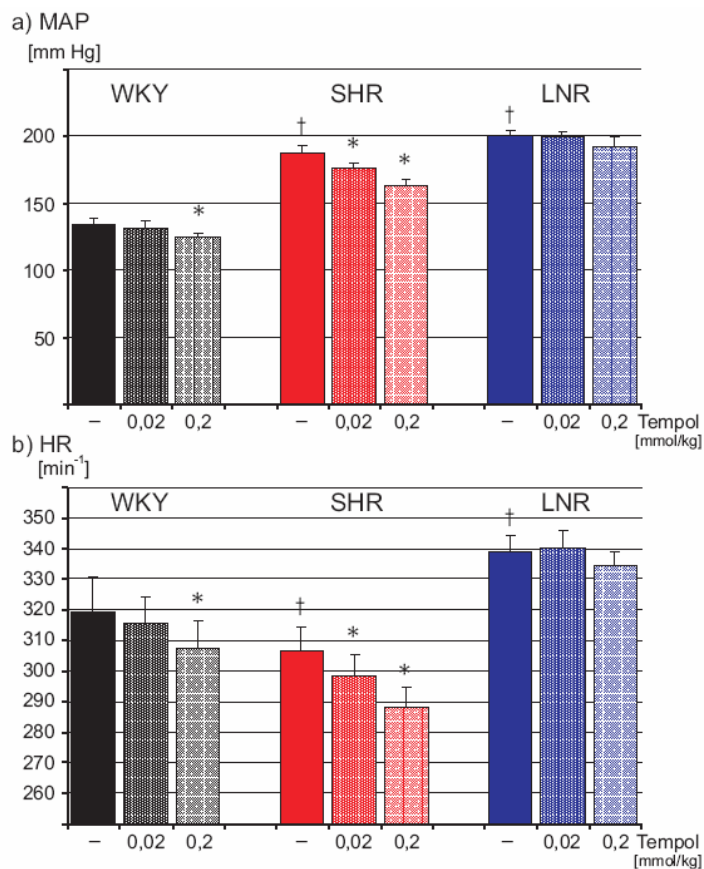
Shaded areas reflects 20-min tempol infusion periods, or 5% dextrose (Glc5) infusion. T I, T II, T III, T IV – subsequent tempol doses administered in 20-min infusion: 0,002, 0,02, 0,2 and 2 mmol/kg. Lines: black – WKY, red – SHR, blue – LNR.

Ryc. 54. Charakterystyka podatności wysokociśnieniowego układu tętniczego.

Fig. 54. Characteristics of compliance of the high-pressure arterial system.

#### 4.6. Ocena wpływu tempola na odruch z baroreceptorów tętnicznych

W warunkach standardowych (Procedura 3.2.2.5) MAP było istotnie wyższe w grupach SHR i LNR w stosunku do ich odpowiedników normotensyjnych WKY (ryc. 55), przy czym szczury SHR demonstrowały istotnie wolniejszą HR, zaś LNR istotnie szybszą. Po podaniu dożylnych dawek tempola obserwowano obniżenie MAP: największe w grupie SHR, umiarkowane, lecz statystycznie istotne po dawce 0,2 mmol/kg w grupie WKY i nieistotne w grupie LNR.



test Kruskala-Wallis: \* $P < 0,05$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Wilcoxon; †  $P < 0,05$  SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Manna-Whitneya.

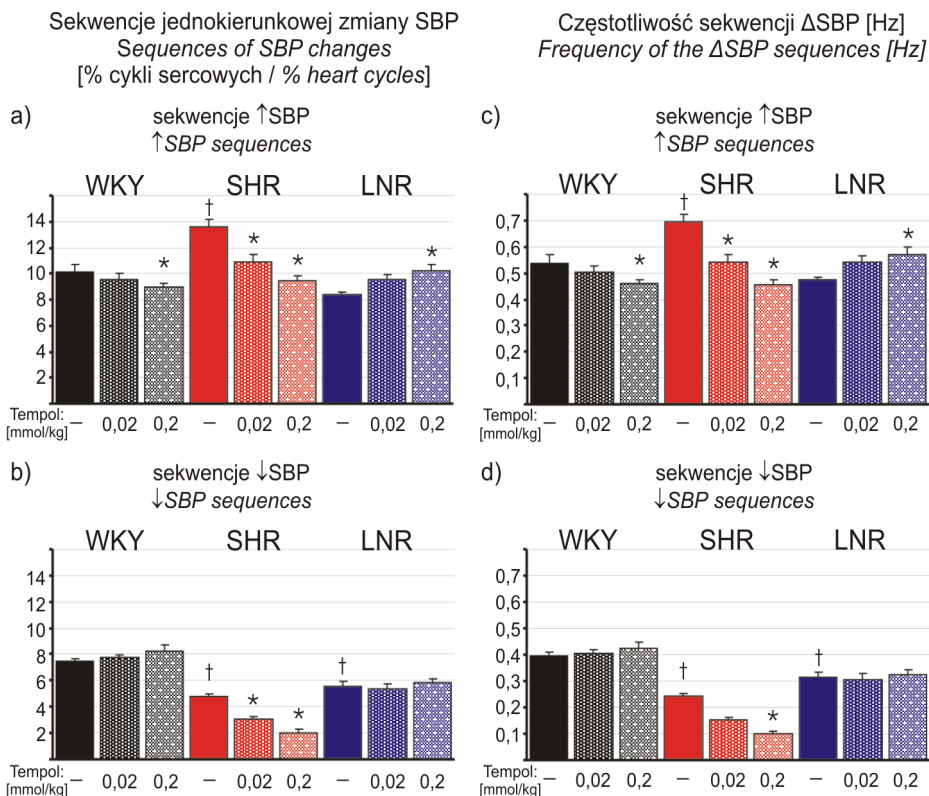
Kuskal-Wallis test \* $P < 0.05$  tempol vs. control of each group - Wilcoxon test; † $P < 0.05$  SHR or LNR vs. WKY - Mann-Whitney test.

Ryc. 55. Wpływ tempola średnie ciśnienie tętnicze (MAP) i częstość akcji serca (HR).

Fig. 55. Effect of tempol on mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR).

Tempol w sposób zależny od dawki zmniejszał HR w grupach WKY i SHR, zaś w grupie LNR zwolnienie HR miało być minimalne i występowało jedynie po podaniu większej z zastosowanych dawek tempola – 0,2 mmol/kg.

We wszystkich zapisach ciśnienia tętniczego rejestrowanych w ramach Procedury 3.2.2.5 zarejestrowano liczne sekwencje wzrostu i spadku ciśnienia tętniczego, na które składały się najczęściej 3 do 4, rzadziej 5 do 6 kolejnych jednokierunkowych zmian SBP, występujące w nieregularnych odstępach czasu. Sekwencje wzrostu SBP (ryc. 56a) występowały istotnie częściej niż sekwencje spadku SBP. Częstotliwość sekwencji wzrostu SBP była istotnie większa w grupie SHR niż w pozostałych grupach (ryc. 56c), natomiast częstotliwość sekwencji spadku SBP była istotnie mniejsza w obu grupach z nadciśnieniem tętniczym (SHR i LNR) w porównaniu do kontroli WKY (ryc. 56d).



$\uparrow$  SBP,  $\downarrow$ SBP – sekwencja wzrostu ( $\uparrow$ ), lub spadku ( $\downarrow$ ) SBP występująca w conajmniej 3 kolejnych cyklach sercowych; ANOVA: \*  $P < 0,05$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Wilcozona; †  $P < 0,05$  SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Fishera

$\uparrow$  SBP,  $\downarrow$ SBP – sequence of an increase ( $\uparrow$ ), or decrease ( $\downarrow$ ) of SBP to occur in at least 3 consecutive heart cycles; ANOVA: \*  $P < 0.05$  tempol vs. control of each group – Wilcoxon test; †  $P < 0.05$  SHR or LNR vs. WKY - F - test.

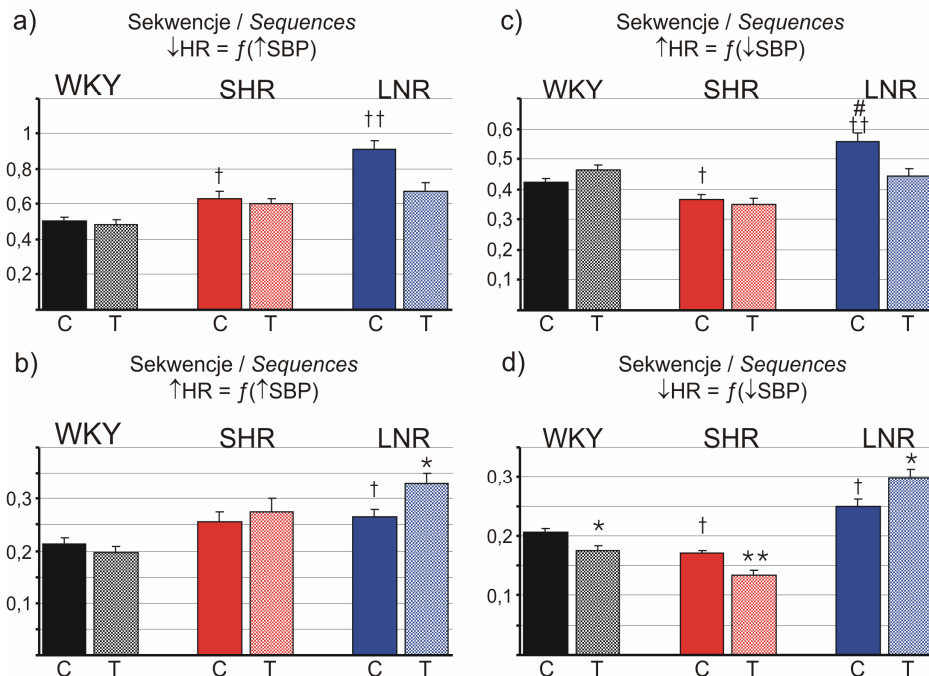
Ryc. 56. Sekwencje zmiany ciśnienia tętniczego wyrażone jako odsetek cykli sercowych oraz ich częstotliwość.

Fig. 56. Sequences of change in arterial pressure expressed as a percent of heart cycles and their frequency.

Tempol w sposób zależny od dawki zmniejszał częstotliwość występowania obydwu rodzajów sekwencji ciśnieniowych w grupie SHR i nieznacznie zmniejszał częstotliwość sekwencji wzrostu SBP w grupie WKY. Tempol nie wpływał znacząco na częstotliwość występowania sekwencji spadku SBP w grupach WKY i LNR, natomiast po większej z jego zastosowanych dawek – 0,2 mmol/kg obserwowano zwiększenie częstotliwości sekwencji wzrostu SBP w grupie LNR.

Oprócz sekwencji ciśnieniowych zarejestrowano liczne sekwencje zmian HR, z których część rozpoczynała się niemal równocześnie z sekwencjami SBP lub z opóźnieniem kilku cykli sercowych. Sekwencje zmiany HR, które rozpoczynały się rozpoczynały się po rozpoczęciu sekwencji SBP, ale nie później niż po 6 cyklach sercowych zostały uznane jako sekwencje skojarzone z sekwencjami ciśnieniowymi. Obserwowano także występowanie sekwencji jednokierunkowych zmian HR występujących niezależnie od zmian SBP. Charakterystykę dwóch typów sekwencji skojarzonych (sekwencje zgodne, w których kierunek zmiany SBP i odstepu RR były zgodne, a zatem zmiany SBP i HR miały kierunek przeciwny oraz sekwencje niezgodne, w których SBP i HR zmieniały się w tym samym kierunku) przedstawiono na rycinach 57-59. Średnie opóźnienie sekwencji  $\Delta HR$  względem  $\Delta SBP$  zależało od rodzaju sekwencji i różniło się między grupami szczurów. Zakres przesunięcia fazowego wyrażonego w cyklach sercowych wynosił od  $0,133 \pm 0,010$  [ $RRi^{-1}$ ] w grupie SHR po podaniu tempola – 0,2 mmol/kg do  $0,915 \pm 0,049$  [ $RRi^{-1}$ ] w grupie LNR przed podaniem tempola. Opóźnienie sekwencji  $\Delta HR$  względem  $\Delta SBP$  było istotnie krótsze przy sekwencjach niezgodnych (ryc. 57b,d; zakres przesunięcia fazowego od  $0,133 \pm 0,010$  [ $RRi^{-1}$ ] w grupie SHR po podaniu tempola do  $0,298 \pm 0,014$  [ $RRi^{-1}$ ], w grupie LNR po podaniu tempola), w porównaniu do sekwencji zgodnych (ryc. 57a,c; zakres przesunięcia fazowego od  $0,352 \pm 0,018$  [ $RRi^{-1}$ ] w grupie SHR po podaniu tempola do  $0,915 \pm 0,049$  [ $RRi^{-1}$ ], w grupie LNR przed podaniem tempola tempola), zarówno w sekwencjach wzrostu SBP, jak też jego spadku. U szczurów SHR i LNR skojarzone sekwencje  $\Delta HR$  inicjowane wzrostem SBP (ryc. 57a,b) występowały przesunięciem fazowym istotnie większym niż w grupie WKY. Przy sekwencjach  $\Delta HR$  inicjowanych SBP (ryc. 57c,d) w grupie LNR obserwowano większe opóźnienie sekwencji sercowych, natomiast w grupie SHR przesunięcie fazowe było istotnie mniejsze zarówno względem grupy WKY, jak i LNR. W dawce 0,02 mmol/kg tempol nie wpłynął w sposób istotny na opóźnienie sekwencji sercowych względem ciśnieniowych i dla uproszczenia dawka ta nie została uwzględniona na ryc. 57. Z kolei w dawce 0,2 mmol/kg tempol nie wpłynął w sposób na opóźnienie sekwencji  $\Delta HR$  względem  $\Delta SBP$  przy sekwencjach zgodnych ( $\downarrow HR = f(\uparrow SBP)$ , ryc. 57a;  $\uparrow HR = f(\downarrow SBP)$ , ryc. 57c), jakkolwiek w grupie LNR zaznaczyła się wyraźna tendencja ( $P < 0,07$ ) do zmniejszenia przesunięcia fazowego. W przypadku sekwencji niezgodnych (ryc. 57b,d) tempol (0,2 mmol/kg) istotnie zwiększał przesunięcie fazowe u szczurów LNR, nie wpływał na opóźnienie sekwencji wzrostu HR skojarzonych ze wzrostem SBP (ryc. 57b), natomiast zmniejszał opóźnienie sekwencji spadku HR skojarzonych ze spadkiem SBP w grupach WKY i SHR (ryc. 57d).

**Opóźnienie sekwencji sercowych ( $\Delta HR$ ) względem ciśnieniowych ( $\Delta SBP$ )**  
**Lag between  $\Delta HR$  vs.  $\Delta SBP$  sequences**  
 **$[(\text{odstęp RR})^{-1} / (\text{RR interval})^{-1}]$**



Przy równoczesnej rejestracji EKG i fali ciśnieniowej (ryc. 8) wystąpienie załamka R poprzedzało wzrost ciśnienia tętniczego w aortie. W większości sekwencji skojarzonych zmiana HR rozpoczęła się po czasie krótszym od 1 cyklu serca w stosunku do początku zmiany SBP w poprzedzającej fali ciśnieniowej. W obliczeniach przesunięcia czasowego między sekwencją  $\Delta HR$  i  $\Delta SBP$  przyjęto, że wartość takiego przesunięcia wynosi 0.

C – szczury przed podaniem tempola; T – szczury po podaniu tempola – 0,2 mmol/kg;  $\uparrow SBP$ ,  $\downarrow SBP$ ,  $\uparrow HR$ ,  $\downarrow HR$  – sekwencja wzrostu ( $\uparrow$ ), lub spadku ( $\downarrow$ ) SBP, lub HR występująca w conajmniej 3 kolejnych cyklach sercowych; \*  $P < 0,05$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy – test Manna-Whitneya; †  $P < 0,05$  SHR lub LNR w stosunku do WKY – ANOVA, test Tukeya.

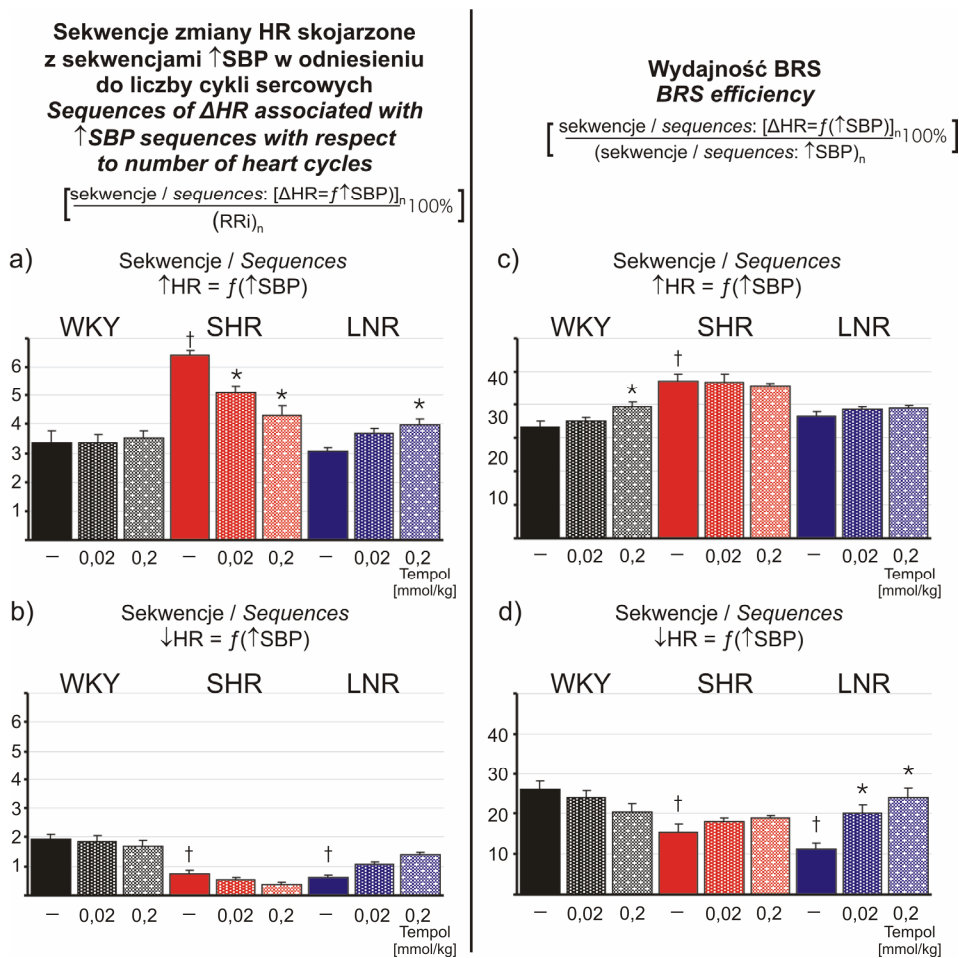
*At simultaneous recording of ECG and sphygmogram (ryc. 8) R wave occurred prior to increase of blood pressure in aorta. In the majority of the associated sequences the of sequential change in HR was initiated after a period shorter than 1 heart cycle from the beginning of the initial change in SBP. The value of the such shift has been concerned as 0 in computing of the phase shift between  $\Delta HR$  and  $\Delta SBP$ .*

*C – rats before the tempol administration, T – rats following tempol – 0,2 mmol/kg;  $\uparrow SBP$ ,  $\downarrow SBP$ ,  $\uparrow HR$ ,  $\downarrow HR$  – sequence of an increase ( $\uparrow$ ), or a decrease ( $\downarrow$ ) of SBP or HR to occur in at least 3 consecutive heart cycles; \*  $P < 0.05$  tempol vs. control of each group – Mann-Whitney test; †  $P < 0.05$  SHR or LNR vs. WKY – ANOVA, Tukey test.*

Ryc. 57. Średnie przesunięcie fazowe sekwencji  $\Delta HR$  względem sekwencji  $\Delta SBP$ .  
 Fig. 57. Mean phase shift between  $\Delta HR$  Sequences vs.  $\Delta SBP$  sequences.

Charakterystykę ilościową występowania sekwencji sercowych skojarzonych z sekwencjami wzrostu SBP przedstawia ryc. 58, której fragmenty górne (a,c) odnoszą się do sekwencji niezgodnych ( $\downarrow RR_i$  jest funkcją  $\uparrow SBP$ , czyli  $\uparrow HR = f(\uparrow SBP)$ ), zaś dolne (b,d) do zgodnych ( $\uparrow RR_i = f(\uparrow SBP)$ ). Zestawienie rycin: 58a z 58b oraz 58c z 58d uwidacz-

nia, że we wszystkich grupach częstość występowania sekwencji niezgodnych, a także ich wydajność, wyrażająca odsetek skojarzonych sekwencji sercowych w stosunku do liczby danych sekwencji ciśnieniowych w analizowanym przedziale czasowym była istotnie większa od sekwencji zgodnych.



$\uparrow$  SBP,  $\uparrow$  HR,  $\downarrow$ HR – sekwencja wzrostu ( $\uparrow$ ), lub spadku ( $\downarrow$ ) SBP, lub HR występująca w conajmniej 3 kolejnych cyklach sercowych; ANOVA: \*  $P < 0,05$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Wilcoxon; †  $P < 0,05$  SHR lub LNR w stosunku do WKY- test Tukeya.

$\uparrow$  SBP,  $\uparrow$ HR,  $\downarrow$ HR – sequence of an increase ( $\uparrow$ ), or a decrease ( $\downarrow$ ) of SBP or HR to occur in at least 3 consecutive heart cycles; ANOVA: \*  $P < 0,05$  tempol vs. control of each group – Wilcoxon test; †  $P < 0,05$  SHR or LNR vs. WKY - Tukey test.

Ryc. 58. Występowanie sekwencji sercowych skojarzonych z sekwencjami wzrostu SBP  
 Fig. 58. Occurrence of the HR sequences coupled to the sequences of an increase of SBP

Iloraz częstości występowania sekwencji niezgodnych względem zgodnych był w warunkach kontrolnych, przed podaniem tempola większy w grupie LNR ( $3,25 \pm 0,32$ ) i

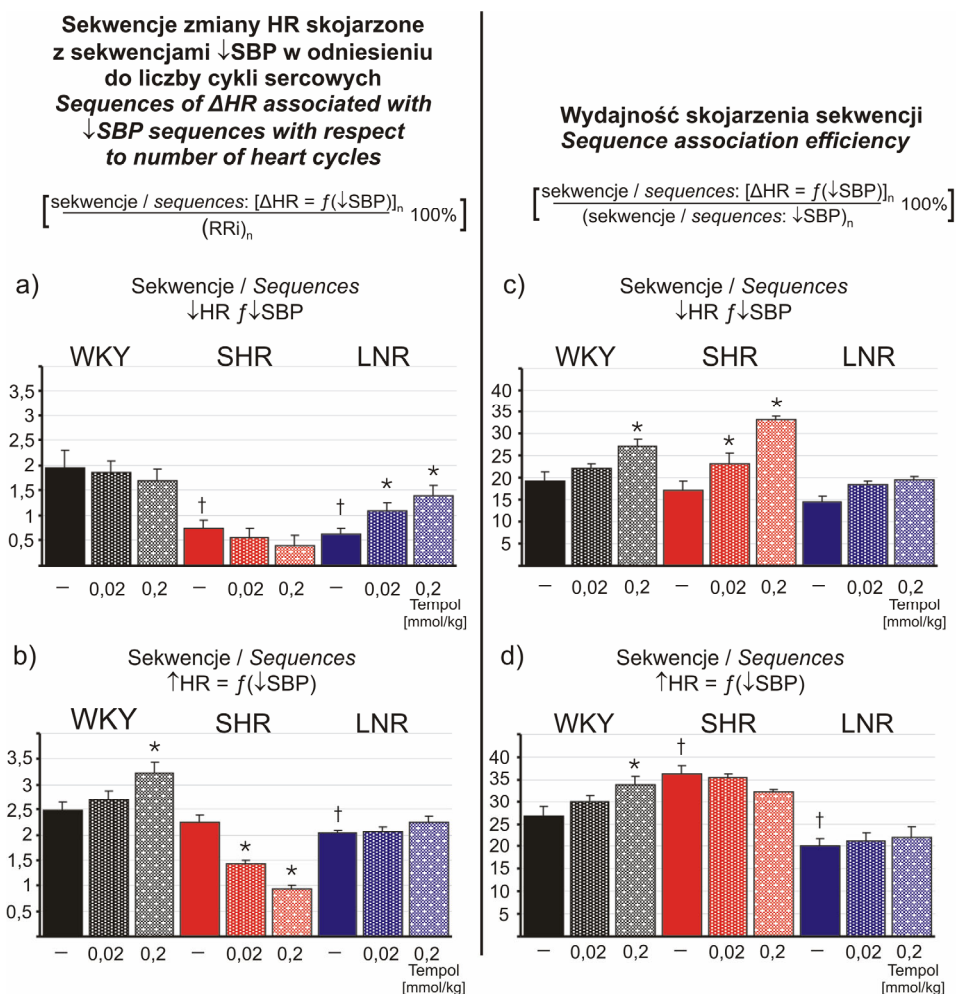


SHR ( $3,03 \pm 0,41$ ), od WKY ( $1,27 \pm 0,16$ ,  $P < 0,001$ ). W rankingu ilorazu wydajności skojarzenia sekwencji najwyższą wartość stwierdzono w grupie SHR ( $8,62 \pm 0,75$ ), mniejszą u szczurów LNR ( $4,89 \pm 0,68$ ) i zdecydowanie najmniejszą w WKY ( $1,72 \pm 0,38$ ). W grupie SHR stwierdzono istotnie większą częstość występowania niezgodnych sekwencji sercowych skojarzonych ze wzrostem SBP i większą ich wydajność niż w pozostałych grupach. Z kolei w obu grupach nadciśnieniowych: SHR i LNR częstość występowania zgodnych sekwencji sercowych skojarzonych ze wzrostem SBP i ich wydajność ich skojarzenia (BEI) była znamiennej mniejsza. Tempol nie wpłynął na częstość występowania sekwencji zgodnych (ryc. 58c), natomiast w sposób zależny od dawki zmniejszył częstość występowania sekwencji niezgodnych w grupie SHR (ryc. 58a) i zwiększył w grupie LNR. W obu grupach nadciśnieniowych tempol nie wpłynął na wydajność skojarzenia sekwencji niezgodnych, natomiast w dawce 0,2 mmol/kg zwiększył tę wydajność w grupie WKY. Po podaniu tempola stwierdzono zwiększenie wydajności skojarzenia sekwencji zgodnych sekwencji (BEI) w grupie LNR i analogiczną, chociaż niestotną statystycznie tendencję w grupie SHR.

Charakterystykę ilościową występowania sekwencji sercowych skojarzonych z sekwencjami spadku SBP przedstawia ryc. 59, której fragmenty górne (a,c) odnoszą się do sekwencji niezgodnych ( $(\uparrow RR_i = f(\downarrow SBP))$ , czyli  $\downarrow HR = f(\downarrow SBP)$ ), zaś dolne (b,d) do zgodnych ( $(\downarrow RR_i = f(\downarrow SBP))$ ), ich skojarzenia. Jedynie w grupie LNR po podaniu tempola iloraz obu wydajności był zbliżony. Wydajność sekwencji niezgodnych, była we wszystkich grupach istotnie mniejsza niż sekwencji zgodnych, o czym świadczy wartość ich ilorazu mniejsza od 1 (zakres od:  $0,31 \pm 0,06$  – grupa LNR przed podaniem tempola do  $0,79 \pm 0,12$  grupa WKY przed podaniem tempola).

Iloraz częstości występowania sekwencji niezgodnych względem zgodnych był w warunkach kontrolnych, a w grupach WKY i LNR także po podaniu tempola istotnie mniejszy od obliczonego dla sekwencji zgodnych i wynosił: w grupie WKY:  $0,72 \pm 0,17$ ,  $0,74 \pm 0,09$  i  $0,81 \pm 0,11$  (odpowiednio: przed i podaniem tempola –  $0,02$  i  $0,2$  mmol/kg), w grupie SHR:  $0,47 \pm 0,10$ ,  $0,65 \pm 0,15$  i  $1,03 \pm 0,22$  (odpowiednio: przed i podaniem tempola –  $0,02$  i  $0,2$  mmol/kg) a w grupie LNR –  $0,71 \pm 0,08$ ,  $0,86 \pm 0,13$  i  $0,89 \pm 0,14$  (odpowiednio: przed i po podaniu tempola –  $0,02$  i  $0,2$  mmol/kg).

Przed podaniem tempola częstotliwość sekwencji niezgodnych ( $(\downarrow HR = f(\downarrow SBP))$ ) była istotnie mniejsza niż w grupie WKY (ryc 59a) przy zbliżonej wydajności skojarzenia sekwencji (ryc 59c). Po podaniu tempola w grupach WKY i SHR wystąpiła tendencja do zmniejszenia częstości występowania tych sekwencji. natomiast w grupie LNR tempol zaobserwowano istotny efekt o kierunku odwrotnym (ryc 59a). Po podaniu tempola zarejestrowano w grupach WKY i SHR zwiększenie wydajności skojarzenia sekwencji  $\downarrow HR = f(\downarrow SBP)$ , podczas gdy u szczurów LNR istotnej zmiany nie zaobserwowano. W porównaniu do szczurów WKY częstość występowania sekwencji sercowych zgodnych z sekwencjami spadku SBP ( $(\uparrow HR = f(\downarrow SBP))$ ) była w warunkach kontrolnych nieznacznie mniejsza w obu grupach nadciśnieniowych (SHR –  $P < 0,2$ , NS; LNR  $P < 0,05$ ; ryc. 59b), przy czym ich wydajność (BEI) była większa w grupie SHR ( $P < 0,01$ ) i mniejsza w grupie LNR ( $P < 0,05$ ). Po podaniu tempola stwierdzono wzrost częstości występowania sekwencji  $\uparrow HR = f(\downarrow SBP)$  u szczurów WKY, jej istotne zmniejszenie w grupie SHR i brak efektu w grupie LNR (ryc. 59b). Po podaniu tempola w dawce 0,2 mmol/kg zaobserwowano zwiększenie BEI u szczurów WKY, zaś w pozostałych grupach BEI pozostała praktycznie niezmienną (ryc. 59d).



↓SBP, ↑HR, ↓HR – sekwencja wzrostu (↑), lub spadku (↓) SBP, lub HR występująca w co najmniej 3 kolejnych cyklach sercowych; ANOVA: \*  $P < 0,05$  tempol w stosunku do kontroli danej grupy - test Wilcoxon; †  $P < 0,05$  SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Tukeya.

↓SBP, ↑HR, ↓HR – sequence of an increase (↑), or a decrease (↓) of SBP or HR to occur in at least 3 consecutive heart cycles; ANOVA: \*  $P < 0.05$  tempol vs. control of each group – Wilcoxon test; †  $P < 0.05$  SHR or LNR vs. WKY - Tukey test.

Ryc. 59. Występowanie sekwencji sercowych skojarzonych z sekwencjami spadku SBP  
 Fig. 59. Occurrence of the HR sequences coupled to the sequences of a decrease in SBP

Częstość sekwencji zmiany HR skojarzonych z sekwencjami zmiany SBP i wydajność ich skojarzenia była ilościowo odmienna przy sekwencjach sercowych inicjowanych wzrostami i spadkami SBP. Porównanie sekwencji skojarzonych o niezgodnym kierunku zmian RRi i SBP ( $(\uparrow HR f = (\uparrow SBP))$  vs  $\downarrow HR = f(\downarrow SBP)$ ; ryc. 58 i 59)) ujawniło istotnie większą częstość występowania i większą wydajność skojarzenia sekwencji zgodnych skojarzonych ze wzrostem, niż ze spadkiem SBP. W poszczególnych grupach stosunek częstości sekwencji niezgodnych związanych ze wzrostem do sekwencji związanych ze spadkiem SBP wynosił: w grupie WKY:  $1,73 \pm 0,25$ ,  $1,80 \pm 0,16$ ,  $2,08 \pm 0,14$ ;

w grupie SHR:  $8,62 \pm 0,88$ ,  $9,29 \pm 0,70$ ,  $11,14 \pm 0,74$ , a w grupie LNR:  $4,89 \pm 0,12$ ,  $3,40 \pm 0,21$  i  $2,88 \pm 0,14$  (odpowiednio przed tempolem i po podaniu jego dawek: 0,02 i 0,2 mmol/kg), zaś odpowiedni iloraz wydajności skojarzenia sekwencji wynosił: w grupie WKY:  $1,72 \pm 0,17$ ,  $1,59 \pm 0,12$ ,  $1,44 \pm 0,19$ , w grupie SHR:  $2,76 \pm 0,34$ ,  $2,02 \pm 0,40$ ,  $1,38 \pm 0,18$ , zaś w grupie LNR:  $2,53 \pm 0,22$ ,  $2,11 \pm 0,23$  i  $1,99 \pm 0,19$  (odpowiednio przed tempolem i po podaniu jego dawek: 0,02 i 0,2 mmol/kg). Porównanie sekwencji skojarzonych o zgodnym kierunku zmian RRi i SBP ( $(\downarrow HR = f(\uparrow SBP) \text{ vs } \uparrow HR = f(\downarrow SBP))$ ; ryc. 58 i 59)) wykazało istotnie mniejszą częstość występowania sekwencji zgodnych skojarzonych ze wzrostem, niż ze spadkiem SBP, przy mniejszej wydajności. W poszczególnych grupach stosunek częstości sekwencji zgodnych związanych ze wzrostem SBP do sekwencji związanych ze spadkiem SBP wynosił: w grupie WKY:  $0,79 \pm 0,05$ ,  $0,69 \pm 0,06$ ,  $0,52 \pm 0,08$ ; w grupie SHR:  $0,33 \pm 0,08$ ,  $0,39 \pm 0,07$ ,  $0,42 \pm 0,10$ , a w grupie LNR:  $0,31 \pm 0,08$ ,  $0,53 \pm 0,14$  i  $0,61 \pm 0,12$  (odpowiednio przed tempolem i po podaniu jego dawek: 0,02 i 0,2 mmol/kg), zaś iloraz wydajności skojarzenia sekwencji wynosił: w grupie WKY:  $0,97 \pm 0,05$ ,  $0,81 \pm 0,08$ ,  $0,61 \pm 0,12$ ; w grupie SHR:  $0,43 \pm 0,11$ ,  $0,51 \pm 0,09$ ,  $0,59 \pm 0,09$ , zaś w grupie LNR:  $0,56 \pm 0,11$ ,  $0,96 \pm 0,17$  i  $1,09 \pm 0,17$  (przed tempolem i po podaniu jego dawek: 0,02 i 0,2 mmol/kg).

Porównawcze zestawienie średniego nachylenia linii regresji reprezentujących spontaniczną wrażliwość odruchu z baroreceptorów tętnicznych (BRS) przedstawiono w tab. 21.

Tab. 21. Spontaniczna wrażliwość odruchu z baroreceptorów tętnicznych (BRS) – nachylenie linii regresji zależności między powiązаныmi sekwencyjnymi zmianami HR i SBP.

Tab. 21. Spontaneous baroreflex sensitivity (BRS) – slope of the regression plot representing the relationship between coupled sequential changes of HR vs. SBP.

Sekwencje Sequences		$\uparrow SBP : \uparrow RRI$		
Tempol		—	0,02 mmol/kg	0,2 mmol/kg
Grupa Group	WKY	$0,752 \pm 0,036$	$0,793 \pm 0,039$	$0,781 \pm 0,038$
	SHR	$0,635 \pm 0,061 \uparrow$	$0,699 \pm 0,067$	$0,738 \pm 0,040 \cdot$
	LNR	$0,450 \pm 0,019 \uparrow \uparrow \uparrow$	$0,585 \pm 0,048 \uparrow \uparrow \cdot \cdot$	$0,482 \pm 0,069 \uparrow \uparrow \uparrow$
Sekwencje Sequences		$\downarrow SBP : \downarrow RRI$		
Grupa Group	WKY	$0,478 \pm 0,042$	$0,455 \pm 0,040$	$0,491 \pm 0,031$
	SHR	$0,421 \pm 0,036$	$0,409 \pm 0,052$	$0,376 \pm 0,053 \uparrow$
	LNR	$0,353 \pm 0,031 \uparrow$	$0,359 \pm 0,058$	$0,412 \pm 0,023 \cdot$

SBP – ciśnienie tętnicze skurczowe, RRi – odstęp RR;  $P < 0,05$ : ANOVA,  $\uparrow$  SHR lub LNR w stosunku do WKY dla danej dawki tempola - test Fishera;  $\cdot$  tempol względem kontroli danej grupy - test Fishera.

SBP – systolic blood pressure, RRi – RR interval;  $P < 0,05$ : ANOVA,  $\uparrow$  SHR or LNR vs. WKY for given tempol dose - F test;  $\cdot$  tempol vs. no tempol within a given group, F-test.

U wszystkich testowanych szczurów przed i po podaniu tempola nachylenie linii regresji odnoszących się do sekwencji wzrostu SBP było istotnie większe od wyznaczonego dla sekwencji jego spadku. BRS wyznaczona z sekwencji spadku HR skojarzonej z

poprzedzającymi wzrostami SBP była istotnie mniejsza w grupie LNR i WKY, w porównaniu do szczurów referencyjnych WKY. Analogicznie, w obu grupach nadciśnieniowych BRS wyznaczona z sekwencji wzrostu HR skojarzonej ze spadkami SBP była mniejsza niż w grupie WKY, jakkolwiek tylko różnica pomiędzy grupami LNR i WKY była znamienna.

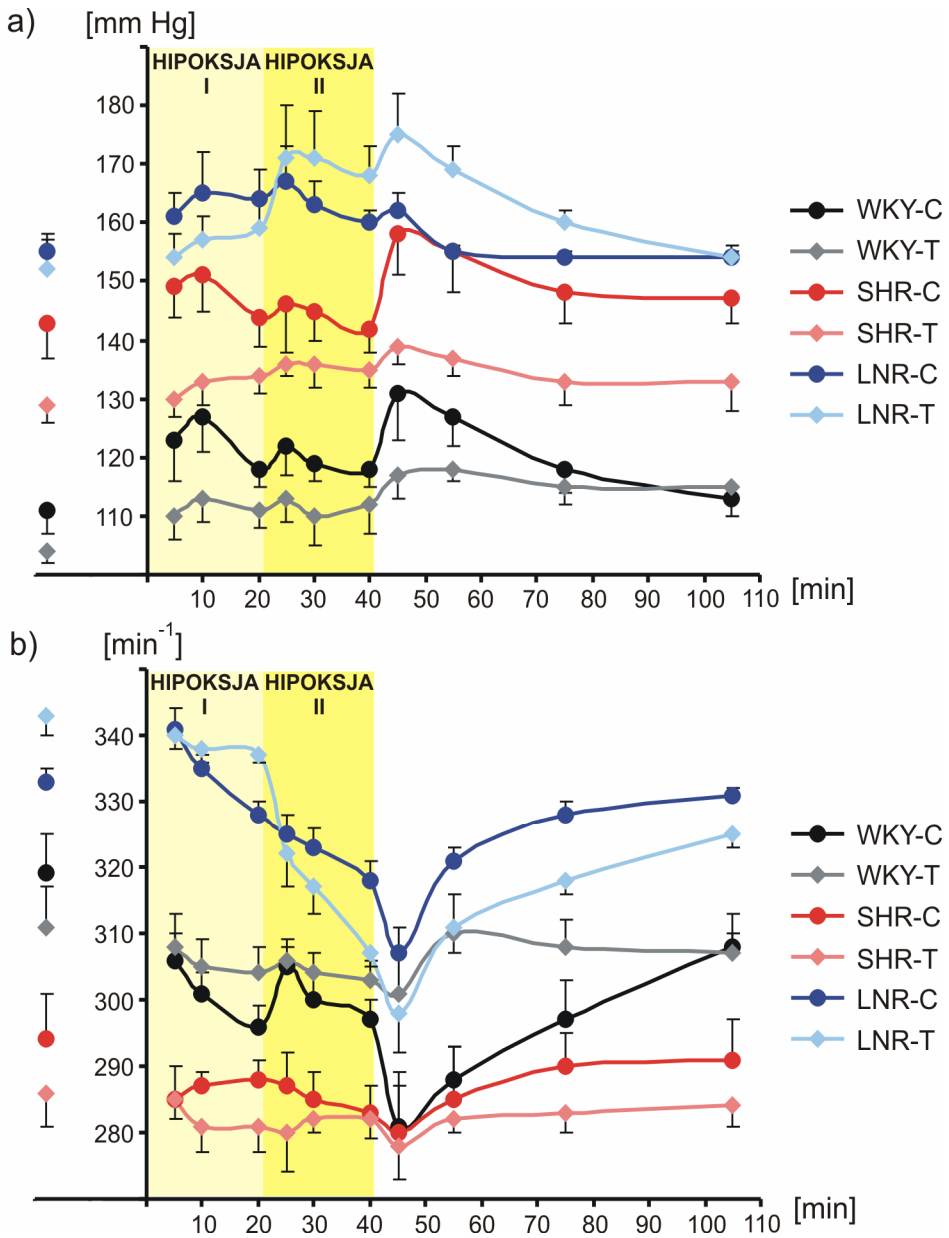
Tempol nie wpłynął w sposób znaczący na BRS u szczurów WKY. BRS, wyznaczona z sekwencji wzrostu SBP, uległa istotnemu zwiększeniu w grupie SHR po podaniu dawki tempola 0,2 mmol/kg, osiągając poziom zbliżony do wyznaczonego w grupie WKY przed podaniem tempola. Równocześnie BRS sekwencji spadku SBP uległa wyraźnemu, choć statystycznie nieistotnemu zmniejszeniu. W grupie LNR stwierdzono zwiększenie BRS po podaniu dawki tempola 0,02 mmol/kg w sekwencjach wzrostu SBP i po dawce tempola – 0,2 mmol/kg przy sekwencjach spadku SBP.

#### **4.7. Wpływ tempola na zmienność rytmu serca i odpowiedzi układu krążenia na hipoksję hipobaryczną**

W warunkach spoczynkowych pod koniec wybranego 9-dniowego cyklu doświadczalnego, przeprowadzonego w ramach Procedury 3.2.2.6, MAP i HR istotnie różniły się między grupami szczurów wyodrębnionymi w ramach każdego cyklu. W grupach WKY i SHR po 7-dniowym podawaniu tempola MAP było istotnie zmniejszone, przy niezamiennym zwolnieniu HR, zaś w grupie LNR po 7-dniowym podawaniu tempola MAP pozostało niemal niezmienione przy nieznacznym, lecz statystycznie znamiennym przyspieszeniu HR. W poszczególnych grupach MAP wynosiło [mm Hg]: WKY-C (kontrola bez tempola):  $111,15 \pm 4,21$  WKY-T (szczury WKY po 7-dniowym podawaniu tempola):  $103,85 \pm 2,33$ , SHR-C:  $143,25 \pm 5,85$ , SHR-T:  $129,00 \pm 3,33$ , LNR-C:  $154,85 \pm 2,86$  i LNR  $152,20 \pm 5,03$ , natomiast HR wynosiła [ $\text{min}^{-1}$ ]: WKY-C:  $319,05 \pm 6,25$ , WKY-T:  $310,67 \pm 6,10$ , SHR-C:  $294,25 \pm 6,99$ , SHR-T:  $286,13 \pm 5,00$ , LNR-C:  $332,87 \pm 1,88$  i LNR  $343,03 \pm 3,22$  (ryc. 60).

W warunkach hipoksji MAP istotnie wzrosło we wszystkich grupach, w największym stopniu w grupie WKY, przy czym w grupie SHR-C wzrost MAP był obserwowany jedynie w pierwszych 10 minutach hipobarii. HR uległa istotnemu zmniejszeniu, przy czym w grupie LNR-C na początku hipobarii wystąpiło nieznaczące przyspieszenie HR. Bezpośrednio po zakończeniu hipobarii MAP istotnie wzrosło we wszystkich grupach, czemu towarzyszyło wyraźne zwolnienie HR (ryc. 60).

U szczurów otrzymujących tempol (LNR-T) HR była istotnie niższa 65 min po zakończeniu hipobarii, niż przed jej rozpoczęciem, co wyróżniało tę grupę spośród pozostałych.



Zacieniowane pola wyznaczają dwa okresy 20 min hipobarii o ciśnieniu -100 mm Hg (Hipoksja I) i -200 mm Hg (Hipoksja II) poniżej chwilowego ciśnienia atmosferycznego.

Shaded areas represent 20-min periods of subsequent hypobaria at a pressure -100 mm Hg (Hipoksja I) and -200 mm Hg (Hipoksja II) below a temporary atmospheric pressure.

Ryc. 60. Zmiany MAP i HR wywołane kontrolowaną hipobarią.  
Fig. 60. Changes in MAP and HR evoked by controlled hypobaria.

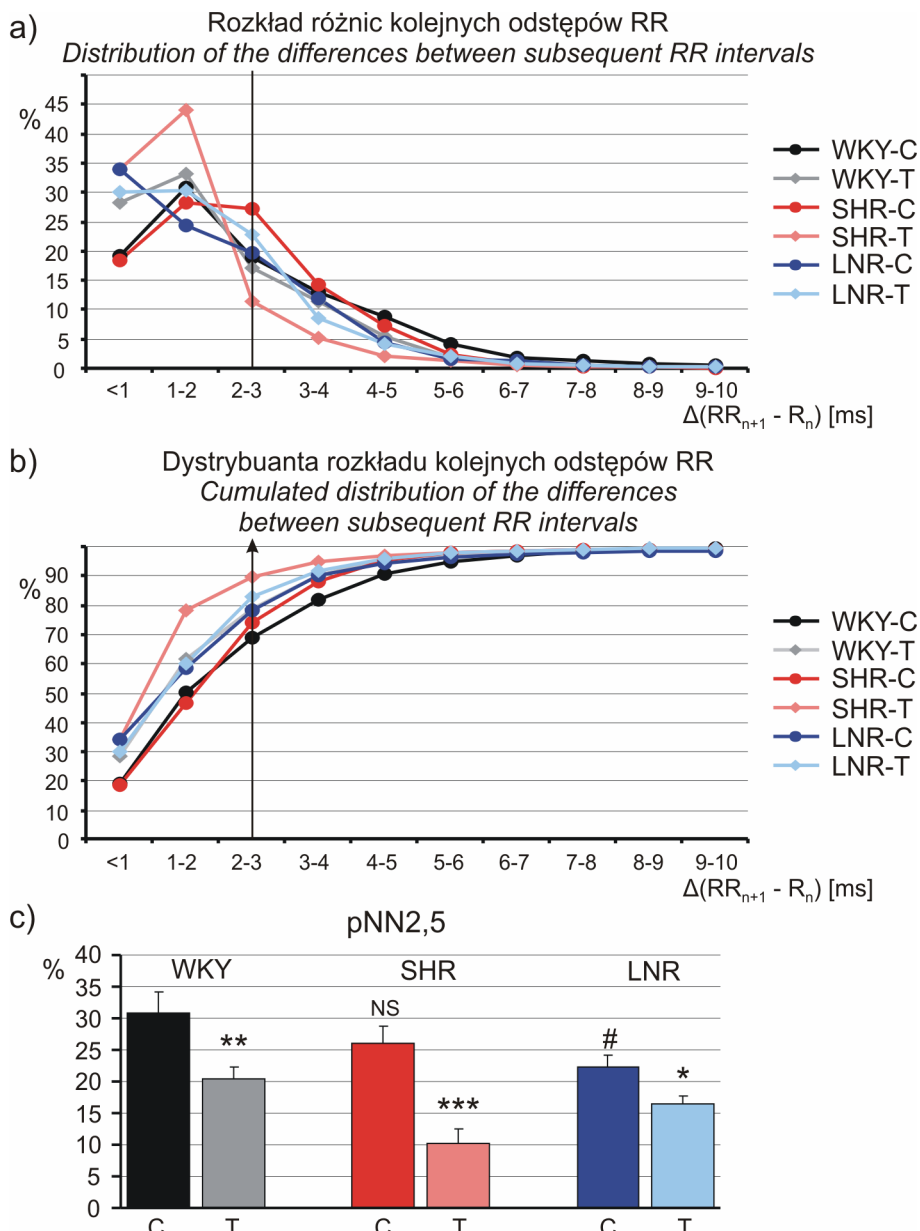
W tab. 22 zestawiono maksymalne odpowiedzi ciśnieniowe i sercowe podczas i po hipoksji oraz ich wzajemny stosunek. Wzrost MAP podczas hipobarii i po jej zakończeniu był największy w grupie LNR otrzymującej tempol. Odpowiedzi sercowe na

Tab. 22. Maksymalne zmiany MAP i HR podczas i po hipobarii.  
Tab. 22. Maximal changes in MAP and HR during and following hypobaria.

Grupa Group	Hipobaria / Hypobaria			Po hipobarii / After hypobaria		
	$\Delta\text{max}$		$\frac{\text{max } \Delta\text{HR}}{\text{max } \Delta\text{MAP}}$	$\Delta\text{max}$		$\frac{\text{max } \Delta\text{HR}}{\text{max } \Delta\text{MAP}}$
	MAP [mm Hg]	HR [min <sup>-1</sup> ]		MAP [mm Hg]	HR [min <sup>-1</sup> ]	
WKY-C	10,85 ± 2,60	-22,00 ± 8,15	<b>-2,03 ± 0,30</b>	20,03 ± 2,99	-38,25 ± 9,20	<b>-1,91 ± 0,38</b>
WKY-T	8,77 ± 2,58	-7,63 ± 2,65*	<b>-0,87 ± 0,23*</b>	13,50 ± 3,65*	-10,02 ± 4,11*	<b>-0,74 ± 0,28*</b>
SHR-C	7,72 ± 1,83	-11,15 ± 2,30†	<b>-1,44 ± 0,14</b>	15,02 ± 2,52	-14,05 ± 3,05†	<b>-0,94 ± 0,27</b>
SHR-T	6,85 ± 2,23	-15,80 ± 1,50	<b>-2,31 ± 0,10*</b>	9,80 ± 3,40*	-8,30 ± 2,08	<b>-0,85 ± 0,18</b>
LNR-C	12,02 ± 3,49	-14,35 ± 2,65†	<b>-1,19 ± 0,27†</b>	7,31 ± 4,01†	-26,85 ± 6,35	<b>-3,67 ± 0,51†</b>
LNR-T	19,85 ± 4,02	-36,85 ± 5,51*	<b>-1,86 ± 0,35</b>	23,35 ± 6,35*	-45,20 ± 11,25*	<b>-1,94 ± 0,56*</b>

$P < 0,05$ , ANOVA z testami post hoc,: \* tempola względem własnej kontroli - test Fishera, † SHR lub LNR w stosunku do WKY - test Dunnetta.  $P < 0,05$ : ANOVA with post-hoc tests: \* tempol vs. own control - F-test, † SHR or LNR vs. WKY - Dunnett test.

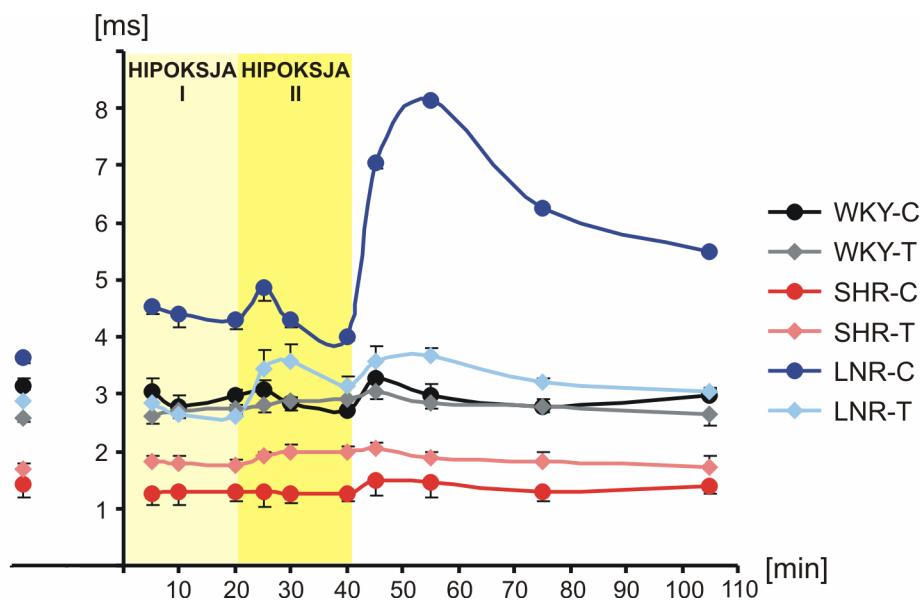
Do charakterystyki różnic między kolejnymi odstępami RR (RRi) odnosi się ryc. 61. Różnice długości RRi w ponad 99% analizowanych RRi były mniejsze niż 9 ms (ryc. 61b). Po sporządzeniu wykresu ilustrującego rozkład różnic między następującymi po sobie kolejnymi RRi (ryc 61a), przy podziale tych różnic na przedziały 1-milisekundowe okazało się, że mediana występuje w przedziale różnic od 1 do 2 ms, zaś różnice między kolejnymi RRi mniejsze od 3ms stanowią od 69 do niemal 90% wszystkich RRi (ryc. 61b). Przy odcięciu dystrybuanty rozkładu RRi w obrębie przedziałów od 1 do 2 ms i od 2 do 3 ms występowały największe różnice między grupami w odsetku odciętych RRi. Uwzględniając to spostrzeżenie uwzględniłem w dalszej analizie zmienną pNN2,5, określającą odsetek różnic między kolejnymi RRi przekraczających 2,5ms. U szczurów nadciśnieniowych, w szczególności LNR, pNN2,5 było mniejsze niż w grupie referencyjnej - WKY (ryc. 61c). Tempol istotnie obniżał pNN2,5, w największym stopniu w grupie SHR, gdzie redukcja pNN2,5 była ponad 2,5-krotna.



Prostopadła strzałka na rycinach a i b wyznacza punkt odcięcia na poziomie 2,5 ms różnic między kolejnymi RRi. test Kruskal-Wallis z testami post hoc, \*, \*\*, \*\*\* -  $P < 0,05, 0,01, 0,001$  - tempol w stosunku do własnej kontroli – test U-Manna-Whitneya; # LNR w stosunku do SHR - test U-Manna-Whitneya / Perpendicular arrow in Fig. a and b indicate the cut-off at 2,5 ms of the subsequent RRi. Kruskal-Wallis test followed by post-hoc tests: \*, \*\*, \*\*\* -  $P < 0.05, 0.01, 0.001$  – tempol vs. own control, U-Mann-Whitney test, # LNR vs. SHR, Mann-Whitney test.

Ryc. 61. Różnice między kolejnymi odstępami RR w warunkach standardowych.  
Fig. 61. Differences between successive RR intervals (RRi) in standard conditions.

Przed hipobarią rMSSD było istotnie niższe u szczurów SHR w porównaniu do WKY i LNR (ryc. 62), przy czym w grupach WKY i LNR rMSSD było obniżone w okresie podawania tempola. Podczas hipobarii rMSSD uległo istotnemu zmniejszeniu w grupach WKY (-13,75 ± 4,56%) i SHR (-11,71 ± 4,05%), podczas gdy u szczurów LNR i we wszystkich grupach w okresie podawania tempola zaobserwowano nieznamienny trend o kierunku odwrotnym (LNR-C: +32,89 ± 16,35%; WKY-T: +11,97 ± 5,35%; SHR-T: 17,12 ± 10,25% i LNR-T: +23,88 ± 11,35%). Bezpośrednio po zakończeniu hipobarii rMSSD uległo przejściowemu zwiększeniu we wszystkich grupach, przy czym wzrost ten był statystycznie nieistotny u szczurów WKY i SHR (WKY-C, WKY-T, SHR-C i SHR-T). Znamienne wzrost rMSSD wystąpił u szczurów LNR w okresie w którym nie otrzymywały tempola (LNR-C: +122,74 ± 28,35%). W okresie podawania tempola (LNR-T) przyrost rMSSD był znacznie mniejszy (+27,15 ± 9,07 P <0,05, P < 0,001 vs, LNR-C).



Zacieniowane pola wyznaczają dwa okresy 20 min hipobarii o ciśnieniu -100 mm Hg (Hipoksja I) i -200 mm Hg (Hipoksja II) poniżej chwilowego ciśnienia atmosferycznego.

Shaded areas represent 20-min periods of subsequent hypobaria at a pressure -100 mm Hg (Hipoksja I) and -200 mm Hg (Hipoksja II) below a temporary atmospheric pressure.

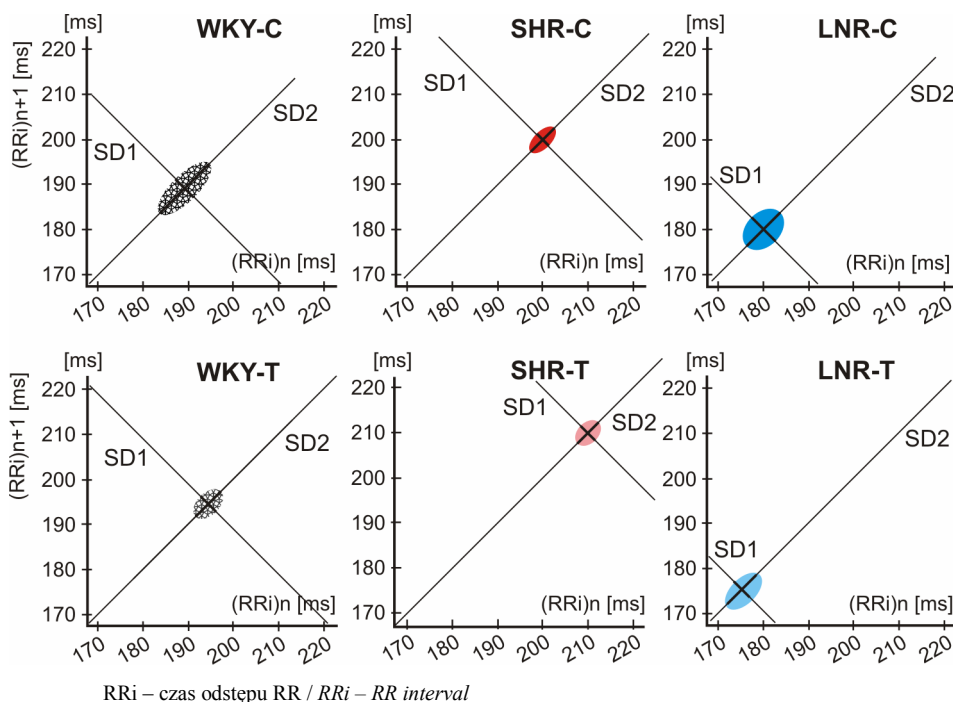
Ryc. 62. rMSSD (pierwiastek kwadratowy ze średniej kwadratów różnic między kolejnymi odstępami RR) podczas i po kontrolowanej hipobarii

Fig. 62. rMSSD (root mean square of successive differences) during and following hypobaria.

W sześciu panelach ryc. 63, stanowiących graficzną ilustrację krótko- i długookresowej HRV w układzie Poincare' zestawiono wartości SD1 i SD2 wyznaczone w warunkach spoczynkowych przed hipobarią. Pola wykreślonych elips, stanowiące graficzną interpretację całkowitej HRV w domenie czasowej są w grupach WKY i LNR istotnie mniejsze, gdy w były wyznaczone w okresach w których szczurom podawano tempola



(WKY-T vs WKY-C, LNR-T vs LNR-C). Pola elips zakreślone w grupie SHR są istotnie mniejsze od korespondujących pól grup WKY i LNR, co świadczy o mniejszej HRV. We wszystkich grupach zmniejszył się udział krótkoterminowej HRV w całkowitej HRV pod wpływem tempola, o czym świadczy zwiększenie ilorazu SD1/SD2 (WKY-C:  $0,36 \pm 0,05$  vs WKY-T  $0,51 \pm 0,07$ ; SHR-C:  $0,49 \pm 0,09$  vs SHR-T  $0,70 \pm 0,08$ ; LNR-C:  $0,54 \pm 0,08$  vs WKY-T  $0,61 \pm 0,10$ ), przy czym u szczurów LNR zmiana ilorazu SD1/SD2 była statystycznie nieistotna.



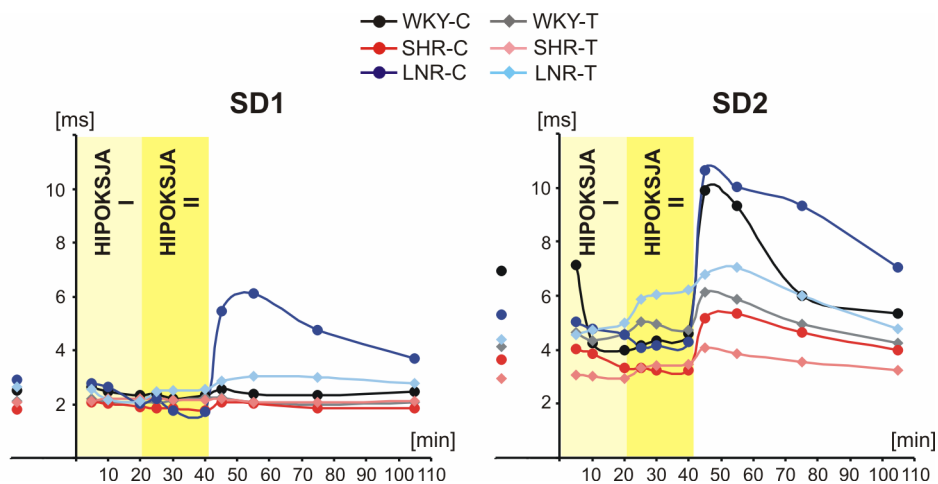
Ryc. 63. Wykresy Poincaré' jako wykładniki HRV w domenie czasowej, wyznaczone w warunkach standardowych.

Fig. 63. Poincaré' plots as determinants of the time-domain HRV assessed in unrestrained rats.

W pierwszych 5 minutach od rozpoczęcia hipobarji SD1 i SD2 nieznacznie wzrosło u większości szczurów, po czym wartości SD1 u szczurów WKY i SHR SD1 utrzymywało się na poziomie zbliżonym do wyjściowego przez dalszy okres hipobarji. W grupie LNR SD1 stopniowo obniżało się podczas hipobarji, czego nie stwierdzono w okresie podawania tempola szczurom tej grupy (ryc. 64). U szczurów, które nie otrzymywały tempola SD2 stopniowo zmniejszało się podczas hipobarji: o  $-33,67 \pm 9,52\%$  w grupie WKY ( $P < 0,01$ ),  $-11,85 \pm 6,25$  (NS) u szczurów SHR i o  $-18,67 \pm 6,98$  ( $P < 0,05$ ) w grupie LNR. W okresie podawania tempola pierwotny trend spadkowy uległ odwróceniu, w największym stopniu w grupie LNR (WKY-T:  $+15,57 \pm 8,65$ , SHR-T:  $+17,29 \pm 7,95$ ,  $+42,01 \pm 14,28$ ,  $P < 0,05$ ; ryc. 64).

Po zakończeniu hipobarji w obu grupach nadciśnieniowych SD1 przejściowo wzrosło: w WKY-C o  $+15,13 \pm 6,55$  w stosunku do wartości sprzed hipobarji,  $P < 0,05$ , zaś w

LNR-C o  $+89,24 \pm 22,03$  ( $P < 0,01$ ), przy czym tempol całkowicie tym wzrostom zapobiegał. SD2 znacząco wzrosło we wszystkich grupach po zakończeniu hipobarii i utrzymywało się na poziomie podwyższonym przez 65-min. okres obserwacji, przy czym u szczurów LNR tempol istotnie ten wzrost ograniczał (ryc. 64). W poszczególnych grupach SD2 wzrosło po zakończeniu hipobarii o: WKY-C:  $+42,71 \pm 11,30\%$ ; WKY-T:  $+49,14 \pm 16,67$ , vs WKY-; SHR-C:  $+41,64 \pm 15,25$ , NS vs WKY-C; SHR-T:  $+38,30 \pm 8,77$ , NS vs SHR-C; LNR-C:  $+100,95 \pm 15,33\%$ ,  $P < 0,01$  vs WKY-C i SHR-C; LNR-T  $+54,56 \pm 12,85$ ,  $P < 0,05$  vs. LNR-C).



Zacieniowane pola wyznaczają dwa okresy 20 min hipobarii o ciśnieniu  $-100$  mm Hg (Hipoksja I) i  $-200$  mm Hg (Hipoksja II) poniżej chwilowego ciśnienia atmosferycznego.

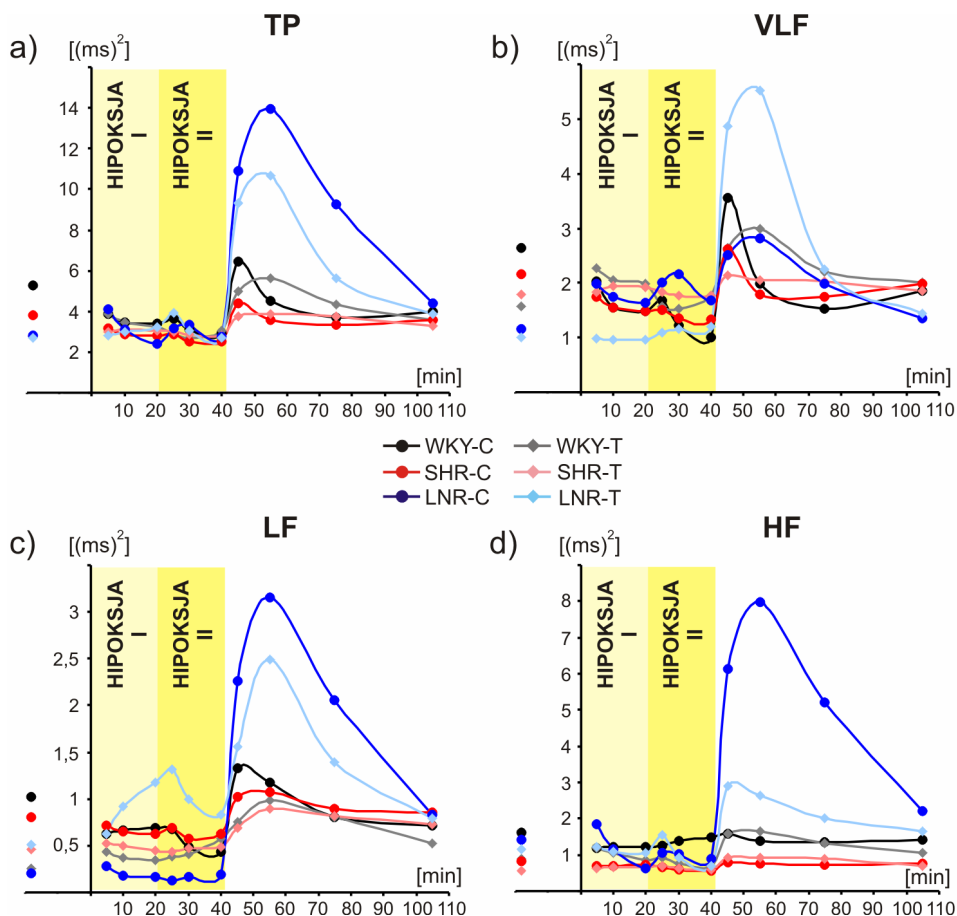
Shaded areas represent 20-min periods of subsequent hypobaria at a pressure  $-100$  mm Hg (Hipoksja I) and  $-200$  mm Hg (Hipoksja II) below a temporary atmospheric pressure.

Ryc. 64. Wpływ hipobarii na wykładniki Poincare' SD1 i SD2.

Fig. 64. Effect of hypobaria on the Poincare' indexes: SD1 and SD2

Wyniki analizy ilościowej HRV w domenie częstotliwościowej zostały zilustrowane na ryc. 65 i 66. W początkowych warunkach standardowych całkowita moc widma (TP) i moc widma w zakresie bardzo niskich częstotliwości (VLF) była istotnie większa w grupie WKY-C, niż w SHR-C i LNR-C (ryc. 65). Moc widma HRV w zakresie niskich częstotliwości (LF) była niemal pięciokrotnie mniejsza w grupie LNR-C, a SHR-C tylko nieznacznie mniejsza ( $-19,75 \pm 9,66\%$ ) w porównaniu do WKY-C. W zakresie wysokich częstotliwości moc widma (HF) była o ponad połowę mniejsza szczurów SHR-C, a w grupie LNR-C o 15% mniejsza w stosunku do WKY-C.

Podczas hipobarii TP stopniowo zmniejszyło się w grupie WKY-C ( $-44,53 \pm 12,35\%$ ) i SHR-C ( $-33,51 \pm 11,29\%$ ). W okresie podawania tempola w grupach WKY-T i SHR-T nie stwierdzona redukcji TP. W grupie WKY-T wystąpił istotny, choć krótkotrwały wzrost TP ( $+42,49 \pm 12,78\%$ ). W pierwszym okresie hipobarii w grupie LNR TP przejściowo wzrosło, niezależnie od podawania tempola (LNR-C:  $+47,31 \pm 15,05\%$ ; LNR-T:  $47,94 \pm 14,30\%$ ), po czym pod koniec hipobarii powróciło do poziomu wyjściowego.



a) TP – całkowita moc widma w zakresie częstotliwości od 0,04 do 2,2 Hz, b) VLF – moc widma w zakresie bardzo niskich częstotliwości od 0,04 do 0,27 Hz, c) LF – moc widma w zakresie niskich częstotliwości, 0,27 – 0,74 Hz d) HF – moc widma w zakresie częstotliwości wysokich, od 0,74 do 2,2 Hz. Dane uzyskano z obliczeń metodą autoregresyjną. Zaciemnione pola wyznaczają dwa okresy 20 min hipobarii o ciśnieniu  $-100$  mm Hg (Hipoksja I) i  $-200$  mm Hg (Hipoksja II) poniżej chwilowego ciśnienia atmosferycznego.

a) TP – Total power at a frequency range 0,04 to 2,2 Hz, b) VLF – very low frequency power, 0,04 - 0,27 Hz, c) LF – low frequency power, 0,27 – 0,74 Hz d) HF – high frequency power, 0,74 - 2,2 Hz. Data were obtained with use of the autoregressive algorithms. Shaded areas represent 20-min periods of subsequent hypobaria at a pressure  $-100$  mm Hg (Hipoksja I) and  $-200$  mm Hg (Hipoksja II) below a temporary atmospheric pressure.

Ryc. 65. Wskaźniki HRV w domenie częstotliwościowej  
Fig. 65 HRV indexes in a frequency domain.

VLF znacząco obniżyło się podczas hipobarii w grupach WKY-C ( $-61,89 \pm 11,56\%$ ) i SHR-C ( $-38,14 \pm 10,97\%$ ), natomiast w grupie LNR wystąpił efekt odwrotny ( $+74,78 \pm 20,23\%$ ; ryc. 65). Tempol znacząco te zmiany ograniczał (WKY-T:  $+12,02 \pm 13,88\%$ ,  $P < 0,01$  vs WKY-C; SHR-T:  $-1,68 \pm 9,94\%$ ,  $P < 0,05$  vs SHR-C; LNR-T:  $+19,80 \pm 7,23\%$ ,  $P < 0,05$ ). We wszystkich grupach LF znacząco obniżyło się podczas hipobarii (WKY-C:  $-56,87 \pm 17,10\%$ ; SHR-C:  $-28,40 \pm 12,25\%$ ; LNR-C:  $-38,10 \pm 8,52\%$ ) przy czym w grupie LNR-C w pierwszych minutach hipobarii wystąpił wzrost

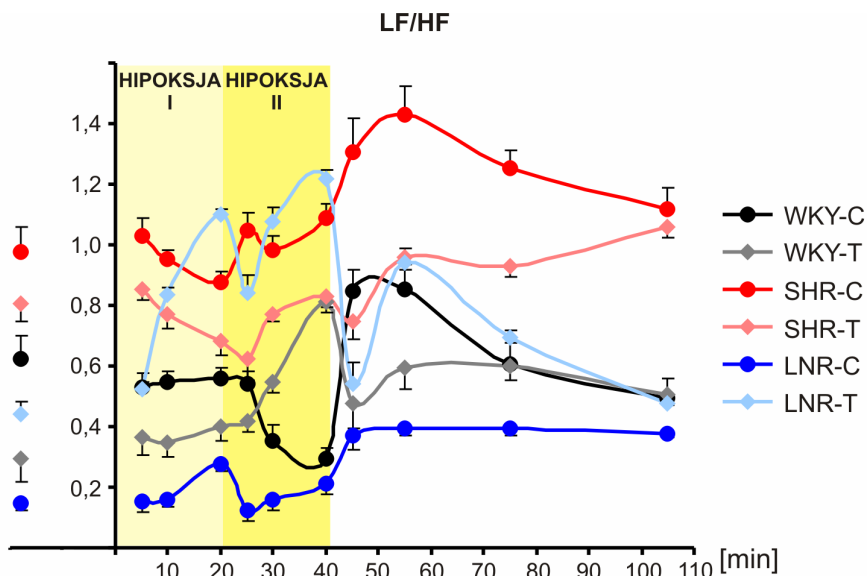
LF ( $+33,33 \pm 15,05\%$ ). W grupie SHR tempol znosił wpływ hipobarii na LF (SHR-T:  $+2,17 \pm 8,85\%$ , zaś w WKY i LNR odwracał kierunek zmiany (WKY-T:  $+119,23 \pm 22,50\%$ ,  $P < 0,001$  vs WKY-C; LNR-T:  $+156,87 \pm 34,77\%$ ,  $P < 0,01$ ).

Moc widma HRV w zakresie wysokich częstotliwości (HF) uległa redukcji podczas hipobarii, przy czym maksymalna zmiana była nieznamiennie największa w grupie LNR-C ( $-57,34 \pm 11,89\%$  vs WKY-C:  $-26,99 \pm 17,33\%$ , NS i SHR-C:  $-31,33 \pm 14,06\%$ , NS; ryc. 65). W grupie LNR w początkowej fazie hipobarii HF wzrosło (LNR-C:  $+29,37 \pm 15,00\%$ ; LNR-T:  $+35,65 \pm 12,21\%$ ). Tempol nie wpłynął w istotnym stopniu na HF podczas drugiego etapu hipobarii w grupie WKY i LNR, natomiast całkowicie zapobiegł redukcji HF w grupie SHR (SHR-T:  $+3,51 \pm 5,85\%$ ).

Bezpośrednio po zakończeniu 40-min hipobarii u wszystkich szczurów nastąpił istotny wzrost TP i jego składowych, trwający od około 20 do ponad 60 min, przy czym skala ilościowa tej zmiany przekraczała maksymalne zmiany mocy widma obserwowane podczas hipobarii (ryc. 65). U szczurów którym nie podawano tempola, TP wzrosło o  $+21,70 \pm 4,43\%$  w grupie WKY-C,  $+16,36 \pm 5,02\%$  w SHR-C i  $+299,63 \pm 61,35\%$  w LNR-C. Tempol zwiększył przyrost TP w grupie WKY (WKY-T:  $+105,25 \pm 16,77\%$ ), nie wpływając istotnie na zmiany TP u szczurów SHR ( $+37,23 \pm 15,31\%$ , NS vs SHR-C) i LNR (LNR-T:  $+199,63 \pm 58,85\%$ , NS vs LNR-C). W zakresie VLF szczególnie znaczący przyrost po zakończeniu hipoksji wystąpił w grupie LNR, gdzie w okresie w którym nie podawano tempola (LNR-C), osiągnął on poziom  $+144,35 \pm 25,89\%$ , zaś podczas jego podawania (LNR-T):  $+447,52 \pm 103,36\%$ . U szczurów WKY-C i SHR-C LF uległo nieznacznemu zwiększeniu po zakończeniu hipobarii (odpowiednio o:  $+30,39 \pm 12,04\%$  i  $+32,10 \pm 6,58\%$ ), przy praktycznie niezmiennym HF (odpowiednio:  $-3,68 \pm 4,04\%$  i  $-6,02 \pm 9,59\%$ ), przy czym pod wpływem tempola moc widma obu komponent HRV uległa zwiększeniu, co uwidoczniło się w większym stopniu w grupie WKY (LF: WKY-T:  $+276,92 \pm 61,63\%$ , SHR-T:  $+93,48 \pm 20,01\%$ ; HF: WKY-T:  $+185,39 \pm 52,25\%$ , SHR-T:  $+63,16 \pm 17,42\%$ ). Dramatyczny wzrost LF i nieco mniejszy HF wystąpił po zakończeniu hipobarii w grupie LNR. W grupie LNR-C LF wzrosło o  $+1400,00 \pm 273\%$ , zaś HF o  $+458,23 \pm 98,37\%$ . Tempol znacząco te przyrosty przytłumił: ( $+388,24 \pm 77,90\%$  - LF;  $+151,30 \pm 70,63\%$  - HF).

Przed hipobarią stosunek LF/HF był istotnie niższy w grupie LNR w porównaniu do WKY i SHR (LNR-C:  $0,147 \pm 0,028$  vs WKY-C:  $0,626 \pm 0,103$  i vs SHR-C:  $0,976 \pm 0,092$ ; ryc. 66). Tempol istotnie obniżył LF/HF w grupie WKY-T ( $0,292 \pm 0,044$ ), nieznacznie w grupie SHR ( $0,807 \pm 0,093$ ) i niemal trzykrotnie zwiększył w grupie LNR (LNR-T:  $0,443 \pm 0,112$ ). Podczas hipobarii stosunek LF/HF był niestabilny, przy czym w grupie WKY przeważała jego redukcja (WKY-C:  $-52,81 \pm 17,03\%$ ), u szczurów SHR przeciętna zmiana była niewielka (SHR-C:  $+11,46 \pm 15,00\%$ ), a w grupie LNR istotnie wzrósł (LNR-C:  $+45,37 \pm 9,51\%$ ).

W okresie podawania tempola u szczurów WKY i LNR podczas hipoksji wskaźnik LF/HF uległ wybitnemu zwiększeniu (WKY-T:  $+178,74 \pm 26,33\%$ ; LNR-T:  $+175,23 \pm 30,87\%$ ), a u szczurów SHR zaobserwowano trend odwrotny (SHR-T:  $-22,78 \pm 18,05\%$ ). Po zakończeniu hipobarii iloraz LF/HF uległ istotnemu zwiększeniu, przy czym u szczurów, które otrzymywały tempol przyrost LF/HF był poprzedzony początkową kilkuminutową jego redukcją (ryc. 66).



Dane uzyskano z obliczeń metodą autoregresyjną. Zaciemnione pola wyznaczają dwa okresy 20 min hipobarii o ciśnieniu  $-100$  mm Hg (Hipoksja I) i  $-200$  mm Hg (Hipoksja II) poniżej chwilowego ciśnienia atmosferycznego. / Data were obtained with use of the autoregressive algorithms. Shaded areas represent 20-min periods of subsequent hypobaria at a pressure  $-100$  mm Hg (Hipoksja I) and  $-200$  mm Hg (Hipoksja II) below a temporary atmospheric pressure.

Ryc. 66. Wpływ hipobarii na wskaźnik LF/HF.

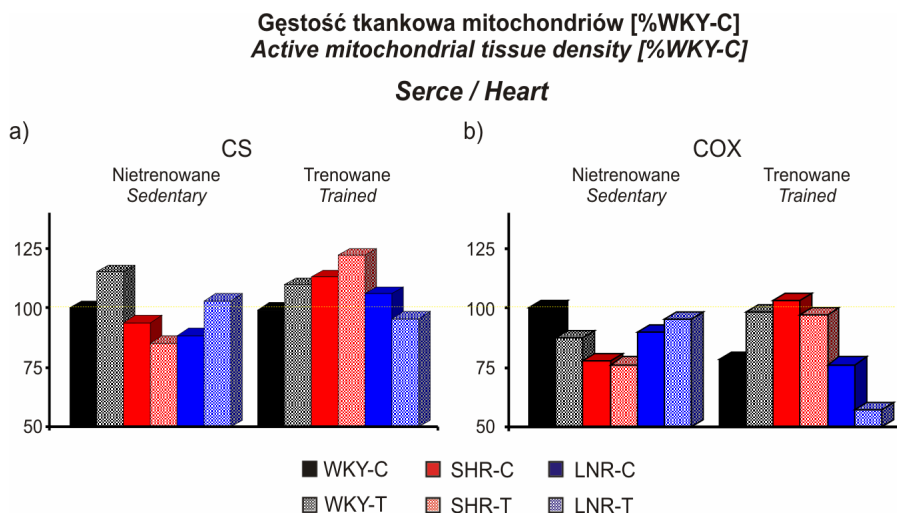
Fig. 66. Effect of hipobaria on the LF/HF index.

Podwyższone wartości LF/HF utrzymywały się w grupach WKY i LNR do 45 min po zakończeniu hipobarii, natomiast w grupie SHR pozostawały na poziomie znacznie przekraczającym wyjściowy przez cały ponad 65 min okres obserwacji. W grupach WKY-C i SHR-C maksymalne przyrosty LF/HF po zakończeniu hipobarii były zbliżone i wynosiły:  $+36,64 \pm 12,20$  i  $46,19 \pm 19,63\%$ , natomiast w grupie LNR-C były istotnie większe ( $+268,80 \pm 85,46\%$ ). Tempo zwiększył przyrost LF/HF w grupie WKY-T ( $+103,31 \pm 20,56\%$ ) i nieistotnie go przytłumił w grupach SHR-T ( $+18,58 \pm 11,66\%$ ) i LNR-T ( $+111,88 \pm 30,09\%$ ).

#### 4.8. Wpływ tempła czynność mitochondriów u szczurów z nadciśnieniem tętniczym poddanych treningowi biegowemu

Ryciny 66 i 67 obrazują gęstość tkankową mitochondriów (AMTD) oszacowaną na podstawie stosunku aktywności enzymatycznej zawiesiny mitochondriów i homogenatu tkankowego w przeliczeniu na gram tkanki<sup>425,426</sup>. AMTD przedstawiono w procentach szczurów nietreningowanych grupy WKY-C (Procedura 3.2.2.3) Ryciny 66 i 67 a) odnoszą się do oznaczeń aktywności enzymatycznej syntazy cytrynianowej (CS; AMTD<sub>CS</sub>), co jest standardem pomiarowym, zaś ryc. 66 i 67 b) - do oksydazy cytochromu c (COX; AMTD<sub>COX</sub>). W sercu AMTD<sub>CS</sub> była u szczurów nietreningowanych z nadciśnieniem tętniczym nieznacznie mniejsza niż u ich odpowiedników normotensyjnych ( $-6,25\%$ : SHRs-

C vs WKYs-C; -11,45% LNRs-C vs WKY-C (ryc. 67a). U szczurów poddanych trenin-  
gowi biegowemu przez 40 dni  $AMTD_{CS}$  było: w grupie WKYtr-C zbliżone do odpow-  
iedników nietrenowanych (99,20% wartości WKYs-C), natomiast w obu grupach nad-  
ciśnieniowych były istotnie większe (SHRtr-C: 122,25% vs SHR-C: 93,75%; LNRtr-T:  
106,10% vs LNRtr-C: 88,55%).



Średnie z trzech pomiarów, w których spulowano serca z 3 szczurów tej samej grupy. Różnice między wyni-  
kami jednostkowych oznaczeń o obrębie danej grupy nie przekraczały 12%.

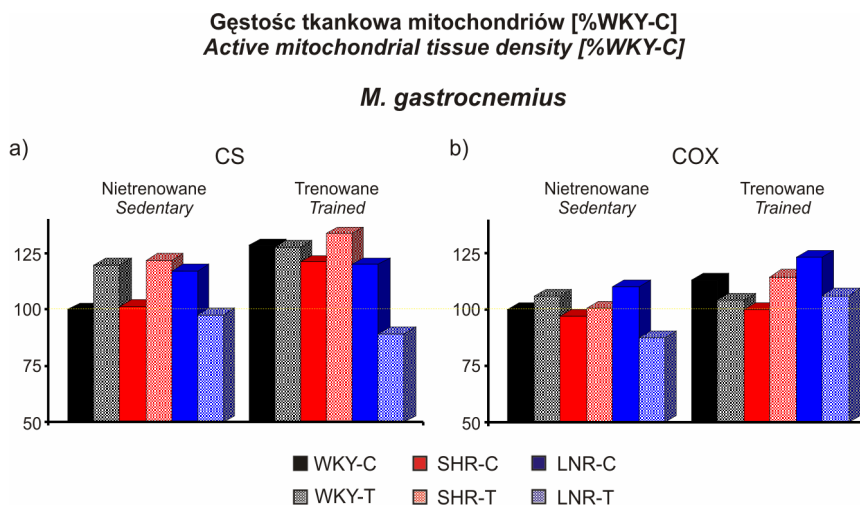
*Mean of three assays, in which three hearts from the same group were pooled. Differences between data  
assessed from assays within a given group did not exceed 12%.*

Ryc. 67. Gęstość tkankowa mitochondriów w sercu wyznaczona przez pomiar aktywności enzy-  
matycznej syntazy cytrynianowej (CS)<sup>425</sup> i oksydazy cytochromu C (COX)<sup>426</sup> wyrażona w pro-  
centach grupy kontrolnej – WKY-C nietrenowanej.

*Fig. 67. Active mitochondria tissue density in (AMTD) heart assessed by the enzymatic  
assay of citrate syntase (CS)<sup>425</sup> and cytochrome C oxidase (COX)<sup>426</sup> expressed as a percent of the  
control group - WKY-C sedentary.*

W sercach szczurów, którym przewlekłe podawano tempol  $AMTD_{CS}$  nieznacznie  
różniła się w stosunku do ich odpowiedników, które go nie otrzymywały. W czterech  
grupach była większa: nietrenowanych - WKYs-T (115,30% vs 100%), i LNRs-T  
(103,23% vs 88,55%) i trenowanych - WKYtr-T (109,77% vs 99,20%), i SHR-T  
(122,25% vs 113,10%), zaś w dwóch mniejsza (SHRs-T: 85,22% vs 93,75%; LNRtr-T:  
95,45% vs 106,10%).

Przy wyrażeniu  $AMTD$  w sercu w jednostkach procentowych WKYs-C, porównano  
w ramach tych samych grup  $AMTD_{CS}$  (ryc. 67a) z  $AMTD_{COX}$  (ryc. 67b). We większości  
grup, poza LNRs-C  $AMTD_{COX}$  była mniejsza od  $AMTD_{CS}$ , a różnice  $AMTD_{COX}$  -  
 $AMTD_{CS}$ , wyrażone w wartościach procentowych WKYs-C wynosiły w poszczególnych  
grupach: WKYs-T: -27,70, SHR-C: -16,00, SHR-T: -8,85; LNRs-C: +1,40; LNRs-T: -  
8,10; WKYtr-C: -20,70, WKYtr-T: -11,40; SHRtr-C: -9,90; SHRtr-T: -25,00; LNRtr-C:  
-29,80 i LNRtr-T: -38,20.



Średnie z trzech pomiarów, w których spulowano mięśnie z trzech szczurów tej samej grupy. Różnice między wynikami jednostkowych oznaczeń o obrębie danej grupy nie przekraczały 10%. *Mean of three assays, in which three hearts from the same group were pooled. Differences between data assessed from assays within a given group did not exceed 10%.*

Ryc. 68 Gęstość tkankowa mitochondriów w mięśniu brzuchatym łydki wyznaczona przez pomiar aktywności enzymatycznej syntazy cytrynianowej (CS)<sup>425</sup> i oksydazy cytochromu C (COX)<sup>426</sup>, wyrażona w procentach grupy kontrolnej – WKY-C nietrenowanej.

*Fig. 68. Active mitochondria tissue density in (AMTD) gastrocnemius muscle assessed by the enzymatic activity assay of citrate syntase (CS)<sup>425</sup> and cytochrome C oxidase (COX)<sup>426</sup>, expressed as a percent of the control group - WKY-C sedentary.*

W mięśniu brzuchatym łydki AMTD<sub>CS</sub> była u szczurów nietrenowanych WKY i SHR zbliżona (+1,30%, SHRs-C vs WKYs-C, w jednostkach procentowych WKYs-C), zaś w grupie LNR była wyraźnie większa (LNRs-C: 117,10%; ryc. 68a). U szczurów poddanych treningowi biegowemu, które nie otrzymywały tempola AMTD<sub>CS</sub> była większa niż u ich odpowiedników nietrenowanych i wynosiła w poszczególnych grupach: WKYtr-C: 128,35%, SHRtr-C: 121,25% i LNRtr-C: 119,90% (ryc. 68a). W mięśniach brzuchatych łydki szczurów, którym przewlekłe podawano tempol, AMTD<sub>CS</sub> była znacząco większa w grupach nietrenowanych WKY (WKYs-T: 119,75% vs 100%; SHRs-T: 121,82% vs SHRs-C: 101,30%) oraz w mniejszym stopniu w grupie trenowanej SHR (SHRs-T: 133,60% vs 121,25%), natomiast w grupach LNR: nietrenowanej i trenowanej była znacząco mniejsza (LNRs-T: 97,70% vs 117,10%; LNRtr-T: 89,25% vs 119,90%). U trenowanych szczurów WKY nie było istotnej różnicy pomiędzy grupą, której podawano tempol i jej kontrolą (WKYtr-T: 127,50% vs WKYs-C: 128,35%).

W porównaniu do AMTD<sub>CS</sub> (ryc. 68a), AMTD<sub>COX</sub> (ryc. 68b) była w mięśniu brzuchatym łydki mniejsza we wszystkich grupach za wyjątkiem szczurów trenowanych LNR. W mięśniach brzuchatych łydki szczurów WKY nietrenowanych i trenowanych większe różnice między AMTD<sub>COX</sub> i AMTD<sub>CS</sub> zaobserwowano w grupach, które otrzymywały tempol (WKYs-T: -13,75%; SHRs-C: -4,25% vs SHRs-T: -21,33%; LNRs-C: -6,90% vs -10,15%; WKYtr-C: -15,10% vs WKYtr-T: -23,30%), zaś pomiędzy grupami SHR trenowanymi różnica była marginalna (SHRtr-C: -20,85% vs -19,10%). U szczurów trenowanych LNR, którym przewlekłe podawano tempol, AMTD<sub>COX</sub> była mniejsza niż w grupie, która go nie otrzymywała (LNRtr-T: +3,15% vs LNRtr-C: +16,90%), ale

większa od  $AMTD_{CS}$  (89,25%). Zwraca uwagę, że różnica w AMTA pomiędzy grupami SHR i WKY jest większa przy oznaczeniu AMTD przez pomiar COX niż CS.

W tab. 23 zestawiono  $AMTD_{CS}$  w sercu i mięśniu brzuchatym łydki po przemnożeniu przez masę serc, lub mięśni, co określa aktywność mitochondriów w skali całego narządu.

Tab. 23. Aktywność enzymatyczna mitochondriów w skali narządu.

Tab. 23. *Enzymatic mitochondria activity with respect to a whole organ.*

Grupa :	WKYs-C	WKYs-T	SHRs-C	SHRs-T	LNRs-C	LNRs-T	WKYtr-C	WKYtr-T	SHRtr-C	SHRtr-T	LNRtr-C	LNRtr-T
<b>Serce</b>	100	118,1	127,9	105,5	95,1	108,3	115,5	115,1	165,0	155,3	118,3	104,9
<b>M. gastrocnemius</b>	100	129,6	83,4	106,0	114,1	76,1	162,3	159,0	128,9	143,3	124,1	61,0

Wartości średnie wyrażone w procentach grupy kontrolnej: szczurów WKY nietrenowanych, które nie otrzymywały tempola (WKYs-C). Wartości średnie obliczono z 3 pomiarów przy spulowaniu do każdego pomiaru 3 serc, lub 3 mięśni brzuchatych łydki pochodzących z tej samej grupy. Zacięto grupy szczurów, którym przewlekłe podawano tempol.

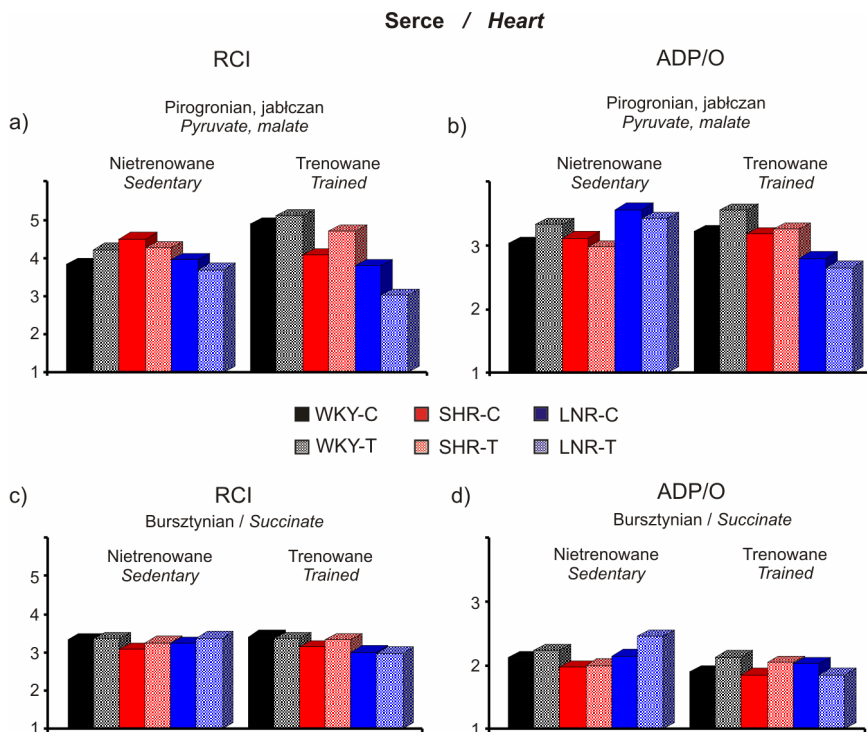
*Mean values expressed as a percent of the control group – WKY sedentary rats, which were not given tempol (WKYs-C). Mean values were calculated from three assays in which 3 hearts or gastrocnemius muscles originated from the same group were pooled. Shaded areas represent groups of rats chronically treated with tempol.*

W obecności pirogronianu i jabłczanu jako substratów współczynnik oddechowy (RCI) był w mitochondriach serca większy w grupie SHR nietrenowanej (4,50) w porównaniu do nietrenowanych WKY (3,82) i LNR (3,95; ryc. 69a). Z kolei iloraz ADP/O był nieznacznie większy w grupie LNR (3,56), w porównaniu do SHR (3,11) i WKY (3,03; ryc. 69b). W grupie trenowanej WKY RCI był wyższy niż w nietrenowanej, natomiast w grupach SHR i LNR RCI było nieznacznie niższe (ryc. 69a). W grupach LNR trenowanych ADP/O było wyraźnie mniejsze niż w ich odpowiednikach nietrenowanych (LNRtr-C: 2,80 vs LNRs-C: 3,56; LNRtr-T: 2,65 vs LNRs-T: 3,42; ryc. 69b). W sercach uzyskanych od szczurów, którym podawano tempol: w grupach nietrenowanych, a także trenowanych WKY, RCI było zbliżone do ich odpowiedników grupowych, które nie go nie otrzymywały. W grupie trenowanej SHR (SHRtr-T) RCI był większy (4,70) niż w grupie referencyjnej SHRtr-C (4,02), natomiast w grupie LNR był mniejszy (LNRtr-T: 3,01 vs LNRtr-C: 3,80). Poza nieznacznie wyższym ilorazem ADP/O w grupie trenowanej WKY, mitochondria uzyskane z serc szczurów, które otrzymywały tempol, wykazywały zbliżone wartości tego ilorazu do ich odpowiedników grupowych, którym tempola nie podawano.

Przy wykorzystaniu bursztynianu jako substratu kontrola oddechowa mitochondriów wyizolowanych z serc nie wykazywała znaczących różnic między grupami (ryc. 69c). Zakres RCI zawierał się w przedziale: od 2,97 (LNRtr-T) do 3,41 (WKTtr-C). W grupach nietrenowanych oraz w trenowanej SHR zaznaczyła się tendencja do większego RCI. tempol był o -0,18 niższy niż w mitochondriach LNRtr-C. We wszystkich grupach trenowanych, za wyjątkiem grupy SHRtr-T (różnica +0,05), która otrzymywała tempol



Iloraz ADP/O, który jest wyznacznikiem skojarzenia mitochondriów (ryc. 69c,d), był nieco wyższy we wszystkich grupach nietrenowanych, które otrzymywały tempol oraz w trenowanych WKY i SHR, natomiast w grupie trenowanej, która otrzymywała współczynnik ADP/O był niższy niż u odpowiedników nietrenowanych. Różnica wynosiła od -0,10 w grupie WKY-T od -0,60 w mitochondriach LNR-T.



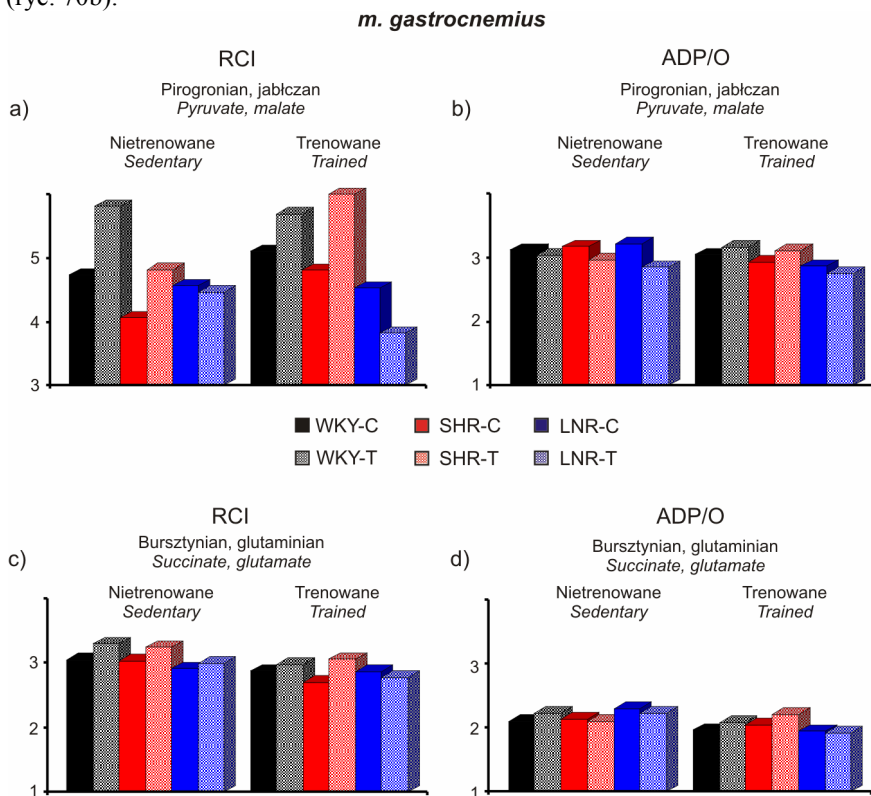
Średnie z trzech pomiarów, w których spulowano serca z trzech szczurów tej samej grupy.  
*Mean of three assays, in which 3 hearts from the same group were pooled.*

Ryc. 69. Kontrola oddechowa mitochondriów sercowych.

*Fig. 69. Respiratory control of the heart mitochondria.*

W obecności pirogronianu i jabłczanu jako substratów RCI był w mitochondriach mięśni brzuchatej łydki, wyizolowanych od szczurów trenowanych WKY i SHR, większe niż u ich odpowiedników nietrenowanych (WKYtr-C: 5,10 vs WKYs-C: 4,73; SHRtr-C: 4,81 vs SHRs-C: 4,06), podczas gdy w obu grupach LNR RCI był zbliżony (LNRtr-C: 4,46 vs LNRs-C: 4,57; ryc. 70a). U grupach nietrenowanych i trenowanych WKY i SHR, które otrzymywały tempol, RCI był wyraźnie wyższy niż w odpowiadających grupach referencyjnych (WKYs-T: 5,81 vs WKYs-C: 4,73; SHRs-T: 4,82 vs SHRs-C: 4,06; WKYtr-T: 5,61 vs WKYtr-C: 5,10; SHRtr-T: 6,55 vs SHRtr-C: 4,81). W mitochondriach szczurów trenowanych LNR pochodzących z grupy otrzymującej tempol, RCI było mniejsze (LNRtr-T: 3,82 vs LNRs-C: 4,53). U grupach trenowanych iloraz ADP/O był nieznacznie mniejszy niż u ich odpowiedników nietrenowanych (ryc. 70b). W mitochondriach uzyskanych od szczurów nietrenowanych, którym podawano tempol

ADP/O było niższe niż u ich grupowych nietrenowanych odpowiedników, przy czym różnica była większa w obu grupach nadciśnieniowych, w porównaniu do kontroli WKY (ryc. 70b).



Średnie z trzech pomiarów, w których spulowano mięśnie z trzech szczurów tej samej grupy.  
*Mean of three assays, in which muscles from three rats of the same group were pooled.*

Ryc. 70. Kontrola oddechowa mitochondriów mięśnia brzuchatego łydki.

*Fig. 70. Respiratory control of the mitochondria from the gastrocnemius muscle.*

W grupach trenowanych WKY i SHR, które otrzymywały tempol iloraz ADP/O był nieznacznie wyższy niż w mitochondriach wyizolowanych z ich odpowiedników, którym tempola nie podawano.

Przy wykorzystaniu bursztynianu i glutaminianu jako substratów nie stwierdzono znaczących różnic międzygrupowych w kontroli oddechowej mitochondriów wyizolowanych z mięśnia brzuchatego łydki, o czym świadczą niewielkie różnice między grupami w wartościach RCI i ADP/O (ryc. 70c,d). Zaznaczyła tendencja do niższych wartości RCI i ADP/O w mitochondriach uzyskanych od szczurów trenowanych. W mięśniach szczurów, które przewlekłe otrzymywały tempol: nietrenowanych, a także trenowanych WKY i SHR wartości RCI były nieznacznie wyższe niż u ich odpowiedników, którym go nie podawano. W mitochondriach wyizolowanych od szczurów WKY i SHR trenowanych stwierdzono ponadto nieco wyższy iloraz ADP/O.

## 5. DYSKUSJA

### 5.1 Odmienne charakterystyka czynnościowa szczurów z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym genetycznie (SHR) i indukowanym przez przytłumienie syntezy endogennego NO

Przedmiotem przedstawionych badań były dwa odrębne eksperymentalne modele nadciśnienia tętniczego: uwarunkowanego genetycznie u szczepu szczurów SHR, oryginalnie wyodrębnionego metodą selekcji wsobnej z normotensyjnego szczepu szczurów Wistar-Kyoto (WKY) i nadciśnienia tętniczego wywołanego interwencją eksperymentalną, polegającą na podawaniu szczurom szczepu WKY inhibitora syntazy tlenu azotu (NOS), L-nitroargininy (L-NNA; grupy doświadczalne LNR). L-NNA jest nieselektywnym inhibitorem syntazy NO o większym powinowactwie do izoforny śródbłonkowej (eNOS) i neuronalnej (nNOS), niż do izoforny indukowalnej (iNOS)<sup>429-431</sup>. Charakterystyka czynnościowa układu krążenia u szczurów szczepu SHR wykazuje wiele podobieństw z nadciśnieniem samoistnym występującym u człowieka ze znacznym udziałem komponenty neurogennej, przejawiającej się zwiększoną aktywnością układu współczulnego i dysregulacją odruchową: nadaktywnością odruchu z chemoreceptorów i zmniejszoną aktywnością odruchu z baroreceptorów tętnicznych<sup>432</sup>. Z kolei zahamowanie endogennego wytwarzania NO przez podawanie inhibitora NOS miało w założeniu odnosić się do dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, w przebiegu której wytwarzanie NO w łożysku tętniczym jest upośledzone.

We wszystkich wykonanych doświadczeniach u szczurów SHR i LNR stwierdzono ewidentnie podwyższone ciśnienie tętnicze - o wartościach odpowiadających nadciśnieniu tętniczemu. U szczurów LNR ciśnienie tętnicze było nieznacznie wyższe niż u szczepu SHR, zaś u odpowiedników referencyjnych – szczurów szczepu WKY ciśnienie tętnicze było w warunkach standardowych prawidłowe. Analiza uzyskanych wyników wskazuje na zasadnicze różnice czynnościowe nie tylko między szczurami z nadciśnieniem tętniczym i ich odpowiednikami normotensyjnymi – WKY, ale także pomiędzy grupami SHR i LNR. Wpływ L-NNA na HR nie był jednoznaczny. W grupie SHR podczas sześciotygodniowej obserwacji (Procedura 3.2.2.3), HR stopniowo zmniejszała się, przy stabilnym SBP. W grupie LNR obserwowano stały trend wzrostu HR, występujący także w siódmym tygodniu od rozpoczęcia podawania L-NNA. W pozostałych doświadczeniach, w których okres od rozpoczęcia podawania L-NNA do pomiarów hemodynamicznych był krótszy (od 7 do 21 dni), stwierdzono w dwóch procedurach (3.2.2.5 i 3.2.2.6) szybszą HR u szczurów LNR niż u szczepu SHR, zaś w dwóch innych (3.2.2.2 i 3.2.2.3) wolniejszą. Czynnikiem eksperymentalnym, który mógł mieć wpływ na występujące różnice była masa szczurów, związana z wiekiem. W doświadczeniach, w których stwierdzono wolniejszą HR w grupach LNR w porównaniu do SHR, szczury były o ponad 50 g cięższe i od 2 tygodnie starsze od tych, u których wzajemne relacje HR były odwrotne. Zmiana HR, która dokonywała się u szczurów, którym podawano L-NNA jest wypadkową czynników o nierzadko przeciwnym kierunku działania. Należało oczekiwać, że wzrost ciśnienia tętniczego, spowodowany podaniem L-NNA, powinien poprzez uruchomienie komponenty sercowej odruchu z baroreceptorów tętnicznych, wywołać zwolnienie HR. Stąd przy ciśnieniu tętniczym nieco wyższym w grupach LNR niż SHR można było oczekiwać wolniejszej HR w grupie LNR. W istocie, obserwowany w Procedurze 3.2.2.3 trend wzrostu HR zachodził równocześnie z niewielkim trendem spadku

SBP. Efekt zwolnienia HR w odpowiedzi na L-NNA udokumentowano wcześniej u psów<sup>433</sup> i królików<sup>434</sup>, a Kojda i wsp. wykazali, że uszkodzenie genu kodującego eNOS powoduje bradykardię<sup>435</sup>. W doświadczeniach wykonanych z udziałem ludzi wykazano, że po dożylnym podaniu L-NMMA HR ulega zwolnieniu<sup>436</sup> lub nie zmienia się<sup>437</sup>. Inne dane eksperymentalne wskazują na różnicowany wpływ zahamowania NOS na HR, zależny od dawki i czasu podawania inhibitora. Podczas 15-minutowego dożylnego wlewu subpresyjnej dawki L-NMMA zarejestrowano, metodą mikrografii, zwiększenie impulsacji współczulnej dochodzącej do mięśni obwodowych, z towarzyszącym zwolnieniem HR, zaś po zwiększeniu dawki występował efekt odwrotny<sup>438</sup>. Po jednorazowym bądź przy krótkotrwałym stosowaniu inhibitorów NOS stwierdzano zwiększenie wzmocnienia odruchu z baroreceptorów tętniczych i wyraźne zwolnienie HR, ale przy przewlekłym zahamowaniu NOS w większości, choć nie we wszystkich badaniach, obserwowano obniżenie wrażliwości odruchu z baroreceptorów tętniczych i zahamowanie tendencji do zwolnienia HR<sup>429,439-441</sup>. W doświadczeniach wykonanych na szczurach wykazano, że zahamowanie NOS może zwiększać uwalnianie hormonów tarczycy do krwioobiegu i przez to wywoływać przyspieszenie HR<sup>442</sup>. Powodem przyspieszenia HR przez zahamowanie NOS jest ograniczenie hamującego wpływu NO na neurony w dółgłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego (RVLM) i przez to zwiększenie względnego udziału komponenty współczulnej autonomicznej regulacji rytmu serca<sup>429,443</sup>. U szczurów SHR stwierdzono niski poziom metabolitów NO w RVLM związany ze zwiększeniem lokalnego wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego<sup>444</sup>. Ponadto udokumentowano, że inhibitory nNOS ograniczają depresyjny wpływ nerwu błędnego na serce, co dokonuje się zarówno na poziomie neuronów przed-, jak i pozazwojowych<sup>445</sup>, a także przez modulowanie odpowiedzi neuronów pnia mózgu na glutaminian<sup>446</sup>. Należy zaznaczyć, że L-NNA, którą wykorzystałem w tej pracy w charakterze niespecyficznego inhibitora NOS, wykazuje o rząd wielkości większe powinowactwo do nNOS, niż stosowane w wielu innych pracach estry L-argininy, np. L-NMMA, lub L-NAME<sup>429</sup>. Zahamowanie NOS może mieć także bezpośredni wpływ na efektor. Jakkolwiek Herring i Paterson wykazali w doświadczeniach na świnkach morskich, że zahamowanie nNOS nie wpływa na odpowiedź sercową na egzogenną pochodną acetylocholino – karbamylcholinę<sup>429,447</sup>, to z drugiej strony opisano, że L-NNA zmniejsza ekspresję niektórych błonowych kanałów potasowych (m. in.  $K_{v15}$ ), co może przyczyniać się do skrócenia okresu powstawania pobudzenia w komórkach rozrusznikowych węzła zatokowo-przedsionkowego i do przyspieszenia rytmu serca<sup>448</sup>. Zwraca uwagę fakt, że w warunkach standardowych na początku eksperymentu (Procedura 3.2.2.2), wykonanego na preparatach izolowanych serc, pozbawionych zewnętrznych wpływów regulacyjnych, HR była w grupie LNR istotnie szybsza niż w pozostałych grupach. Na odmienną charakterystykę regulacji krążenia szczurów SHR i LNR wskazuje produkt podwójny – PRP, będący iloczynem maksymalnej wartości ciśnienia skurczowego i HR. Ze zbliżonym poziomem PRP w preparatach serc izolowanych obu grup, kontrastuje o ponad 40% większy PRP w grupie LNR w warunkach *in vivo*, pod koniec siedmiodobnego okresu podawania L-NNA.

Preparaty izolowanego układu tętnic kregkowych wyizolowane od szczurów z nadciśnieniem tętniczym wykazywały większą od ich odpowiedników WKY zdolność do reagowania skurczem mięśniówki gładkiej naczyń na stymulację elektryczną, na co wskazuje przesunięcie w lewo krzywej dawka-odpowiedź oraz większa odpowiedź maksymalna (ryc. 27, 28), przy czym w zakresie bodźców słabych i umiarkowanych o napięciu nie przekraczającym 15 V odpowiedzi na stymulację elektryczną w grupie LNR były wyraźnie mniejsze niż w preparatach SHR. Zarówno u szczurów SHR<sup>449</sup>, jak też szczu-

rów pierwotnie normotensyjnych, którym podawano inhibitor NOS<sup>450,451</sup>, udokumentowano zwiększoną zawartość noradrenaliny (NE) w mięśniówce gładkiej naczyń i nasilone jej uwalnianie z zakończeń nerwowych w odpowiedzi na stymulację elektryczną<sup>429</sup>. U szczurów SHR jest to przynajmniej częściowo związane ze zwiększeniem wychwytu zwrotnego NE, co sprzyja jej akumulacji w pęcherzykach synaptycznych i uwalnianiu w zwiększonej ilości podczas pobudzenia neuronu<sup>452</sup>. Z kolei bezpośredni wpływ NO na wychwyt zwrotny NE nie jest oczywisty i dlatego potencjalne efekty zahamowania NOS są dyskusyjne. Wykazano, co prawda, że inhibitory NOS hamują wychwyt zwrotny serotoniny i jej pochodnych<sup>453</sup> i że NO wchodzi w interakcje z transporterami NE i dopaminy (NET i DAT)<sup>454</sup> oraz że błękit metylenowy, który jest inhibitorem cyklicznej guanylanowej i wewnątrzkomórkowym efektem NO, hamuje neuronalny wychwyt noradrenaliny<sup>455</sup>, jednakże liczne prace wskazują, że NO nie ma bezpośredniego wpływu na ten proces<sup>453,456,457</sup>. W warunkach fizjologicznych NO może reagować z NE tworząc 6-nitrozo-noradrenalinę (6-NO<sub>2</sub>-NE) - cząsteczkę, która w mikromolowych stężeniach potęguje uwalnianie NE z zakończeń nerwowych i hamuje jej wychwyt zwrotny. Zahamowanie NOS może zatem, w sposób pośredni, poprzez ograniczenie wytwarzania 6-NO<sub>2</sub>-NE, zwiększyć dynamikę wychwytu zwrotnego NE. Pośrednim wykładnikiem obecności NE w mięśniówce gładkiej preparatu naczyniowego jest czas zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej po zakończeniu działania bodźca i pole zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej (DecA). Niemal w całym zakresie zastosowanych bodźców, DecA było wyraźnie większe w preparatach LNR w porównaniu do SHR (ryc. 4; tab. 15), co sugeruje upośledzenie wchłaniania zwrotnego NE przez L-NNA lub ewentualnie znaczne przedłużenie uwalniania NE z zakończeń nerwowych poza czas działania bodźca. Analogicznie, w preparatach LNR czas zaniku odpowiedzi naczyniokurczącej na wznowienie perfuzji po ischemii był przedłużony (tab.17), pomimo mniejszej amplitudy tej odpowiedzi niż w grupie SHR. Analiza porównawcza odpowiedzi naczyniokurczących o tej samej amplitudzie wywołanych przez stymulację elektryczną, NE i wznowienie perfuzji po ischemii (tab.20, ryc. 51, 52) ujawniła ich odmienny przebieg: obciążenie ciśnieniowe wywołane przez ischemię było większe, o czym świadczy większe pole powierzchni odpowiedzi naczyniokurczącej wykreślone w czasie oraz wolniejsza kinetyka jej zaniku. W szczególności wyróżniały się pod tym względem preparaty wyizolowane od szczurów SHR (ryc. 51, 52). O ile można przyjąć, że odpowiedzi naczyniokurczące na NE i stymulację elektryczną są pochodną pobudzenia receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych, to mechanizm skurczu naczyniowego występującego po ischemii wydaje się być bardziej złożony. Oprócz NE uwolnionej z lokalnych zakończeń nerwowych, istotne znaczenie mogą odgrywać jony K<sup>+</sup> uwolnione z uszkodzonych niedotlenieniem komórek oraz anionorodnik ponadtlenkowy generowany przez oksydazę ksantynową<sup>458,459</sup> i oksydazę NADH/NADPH<sup>63</sup>, uaktywnioną przez niedotlenienie.

W porównaniu do układów tętnic kregkowych pochodzących od szczurów normotensyjnych WKY, preparaty naczyniowe wyizolowane ze szczurów nadciśnieniowych charakteryzowało większe napięcie mięśniówki gładkiej naczyń. Wyrazem tego było wyższe ciśnienie perfuzyjne (PP) i większe odpowiedzi wazorelaksacyjne na papawerynę (AVT) i nitroprusydek sodowy (SNT; ryc. 30). W tętnicach kregkowych wyizolowanych ze szczurów LNR napięcie mięśniówki gładkiej było wyższe niż w grupie SHR, przy mniejszych odpowiedziach naczyniokurczących na testowane dawki fenylefryny (PE) i NE (ryc. 34, 50). Zwraca uwagę fakt, że testowane wskaźniki podatności dużych pni tętniczych: szybkość rozprzestrzenia fali ciśnieniowej (v), maksymalna szybkość skurczowego narastania ciśnienia w aorcie – ((+dP/dt)max) i szybkość jego spadku po

zakończeniu podokresu wyrzutu krwi do aorty ( $-dp/dt$ ), wskazują na mniejszą podatność dużych tętnic w grupie SHR w porównaniu do LNR (ryc. 54).

Wcześniejsze doniesienia oparte na badaniach *in vitro*<sup>449</sup> i *in vivo*<sup>460</sup> wskazują na zwiększoną wrażliwość efektora naczyniowego na NE u szczurów SHR. Dane odnoszące się do wpływu zahamowania NOS na odpowiedzi naczyniowe na aminy katecholowe są niespójne. Vo i wsp. ujawnili, że supresja endogennego wytwarzania NO w izolowanej tętnicy ogonowej przez L-NAME i L-NNA nasila skurcz naczyń wywołany przez PE, endotelinę, serotoninę i stymulację elektryczną, przy czym efektu tego nie zaobserwowano po usunięciu śródbłoka<sup>461</sup>. W odmiennym modelu eksperymentalnym, Adeagbo i wsp.<sup>462</sup> nie zauważyli istotnego wpływu L-NAME na przebieg odpowiedzi naczyniokurczących wywołanych podaniem do tętnic krezkowych KCl lub cirazoliny, selektywnego agonisty receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych. Mogłoby to wskazywać, że supresja endogennego wytwarzania NO nie zmienia wrażliwości efektoru na egzogenne czynniki obkurczające mięśniówkę gładką naczyń. Z kolei Peotta i wsp. zanotowali u myszy w narkozie uretanowej zmniejszenie odpowiedzi presyjnej na PE po podaniu L-NAME<sup>463</sup>. W innych doświadczeniach przeprowadzonych na tętnicach krezkowych wypreparowanych ze szczurów szczepu Wistar, którym podawano L-NNA lub L-NAME, wpływ inhibitora NOS na odpowiedzi naczynioruchowe zależał od okresu jego podawania<sup>464</sup>. Po jednorazowym podaniu inhibitora NOS stwierdzono zwiększoną wrażliwość tętnic krezkowych zarówno na kurczące działanie PE, jak i relaksacyjne nitroprusydku sodowego (SNP). Po trzytygodniowym podawaniu inhibitora NOS odpowiedzi naczyniokurczące na PE nie odbiegały od kontrolnych, przy zwiększonej odpowiedzi na SNP, najpewniej związanej ze zwiększonym napięciem czynnym mięśniówki naczyniowej.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań dotyczą szczurów, które przewlekłe otrzymywały L-NNA, w celu wywołania względnie ustabilizowanego nadciśnienia tętniczego. Podstawowym walorem doświadczeń wykonanych *in vivo* było zapewnienie możliwie niezakłóconych warunków pomiaru przez staranne przyzwyczajanie zwierząt do środowiska eksperymentalnego. Istotne znaczenie miała technika wyprowadzenia linii naczyniowych umożliwiająca późniejszą długotrwałą rejestrację zmiennych hemodynamicznych w warunkach bez narkozy, przy pozostawionej swobodzie ruchu, bez znaczącego ryzyka wytworzenia odczynu zapalnego związanego z interwencją chirurgiczną. W eksperymentach *in vitro*, przeprowadzonych na izolowanym układzie tętnic krezkowych, kluczowym czynnikiem było nabyte wcześniej doświadczenie<sup>378,379,382,392,465</sup>, nieodzowne dla pozyskania bardzo jednorodnych preparatów naczyniowych, które perfundowano w wielokrotnie wcześniej przetestowanym układzie perfuzyjnym, zaprojektowanym dla potrzeb eksperymentu. Podstawowym czynnikiem odróżniającym nadciśnienie tętnicze w modelu eksperymentalnym SHR od indukowanego przez podawanie inhibitorów NOS jest biodostępność NO: znacznie ograniczona w grupie LNR i prawidłowa, lub nawet zwiększona u szczepu SHR. Liczne doniesienia z ostatnich lat ujawniły, że w rozwoju nadciśnienia tętniczego u szczurów SHR, dochodzi do indukcji stresu oksydacyjnego<sup>466-469</sup>, a następnie do kompensacyjnego zwiększenia aktywności enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej i do nadekspresji syntazy NO, zwłaszcza jej izoforny indukowalnej (iNOS)<sup>467,470-473</sup>. W rezultacie młode szczury SHR, u których nie doszło jeszcze do dysfunkcji śródbłoka spowodowanej przeciążeniem ciśnieniowym, reprezentują model eksperymentalny o zwiększonej biodostępności NO w układzie krążenia<sup>471</sup>. Biorąc pod uwagę, że działanie wazodilatacyjne acetylocholino (ACh) realizuje się przede wszystkim za pośrednictwem NO uwalnianego ze śródbłoka naczyniowego nie dziwią opisywane wcześniej<sup>474 475</sup> i potwierdzone w bieżących wynikach badań (ryc.

30) wzmożone efekty wazorelaksacyjne ACh u szczurów SHR. Należy przy tym zaznaczyć, że opisywano także zmniejszone odpowiedzi na ACh w izolowanych tętnicach naczyń krezkowych szczurów SHR, przy całkowitym ich zniesieniu po podaniu L-NAME<sup>341,476</sup>. Z kolei Conrad i wsp.<sup>477</sup> wykazali u szczurów bez narkozy, że po jednorazowym podaniu L-NMMA odpowiedź wazodepresyjna na metacholinę jest zachowana w około 30 do 50%. Wyniki badań przedstawione na ryc.30, a także uzyskane z eksperymentów na izolowanym sercu i preparacie tętnic krezkowych, jednoznacznie wskazują, że przy przewlekłym stosowaniu L-NNA w dawce wywołującej wybitny, ale nie krytyczny wzrost ciśnienia tętniczego, nie dochodzi do całkowitego zniesienia odpowiedzi naczyniorozkurczających na ACh.

L-NNA zmniejszała przepływ wieńcowy w sercu perfundowanym w układzie Langendorffa i praktycznie znosiła okres przekrwienia reaktywnego występujący kilka minut po zakończeniu ischemii serca izolowanego (ryc. 24). Wiązało się to z istotnie większym upośledzeniem czynności skurczowej serca w pierwszych 20-min. reperfuzji od obserwowanego w grupach SHR i WKY (ryc.25, 26). W grupie LNR w okresie 20-min reperfuzji występował najwyraźniejszy trend powrotu wykładników czynności mechanicznej serca do poziomów wyjściowych i dlatego wydaje się, że obserwowane różnice czynnościowe między sercami grupy LNR powinny z dużym prawdopodobieństwem zaniknąć w późniejszym okresie po dokonanej ischemii. Zwraca uwagę fakt, że obu grupach nadciśnieniowych dysfunkcja rozkurczowa lewej komory serca była mniejsza niż u odnośników referencyjnych – WKY, czego wykładnikiem ilościowym było niższe ciśnienie końcowo-rozkurczowe (EDP) bezpośrednio po zakończeniu ischemii oraz że w dalszym przebiegu reperfuzji dynamika powrotu EDP do poziomu sprzed ischemii była wyraźnie większa w grupie LNR, niż SHR. Potencjalnie kardioprotekcyjne właściwości inhibitora eNOS: L-NAME sugerują doniesienia Bendalla i wsp.<sup>478</sup> i Beversa i wsp.<sup>479</sup> wskazujące, że L-NAME zabezpiecza eNOS przed jej rozpadem na monomery. W postaci prawidłowej, sprzężone pary podjednostek eNOS tworzą dimer, a produktem eNOS jest NO, natomiast w przypadku ich rozprzężenia monomery eNOS generują w zamian anionorodnik ponadtlenkowy, tworząc warunki stresu oksydacyjnego. Wyniki badań porównawczych z wykorzystaniem myszy pozbawionych eNOS ujawniły, że przeciążenie ciśnieniowe lewej komory serca, prowadzi do rozsprzężenia enzymu, do zwiększonej generacji ROS, przerostu mięśniówki komory i do rozwoju niewydolności krążenia, czemu może częściowo zapobiec wyłączenie eNOS, przez zastosowanie jej inhibitorów<sup>480,481</sup>.

Istotnym elementem nadciśnienia tętniczego jest przesterowanie odruchowych mechanizmów regulacji oporu obwodowego naczyń i czynności serca, co udowodniono w licznych badaniach klinicznych, a także w doświadczeniach na modelach zwierzęcych. Odruchy z chemoreceptorów tętnicznych, obszarów chemowrażliwych w mózgu i z baroreceptorów tętnicznych wywierają zasadniczy wpływ na hemodynamikę, dostosowując aktywność układu autonomicznego sterującego układem krążenia do bieżących potrzeb metabolicznych. Odruch z baroreceptorów tętnicznych funkcjonuje na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego zapewniając utrzymanie ciśnienia tętniczego na stabilnym poziomie. Przy aktywności ruchowej, a także w spoczynku, ciśnienie tętnicze zmienia się w mniejszym lub większym stopniu, z cyklu na cykl serca. Wynika to ze zmian powrotu żylnego krwi do serca zależnego od fazy oddechowej, rytmicznej aktywności rozrusznikowej neuronów ośrodkowych sterujących aktywnością obwodowych włókien układu autonomicznego, cyklicznego uwalniania neurohormonów i wazoaktywnych substancji o działaniu miejscowym, a także z pobudzenia, lub hamowania odruchów modulujących rytm serca. Już we wczesnym okresie rozwoju osobniczego, poprzedzają-

cym rozwinięciu nadciśnienia tętniczego, u szczurów SHR wykazano większą gęstość włókien współczulnych w ścianie naczyniowej<sup>482</sup> oraz hipertrofię kłębków aortalnych i szyjnych odpowiedzialnych za detekcję tlenu<sup>483</sup>. Stwierdzono także zmienioną aktywność układów neurotransmisyjnych mózgu<sup>484-488</sup> i zwiększoną aktywność odruchu z chemoreceptorów tętniczych<sup>489,490</sup>, przy zredukowanej wrażliwości na hipoksję<sup>491-493</sup>. Przejawem tych zaburzeń jest zwiększenie aktywności obwodowych włókien współczulnych zaopatrujących serce i naczynia krwionośne<sup>494-496</sup> i zmniejszenie wrażliwości odruchu z baroreceptorów tętniczych<sup>497,498</sup>.

Na przebieg odruchu z baroreceptorów tętniczych mają wpływ zmiany aktywności włókien aferentnych i eferentnych, a także neuronów ośrodkowych łuku odruchowego i neuronów modulujących ich aktywność. Biorąc pod uwagę, że NO jest wytwarzany w każdym z tych miejsc, jego udział w odpowiedziach odruchowych wydawał się wysoce prawdopodobny. Wyniki opublikowanych badań nie były jednoznaczne, gdyż ujawniono zarówno zwiększenie wrażliwości odruchu z baroreceptorów po zastosowaniu inhibitora NOS<sup>499</sup>, jaki i jej zmniejszenie przy suplementacji przewlekłej<sup>440,500</sup>. Pętla regulacyjna odruchu z baroreceptorów tętniczych ma zasadnicze znaczenie w krótkookresowej regulacji ciśnienia tętniczego, zapobiegając jego gwałtownym zmianom, które mogłyby zakłócać perfuzję narządów i tkanek. Metodyka oceny odruchu z baroreceptorów tętniczych jest zróżnicowana i obejmuje bezpośrednie pomiary aktywności włókien współczulnych zaopatrujących nerki (RSNA) i mięśnie obwodowe (MSA) oraz analizę odpowiedzi sercowych wywołanych samoistnymi, lub prowokowanymi farmakologicznie zmianami ciśnienia tętniczego, a także przebieg odpowiedzi sercowych na mechaniczne odkształcanie zatoki szyjnej. Niedogodnością testów farmakologicznych są nieuniknione interakcje testowanych substancji, najczęściej fenylefryny (PE) i nitroprusydku sodowego (SNP) z efektozem. W ostatnich latach opracowano sposoby ilościowej oceny odpowiedzi odruchowych oparte o analizę sekwencji samorzutnie powstających jednokierunkowych zmian ciśnienia tętniczego i HR. Z powodu nakładania się licznych składowych o charakterze harmonicznym cykle sercowe następują po sobie w nierównych odstępach i występują różnice ciśnienia tętniczego w kolejnych cyklach sercowych. Przyjęto, że zmiany ciśnienia tętniczego występujące w trzech i więcej następujących po sobie cyklach serca tworzą sekwencję zmian, która może inicjować odpowiedzi odruchowe na pobudzenie, przy wzroście ciśnienia tętniczego, lub odbarczenie baroreceptorów tętniczych przy jego spadku<sup>410</sup>. Liczba sekwencji ciśnieniowych występujących w jednostce czasu odzwierciedla chwilowy potencjał regulacyjny. Równocześnie z sekwencjami zmiany ciśnienia tętniczego, lub z pewnym w stosunku do nich opóźnieniem, mogą występować sekwencje jednokierunkowych zmian odstępu RR (RRi). Odsetek sekwencji sercowych skojarzonych z ciśnieniowymi określanymi mianem wydajności odruchu (BEI) jest wyznacznikiem rzeczywistej odruchowej kontroli ciśnienia tętniczego. Przez analogię z odpowiedziami ciśnieniowymi wywoływanymi przez PE lub SNP, nachylenie linii regresji wyznaczającej zmianę częstości akcji serca podczas sekwencji sercowej w funkcji zmiany ciśnienia tętniczego, odpowiada wzmocnieniu odruchu, określanemu też jako jego wrażliwość odruchu (BRS)<sup>411</sup>. Wykazano, że BRS jest obniżona w różnych modelach eksperymentalnego nadciśnienia tętniczego: naczyniowo-nerkowego (2K1C), zależnego od nadmiernej podaży soli i deoksykortykosteronu (DOCA-salt) i wywoływanego przez inhibitory NOS, co koreluje z uszkodzeniem narządów obwodowych widocznym po 6 tygodniach od zaindukowania nadciśnienia tętniczego<sup>501</sup>. Wdrożenie treningu typu wytrzymałościowego u szczurów SHR przyczynia się do redukcji stresu oksydacyjnego i prowadzi do zwiększenia BRS<sup>502</sup>. Uważa się, że sekwencje o kierunku zgodnym, tzn. o tym samym kierunku zmiany ciśnienia tętniczego i RRi nie zależą od odruchu z



baroreceptorów tętnicznych. Ich fizjologiczne znaczenie nie zostało ostatecznie rozstrzygnięte, ale przyjmuje się, że ich źródłem jest pobudzenie w autonomicznych włókien odrędkowych wywodzące się z obszarów naczynioruchowych pnia mózgu i że mają one charakter nastawczy, umożliwiając długotrwałe utrzymanie ciśnienia tętniczego na zadanym poziomie (set point)<sup>503-506</sup>. Częstość występowania sekwencji nastawczych wzrasta podczas snu i w trakcie pogłębionego rytmicznego oddychania i drastycznie zmniejsza się pod wpływem narkozy. W przedstawionych badaniach, które zostały zrealizowane w porze dziennej, w której aktywność ruchowa i eksploracyjna szczurów jest zwykle ograniczona, zarejestrowałem dość liczne występowanie sekwencji zgodnych, co wydaje się pośrednio potwierdzać komfort środowiskowy zwierząt w trakcie doświadczenia. Wśród sekwencji zgodnych i niezgodnych – o przeciwnym kierunku zmian ciśnienia tętniczego i RRi, występowały sekwencje wzrostu i spadku ciśnienia tętniczego. We wcześniejszych publikacjach większość badaczy połączyła w jedną grupę wszystkie typy sekwencji, lub też zespoliła wyniki uzyskane z sekwencji zgodnych, lub niezgodnych, nie zwracając uwagi na kierunek zmiany ciśnienia tętniczego<sup>498,503,507-509</sup>. Podejście to uważam za nieracjonalne, przy znanej asymetrii reakcji odruchowej na spadek i wzrost ciśnienia tętniczego<sup>510</sup>. Reakcja na spadek ciśnienia tętniczego jest odpowiedzią przywracającą potencjalnie zagrożoną perfuzję tkankową, a umiarkowane krótkookresowe wzrosty ciśnienia tętniczego zwykle nie wywołują zaburzeń metabolicznych krytycznych dla funkcjonowania tkanek obwodowych. W przedstawionych badaniach sekwencje niezgodne – regulacyjne, inicjowane przez wzrost ciśnienia tętniczego ( $\downarrow HR = f(\uparrow SBP)$ ), występowały znacznie częściej niż sekwencje związane z jego spadkiem ( $\uparrow HR = f(\downarrow SBP)$ ), przy czym sekwencje wzrostu ciśnienia tętniczego wykazywały większą wydajność odruchu (BEI), co było szczególnie zaakcentowane u szczurów SHR i w nieco mniejszym stopniu LNR. Można zatem przypuszczać, że przy podwyższonym ciśnieniu tętniczym, niezależnie od jego przyczyny, bodźcowanie odruchu przywracającego wartość zadaną ciśnienia tętniczego wzrasta. Zwraca jednak uwagę mniejszą wydajność (BRS) odpowiedzi odruchowych w grupach LNR i SHR, co oznacza mniejszą zmianę HR przypadającą na jednostkową zmianę ciśnienia tętniczego. W obu typach sekwencji regulacyjnych – związanych ze wzrostem i ze spadkiem ciśnienia tętniczego BRS była istotnie mniejsza w grupie LNR w porównaniu do SHR. Zmniejszenie BRS było opisywane wcześniej w obu modelach nadciśnienia tętniczego<sup>411,440,497,500</sup>: SHR i LNR, jakkolwiek Vasquez i wsp.<sup>499</sup>, a także Peotta i wsp.<sup>463</sup> zanotowali również zwiększenie BRS po wpływie inhibitora eNOS. Doświadczenia Peotty i wsp.<sup>463</sup> były przeprowadzone na myszach, co utrudnia porównanie odruchowych odpowiedzi sercowych z obserwowanymi u szczurów, gdyż u myszy udział komponenty przywspółczulnej w regulacji rytmu serca jest znikomy<sup>511</sup>. Uwzględniając częstość sekwencji zgodnych i ich wydajność, skojarzone sekwencje nastawcze wzrostu ciśnienia tętniczego występują niemal dwukrotnie częściej u szczurów SHR niż LNR i pięciokrotnie częściej niż u ich odpowiedników normotensyjnych WKY (ryc. 58, 59). Można to interpretować jako wyraz zwiększonego tonicznego napędu wazokonstrykcyjnego występującego u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym.

Oprócz ilościowej analizy sekwencji hemodynamicznych i oceny wzmocnienia odruchu, odrębnym wykładnikiem przebiegu odpowiedzi odruchowej jest czas opóźnienia od zainicjowania reakcji do jej rozpoczęcia<sup>413</sup>. Przesunięcie w fazie pomiędzy zmianą ciśnienia tętniczego i odpowiedzią sercową, określane w skali cykli sercowych, odzwierciedla stabilność odruchu w układzie regulacyjnym o wielostopniowych sprzężeniach zwrotnych. Zwiększenie przesunięcia fazowego może prowadzić do nieskutecznego wyrównywania zmiany ciśnienia przez nadmiernie opóźnioną odpowiedź sercową,

zwiększenia kosztu energetycznego tej odpowiedzi oraz do wzrostu ryzyka wypadnięcia odpowiedzi odruchowych indukowanych przez kolejne bodźce ciśnieniowe<sup>512,513</sup>. Wzorzec eksperymentalny badań przesunięcia fazowego w metodzie sekwencyjnej analizy odruchu z baroreceptorów tętnicznych wypracował Oosting i wsp.<sup>411</sup> w 1997 roku, a sposób wyznaczania sekwencji i ich dalszej analizy, w tym podstawowe założenia algorytmu obliczeniowego, wykorzystywane przy opracowywaniu dedykowanego oprogramowania, był później powielany w licznych projektach badawczych. Oosting i wsp.<sup>411</sup> wykazali, że większość sekwencji sercowych skojarzonych z ciśnieniowymi rozpoczyna się ze stosunkowo znacznym opóźnieniem (3 – 6 cykli sercowych) w stosunku do początku sekwencji ciśnieniowych. Wyniki te zasadniczo różnią się od przedstawionych w niniejszej pracy. Większość rozpoznanych przez mnie sekwencji sercowych rozpoczynała się w najbliższym cyklu od rozpoczęcia sekwencji ciśnieniowej, co określiłem jako przesunięcie zerowe. Przyczyną rozbieżności może być odmienna metodyka pomiaru i przetwarzania danych. Oosting i wsp.<sup>411</sup> definiowali sekwencję jako jednokierunkową zmianę ciśnienia tętniczego lub HR, o stosunkowo wysokiej amplitudzie, odniesioną do średniej ruchomej wyznaczonej z 10 kolejnych cykli sercowych. Argumentem przemawiającym za wyodrębnieniem testowanych sekwencji ze średniej ruchomej była konieczność odfiltrowania szumu pomiarowego związanego między innymi z ruchami oddechowymi, z nieskoorynowanym zachowaniem zwierzęcia i ograniczoną rozdzielczością próbkowania, która mogła być zbyt niska do dokładnego określenia wartości ciśnienia tętniczego i czasu trwania kolejnych cykli sercowych. Zastosowanie w doświadczeniach nowej generacji drenów (Procedura 3.2.2.3) do wyprowadzania linii naczyniowych, utrzymujących drożność przez długi okres, pozwoliło na wydłużenie czasu rekonwalescencji od interwencji chirurgicznej do właściwego eksperymentu. Przy starannym zaadaptowaniu zwierząt do warunków pomiarowych szczury nie wykazywały cech zaniepokojenia i nie wymagały narkozy, co zapewniało wiarygodność pomiaru. Przy minimalnej naturalnej aktywności związanej z porą dzienną, zwierzęta oddychały w sposób rytmiczny i niezbyt głęboki, a wyznacznikiem ich komfortu bytowego była stosunkowo wolna HR, w przedziale 240 – 350 /min. Po zarejestrowaniu przebiegów ciśnienia tętniczego i HR stwierdziłem, że nie występują zakłócenia wymagające użycia algorytmu fitrującego. W serii obliczeń wstępnych (dane nieopublikowane) zauważyłem ponadto, że przy wyznaczaniu sekwencji ze średniej ruchomej uzyskanej z 10 kolejnych cykli sercowych liczba zidentyfikowanych sekwencji jest mniejsza niż wyznaczona z zapisu nieprzetworzonego oraz, że niektóre z sekwencji ujawniają się jedynie przy wykorzystaniu jednej z metod obliczeniowych. Wyniki badań wskazują, że początek większości sekwencji sercowych o charakterze nastawczym rozpoczyna się w tym samym, lub następnym cyklu serca po rozpoczęciu sekwencji ciśnieniowej. Może to wskazywać na istnienie wspólnego ośrodkowego generatora sekwencji sercowych i ciśnieniowych. Przytłumienie endogennego wytwarzania NO u szczurów LNR wyraźnie destabilizuje odruch z baroreceptorów, o czym świadczy zwiększenie przesunięcia fazowego zarówno podczas przeważających ilościowo skojarzonych sekwencji regulacyjnych inicjowanych przez wzrost ciśnienia tętniczego, jak i w sekwencjach jego spadku (ryc. 58). Odróżnia to tę grupę od szczurów SHR, u których skojarzone sekwencje spadku ciśnienia wykazują nawet mniejsze przesunięcie fazowe od ich odpowiedników normotensyjnych WKY.

Zarejestrowany przebieg zmian ciśnienia tętniczego i HR w przebiegu hipoksji hipobarycznej (ryc.60) był opisany wcześniej u szczurów<sup>491,492</sup> i odpowiadał pierwotnemu, filogenetycznie dobrze zakonserwowanemu, wzorcowi odruchu na pobudzenie chemoreceptorów tętnicznych, który w przybliżeniu odpowiada odpowiedzi odruchowej występującej u człowieka podczas nurkowania, przy zahamowaniu oddychania w fazie wdechu.

Obserwowano wzrost ciśnienia tętniczego z towarzyszącym zwolnieniem HR. Taki przebieg odpowiedzi układu krążenia na niedobór tlenu może być korzystnym przystosowaniem do długotrwałego przebywania w podziemnych korytarzach i jamach, gdzie prężność tlenu bywa obniżona, a zwiększenie pracy serca mogłoby ograniczyć szansę przetrwania. Interesującą obserwacją była wzmożona odpowiedź hemodynamiczna na szybkie przywrócenie prawidłowej ciśnienia powietrza, której kierunek u szczurów WKY i SHR odpowiadał reakcji na i hipobarię. Szczury SHR zareagowały stosunkowo najmniejszym i jedynie przejściowym wzrostem ciśnienia tętniczego i niewielkim zwolnieniem HR. Odpowiada to zredukowanej odpowiedzi na pobudzenie chemoreceptorów tętniczych, opisaną wcześniej u tego szczepu szczurów i wynikającej ze zwiększonej tonicznej aktywności tego odruchu<sup>493,514</sup>. Przyjmując założenie, że istnieje hipotetyczny pułap odpowiedzi na hipoksję, zwiększona toniczna aktywność odruchu z chemoreceptorów występująca u szczurów SHR limituje zakres odpowiedzi na hipoksję i dlatego obserwowane zmiany ciśnienia tętniczego i HR były stosunkowo niewielkie. W grupie LNR zarejestrowano wzmożoną odpowiedź kardiodepresyjną na hipobarię i na szybkie wyrównanie ciśnienia powietrza, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami<sup>515,516</sup>. Potęgający zwolnienie HR efekt zahamowania NOS wydaje się mieć podłoże złożone, zależne w znacznej mierze od zwiększenia wrażliwości komórek rozrusznikowych serca na acetylocholinę, co wykazał Araujo i wsp. w modelu serca izolowanego pefundowanego techniką Langendorffa<sup>515</sup>, z drugiej zaś od złożonych interakcji czynnościowych NO w neuronach jądra pasma samotnego (NTS). NO ułatwia przekaźnictwo glutaminergiczne w obrębie NTS promując w ten sposób wzrost ciśnienia tętniczego<sup>516,517</sup>, co z kolei uruchamia komponentę sercową odruchu z baroreceptorów tętniczych i w efekcie prowadzi do zwolnienia HR. Przy dominującym wpływie zahamowania NOS na poziomie NTS powinno dojść do obniżenia ciśnienia tętniczego podczas hipoksji, czego nie stwierdzono.

Oprócz mechanizmów odruchowych, przedmiotem badań odnoszących się do regulacji krążenia jest analiza rytmicznych zmian HR i wartości ciśnienia tętniczego. HR i ciśnienie tętnicze wykazują w warunkach fizjologicznych dyskretną nieregularność. Dekompozycja szeregów czasowych odstępów RR i wartości ciśnienia tętniczego przy użyciu algorytmów szybkiej transformaty Fouriera (FFT) lub metod autoregresyjnych pozwala na ujawnienie składowych harmonicznych tej nieregularności. Analiza różnic odstępów między kolejnymi pobudzeniami serca (odstępów RR; RRi) oraz wartości ciśnienia tętniczego w kolejnych cyklach sercowych została określona mianem analizy zmienności rytmu serca (HRV) i analizy zmienności ciśnienia tętniczego. HRV determinuje wiele czynników, nie zawsze możliwych do zidentyfikowania, ale kluczowymi jej wyznacznikami są rytmiczne zmiany aktywności dosercowych gałązek nerwu błędnego i włókien współczulnych, cykliczne zmiany ciśnienia w klatce piersiowej, zależne od ruchów oddechowych i zmian powrotu żylnego krwi do serca oraz, w pewnej mierze, cykliczne uwalnianie neurohormonów, neuroprzekaźników i czynników lokalnych o właściwościach wazomotorycznych. Analiza widmowa HRV, określana też mianem analizy częstotliwościowej lub spektralnej, pozwala na wyodrębnienie składowych, których udział w całkowitej zmienności, określany przez tzw. gęstość mocy widma, umożliwia ilościową ocenę wpływu układu współczulnego i przywspółczulnego na serce. Zmienne korelujące z udziałem obu komponent układu autonomicznego w regulacji rytmu serca są także wyznaczone w domenie czasowej. Przy standardowym podziale widma HRV wyróżnia się podstawowe komponenty: VLF (bardzo niskiej częstotliwości), LF – niskiej i HF – wysokiej<sup>518,519</sup>. Przedziały częstotliwościowe poszczególnych komponent różnią się u ludzi i zwierząt, w sposób w przybliżeniu proporcjonalny do

różnic spoczynkowej HR<sup>520,521</sup>. Zakres częstotliwościowy poszczególnych komponent HRV nie został u szczurów jednoznacznie wyznaczony i powszechnie zaakceptowany<sup>522-527</sup>. W oparciu o wcześniejsze rekomendacje przyjąłem, że VLF obejmuje przedział częstotliwości od 0,06 do 0,27 Hz, LF: od 0,27 do 0,74 Hz i HF: od 0,74 do 2,2 Hz<sup>522,528</sup>. VLF, którego znaczenie czynnościowe nie zostało jednoznacznie określone odzwierciedla zmienność długoterminową i jest pochodną cyklicznie zmieniającej się aktywności czynników neurohormonalnych takich jak: angiotensyna II, wazopresyna, odruchów termoregulacyjnych dostosowujących przepływ krwi w tkankach obwodowych, zwolnionego i pogłębionego rytmu oddechowego oraz sekwencji nastawczych wymuszanych przez mózgowo ośrodki regulacyjne<sup>529-536</sup>. LF jest w znacznej mierze zależne od aktywności dosercowych włókien współczulnych oraz aktywności oddechowej zależnej od układu przywspółczulnego<sup>518</sup>, zaś HF koreluje z udziałem komponenty przywspółczulnej w regulacji HR modulowanym przez wazoaktywne substancje o działaniu lokalnym takie jak NO<sup>518</sup>. Wskaźnik LF/HF, będący ilorazem obu składowych jest uznanym wykładnikiem względnego udziału komponenty współczulnej w autonomicznej regulacji HR<sup>519</sup>, a badania epidemiologiczne wskazują, że jego zwiększenie jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia krytycznych incydentów sercowych<sup>518</sup>.

Zaletą nieparametrycznej metody FFT jest stosunkowa łatwość dokonywania obliczeń przy użyciu popularnych arkuszy kalkulacyjnych. Istotnym ograniczeniem metody FFT jest założenie stacjonarnego występowania próbek pomiarowych, co w nie mogło być spełnione podczas doświadczenia, w przebiegu którego dochodziło do zmian środowiska zewnętrznego badanego zwierzęcia. W szczególności należało oczekiwać, że w trakcie hipoksji wywołanej przez hipobarię, a także po jej zakończeniu, charakter ilościowy różnic między kolejnymi odstępami RR będzie się zmieniał, czyli że rytmy biologiczne determinujące HRV są niestacjonarne. Alternatywną metodą obliczeń są parametryczne techniki autoregresyjne, które bazują na podziale testowanych przebiegów na krótkie odcinki i na wyznaczeniu koherencji pomiędzy nimi. Niedogodnością metod autoregresyjnych jest konieczność empirycznego dostosowania rzędu modelu autoregresyjnego, który powinien być wyższy niż stosowany w obliczeniach HRV u człowieka, z uwagi na szybszą HR. W doświadczeniach na gryzoniach, takich jak szczury, myszy, lub świnki morskie, parametryczne techniki wyznaczania HRV są w założeniu obciążone mniejszym błędem i większą czułością niż metoda FFT, gdyż u większości małych zwierząt chwilowy wzorec widma HRV jest bardzo zmienny, a zatem sekwencje czasowe RRi są *a priori* niestacjonarne<sup>537</sup>. Przedstawiona w rozdziale 4.7 charakterystyka ilościowa HRV w domenie częstotliwościowej została oparta na obliczeniach autoregresyjnych, przy czym zbliżone proporcje ilościowe różnic między grupami zwierząt i między poszczególnymi komponentami HRV uzyskałem także przy obliczeniach techniką FFT. Można zatem przypuszczać, że w przebiegu doświadczeń udało się uniknąć zakłóceń, które mogłyby destabilizować zachowanie zwierząt, a także, że były one dobrze zaadaptowane do warunków eksperymentalnych.

Jako wykładniki graficzne HRV w analizie czasowej wykorzystałem tzw. wykresy Poincare', które umożliwiają globalną ocenę krótkookresowej, jak i długoterminowej zmienności HR, rMSSD – który koreluje aktywnością włókien przywspółczulnych zapopatrujących serce, rozkład różnic kolejnych odstępów RR, który daje obraz krótkookresowej HRV oraz wyznaczony przeze mnie wskaźnik pNN2,5, który koresponduje ze stosowanym u ludzi wskaźnikiem pNN50. Wskaźnik pNN2,5 określa odsetek kolejnych odstępów RR różniących się od siebie o 2,5 i więcej ms. Ekstrapolując wskaźnik pNN50 na warunki eksperymentu na szczurach, wydawać by się mogło, że po podzieleniu przeciętnej HR spoczynkowej u ludzi – 70/min przez HR 350/min, oczekiwaną u szczurów,

co daje współczynnik korekcyjny 0,2 i podzieleniu 50 ms ze wskaźnika ludzkiego przez 0,2, tak uzyskany wskaźnik pNN10 będzie odpowiadał stosowanemu u ludzi. Okazało się jednak, że ponad 99,5% cykli serca u szczura nie różni się od siebie o więcej niż 10 ms, a część spośród różnic większych od 10 ms można zakwalifikować jako artefakty pomiarowe. Należało zatem wartość pNN obniżyć. Oryginalnie wyznaczony wskaźnik pNN50 odpowiadał różnicy RRi odcinającej w dystrybucie rozkładu różnic RRi 6,25% punktów pomiarowych od pozostałych RRi<sup>538</sup>. Wielkość różnicy RRi określająca wskaźnik pNN u ludzi była w ostatnich latach kwestionowana. Mietus i wsp.<sup>539</sup> zasugerowali, że należałoby wielkość różnicy odcięcia RRi kilkakrotnie obniżyć, np. do poziomu 8–10 ms, gdyż wskaźnik pNN8, lub pNN10, lepiej odzwierciedla krótkotermiową HRV i udział komponenty przywspółczulnej w regulacji rytmu serca. Przekładając proponowany przez Mietusa i wsp. wskaźnik na HR u szczura, odpowiadałoby to wskaźnikowi pNN1,6 – pNN2. Po wyznaczeniu przedziałów o zakresie 1 ms i wykonaniu histogramu (ryc. 61) okazało się, że trzeci kolejny przedział w największym stopniu różnicuje poszczególne grupy doświadczalne. Środek tego przedziału 2,5 ms, arbitralnie uznałem za odpowiednik pNN50. W warunkach standardowych pNN2,5 istotnie różnicował poszczególne subpopulacje: był największy u szczurów normotensyjnych WKY, a zdecydowanie najmniejszy w grupie LNR. U ludzi wskaźnik pNN50 i wskaźniki pochodne pNNx korelują z rMSSD i HF i są traktowane jako jeden z wyznaczników udziału komponenty przywspółczulnej autonomicznej regulacji HR. W badaniach na zwierzętach doświadczalnych wskaźniki pNNx (pNN5, pNN10) wykorzystywano sporadycznie<sup>523,525</sup> i ich znaczenie czynnościowe nie zostało bezspornie zdefiniowane. Różnice pNN2,5 ujawnione między poszczególnymi grupami szczurów są zgodne z międzygrupowymi różnicami całkowitej mocy widma (TP), nie odpowiadają natomiast rankingowej kolejności rMSSD, co sugeruje, że wskaźnik pNN2,5 może lepiej określać globalną zmienność HR niż wyodrębnioną komponentę składową.

Niskie wartości rMSSD i SD1 w warunkach spoczynkowych w grupie SHR wskazują na obniżony wpływ nerwu błędnego na serce u tych szczurów. Analiza spektralna ujawniła obniżoną zmienność rytmu serca w obydwu grupach nadciśnieniowych, czego wyznacznikiem była istotnie niższa całkowita moc widma (TP) i wszystkich jej komponent składowych: VLF, LF i HF w porównaniu do szczurów normotensyjnych WKY. Ograniczenie zmienności rytmu serca jest uważane za niekorzystny czynnik prognostyczny w chorobach układu krążenia sprzyjający rozwojowi powikłań narządowych w przebiegu nadciśnienia tętniczego. Z punktu widzenia regulacji w skali globalnej ograniczona HRV jest niezłym przystosowaniem do środowiska stacjonarnego, gdyż wiąże się z oszczędnym wydatkowaniem energii. W praktyce życiowej środowisko bytowe cechuje znaczna różnorodność, o dość dużej skłonności do występowania nagłych zakłóceń. W takim systemie lepiej sprawdza się regulacja typu nadmiarowego, reprezentowana przez znaczną HRB i BPV, gdyż w istocie sprzyja szybkiemu dostosowaniu odpowiedzi organizmu do charakteru zmiany, wymuszającej tę odpowiedź. Badania sportowców i osób o wysokiej aktywności ruchowej ujawniły, że osoby o wysokiej HRV mają z reguły ponadprzeciętną wydolność fizyczną i obciążone są przeciętnie mniejszym ryzykiem zaistnienia krytycznego incydentu sercowo-naczyniowego. Grupa LNR wyróżniała się zdecydowanie najmniejszą mocą widma HRV, przy w znacznej mierze zachowanej rytmicy z zakresie pasma HF i zwiększonym wskaźniku LF/HF. Przemawia to za zachowanym sterowaniem czynności serca za pośrednictwem nerwu błędnego, przy prawie zniesionej komponente współczulnej. NO i inhibitory jego biosyntezy wywierają wpływ na funkcjonowanie większości o ile nie wszystkich składowych regulacji krążenia. W uproszczeniu, przy nieznacznie przypieszona HR, zachowanie wykładników

niezmienionej aktywności przywspółczulnej – HF i LF/HF może wynikać z nakładania się dwóch składowych: regulacyjnej, polegającej na odhamowaniu przez L-NNA odruchu wagalnego z baroreceptorów tętniczych, z czym kojarzy się zaobserwowane zwiększenie BRS w sekwencjach wzrostu SBP, (tab 21) i efektorowej: przyspieszającej rytm serca poprzez aktywację błonowych kanałów potasowych. Zwiększona wartość LF/HF u szczurów SHR stanowi potwierdzenie nadmiernego udziału komponenty współczulnej w regulacji HR, co jest czynnikiem ryzyka nagłych zaburzeń rytmu serca. Podczas hipoksji zmniejszył się udział układu autonomicznego w regulacji czynności serca, na co wskazują zmniejszenie całkowitej mocy widma, a także jego składowych. Przy prezentowanym przez szczury pierwotnym typie reakcji sercowej na hipoksję, zależnej od oscylatora mózgowego o właściwościach rozrusznikowych, ten sposób odpowiedzi znacznie ogranicza zakres sercowych odpowiedzi odruchowych, zwiększając prawdopodobieństwo wystąpienia arytmii. Zwiększenie względnego udziału komponenty współczulnej w tak zredukowanej kontroli czynności serca może dodatkowo zwiększać ryzyko arytmii. Podczas hipoksji u wszystkich szczurów obserwowano zmniejszenie zmienności krótkoterminowej, o czy świadczą obniżone wartości rMSSD i SD1, natomiast wzrosło znaczenie zmienności długookresowej, reprezentowanej przez SD2. Ze spokojnym zachowaniem szczurów podczas hipoksji i umiarkowanymi zmianami MAP i HR w trakcie jej trwania, pozorującymi względnie niedużą siłę bodźca hipoksycznego, kontrastowały znacznie większe wzrosty mocy widmowej po zakończeniu hipobarii, utrzymujące się przez kilkadziesiąt min. po jej zakończeniu., w szczególności w grupie LNR. Przywrócenie uprzednio ograniczonej podaży tlenu w tej grupie najwyraźniej prowadzi do niezbilansowanego tlenkiem azotu przyrostu ROS i do zwiększenia udziału składowej współczulnej w regulacji czynności serca, czego wyznacznikiem jest wzrost wskaźnika LF/HF.

## **5.2. Wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego w naczyniach tętniczych wyizolowanych od szczurów z nadciśnieniem tętniczym**

Z powszechnie znanymi właściwościami antyoksydacyjnymi tempola, w tym jego potencjałem w wymiataniu anionorodnika ponadtlenkowego kontrastują doniesienia wskazujące, że w pewnych warunkach, które mogą występować w środowisku biologicznym, tempol może działać jako utleniacz o potencjalnie destrukcyjnym profilu działania. Przy założeniu stosowania tempola jako przeciwutleniacza, istniała potrzeba potwierdzenia jego właściwości antyoksydacyjnych w łożysku naczyniowym, w stężeniach odnoszących się do planowanych dawek.

Wyniki oznaczeń wykonanych przy wykorzystaniu metody redukcji cytochromu c, dostosowanej do warunków perfuzji preparatu izolowanego układu naczyń krezkowych wskazują, że w naczyniach krezkowych perfundowanych natlenowanym płynem wieloelektrolitowym Krebsa dochodzi do wytwarzania mierzalnych ilości anionorodnika ponadtlenkowego. Po przepłynięciu przez układ naczyniowy absorbancja pobranych próbek perfuzatu była istotnie większa, co dowodzi, że doszło do redukcji cytochromu c, najpewniej w wyniku reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym. Przy perfuzji roztworami tempola redukcja cytochromu c była istotnie mniejsza, co potwierdza jego właściwości antyoksydacyjne.

W warunkach podstawowych wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego w tętnicach krezkowych perfundowanych roztworem wieloelektrolitowym nie przekracza wartości nanomolowych w przeliczeniu na gram tkanki w ciągu minuty, czyli jest o około rząd wielkości mniejsze niż w sercu<sup>540-542</sup>. Różnica tkankowa w wytwarzaniu anionorodnika w tętnicach obwodowych koresponduje z intensywnością przemian metabolicznych. W standardowych warunkach perfuzji ujawniły się co prawda różnice ilościowe wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego między grupami doświadczalnymi, ale ich wzajemne relacje były odmienne w doświadczeniach wykonanych w odrębnych procedurach doświadczalnych: 3.3.2.5 i 3.3.2.6 i dlatego nie zostały one uwzględnione we wnioskach. Należy zaznaczyć, że przy wytwarzaniu anionorodnika nadadtlenkowego z szybkością rzędu 1 nmol/g tkanki/min, tylko kilkakrotnie przekracza poziom szumu pomiarowego przy oznaczaniu redukcji cytochromu c w płynie perfuzyjnym. W praktyce oznacza to, że nawet niewielka różnica warunków pomiaru, np. odmienna zawartość jonów metali przejściowych, które w śladowym stężeniu mogą być obecne w płynie perfuzyjnym, może wpływać na wynik oznaczeń. W przypadku porównań dokonywanych w ramach jednego cyklu eksperymentalnego, ryzyko błędu pomiarowego było istotnie mniejsze, gdyż oznaczenia zawierały ten sam margines błędu, niezależny od niewielkich różnic warunków doświadczalnych, zastosowanych odczynników, lub przygotowania preparatów.

Wyniki badań jednoznacznie wskazują, że podczas kiludziesięciosekundowej stymulacji elektrycznej preparatu naczyniowego, wywołującej wzrost napięcia czynnego mięśniówki gładkiej, a także bezpośrednio po zakończeniu ischemii wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego znacząco wzrastało. W obu grupach nadciśnieniowych wzrost wytwarzania  $O_2^{\bullet-}$  był mniejszy niż w preparatach referencyjnych WKY. Na podstawie danych z piśmiennictwa można sądzić, że zwiększenie obciążenia ściany naczyniowej w przebiegu nadciśnienia tętniczego promuje stres oksydacyjny<sup>330,339,341,543,544</sup>, który z kolei indukuje lokalne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej konkurujące z cytochromem c zawartym w płynie perfuzyjnym.

Podczas reperfuzyjacji po ischemii tempol w stężeniu 0,1mM wykazał właściwości antyoksydacyjne. W stężeniu submilimolowym, nie przekraczającym szczytowego stężenia w surowicy po podaniu dożylnym tempol w niewielkim stopniu ograniczał uwalnianie  $O_2^{\bullet-}$  po ischemii, natomiast przy perfuzji 1-milimolowej nasilał stres oksydacyjny. Wyniki te są zbieżne z doniesieniami z piśmiennictwa wskazującymi, że zbyt wysokie stężenia tempola i jego pochodnych mogą wykazywać działanie prooksydacyjne<sup>545-549</sup>. Efekt promujący wytwarzanie anionorodnika nadadtlenkowego, jaki był widoczny przy użyciu milimolowego stężenia tempola, może korespondować z przejściowymi objawami pobudzenia zwierząt, które obserwowałem po podaniu dożylnym wysokich dawek – przekraczających 100  $\mu\text{mol/kg}$  masy ciała<sup>550</sup>.

Oryginalnym spostrzeżeniem jest wykazanie, że tempol w grupie WKY i w mniejszym stopniu SHR zwiększał uwalnianie  $O_2^{\bullet-}$  podczas stymulacji elektrycznej preparatu naczyniowego (tab. 19). Zbiega się to z innym działaniem tempola: przedłużeniem czasu zaniku odpowiedzi na stymulację elektryczną i na egzogenną noradrenalinę. Biorąc pod uwagę znany fakt, że aminy katecholowe, takie jak adrenalina i noradrenalina mogą inicjować reakcje wolnorodnikowe wydaje się wysoce prawdopodobne, że tempol reagując z anionorodnikiem nadadtlenkowym działa protekcyjnie w stosunku do noradrenaliny uwolnionej z zakończeń nerwowych<sup>63,551</sup>. W grupie LNR, w której tempol praktycznie nie wpływał na zanik odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną i na NE, tempol nie tylko nie nasilał uwalniania  $O_2^{\bullet-}$  podczas stymulacji elektrycznej, ale przeciwnie wytwarzanie  $O_2^{\bullet-}$  ograniczał. Oba efekty tempola wzmożone uwalnianie

$O_2^{\bullet-}$  przy pobudzeniu naczyniowych włókien nerwowych oraz przedłużenie odpowiedzi naczyniokurczącej zanotowano w preparatach o niezakłóconej ekspresji NO. Może to sugerować, że NO może modulować presyjne działanie NE, współdecydując o jej lokalnej dostępności. W reakcji z udziałem przejściowych postaci rodnikowych NO może reagować z NE, czego produktem jest 6-nitrozo-noradrenalina (6-NO<sub>2</sub>-NE), która zwiększa uwalnianie NE zakończeń nerwowych<sup>457,552</sup>. Przy prawidłowej aktywności eNOS, tempol działając protekcyjnie w stosunku do NO, może w rezultacie ułatwiać tworzenie 6-NO<sub>2</sub>-NE i w tej drodze ułatwiać promować skurcz mięśniówki naczyniowej.

Metoda oznaczania wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego oparta na redukcji cytochromu c była wielokrotnie stosowana przy perfuzji serca izolowanego<sup>540,541</sup>, natomiast nie była rutynowo wykorzystywana w izolowanych układach naczyniowych. Stąd konieczność kalibracji metody i ustalenia optymalnych warunków pomiaru. Zastosowanie zbyt niskich stężeń cytochromu c w detekcji anionorodnika ponadtlenkowego znacznie ogranicza czułość metody. Ryc.46 wskazuje na prostoliniowy, zgodny z prawem Lamberta-Beera, przebieg zależności między logarytmem stężenia ferricytochromu c a absorbancją próbek, w zakresie stężeń od 2,5 do 20 μmol/l. Absorbancja zmierzona dla stężenia 50 μmol/l wyraźnie odbiega od wcześniejszego przebiegu zależności. Wskazuje to, że zastosowanie tego stężenia w pomiarach ilościowych anionorodnika ponadtlenkowego mogłoby być obciążone znaczącym błędem, gdyż z jednej strony należałoby dokonać wstępnej dokładnej - wielopunktowej kalibracji odczynnik wzorcowego, z drugiej zaś podczas takiej stosunkowo czasochłonnej kalibracji odczynnik może zmieniać właściwości, wskutek reakcji autooksydacyjnych. Uzyskane wyniki oznaczeń są zgodne z doniesieniami, w których wykazano, że po przekroczeniu kilkunastomikromolowych stężeń cytochromu c zależność między stężeniem cytochromu c a absorbancją przyjmuje charakter krzywoliniowy<sup>553</sup>. Obok anionorodnika ponadtlenkowego inną ROS, która jest dostępna w układzie krążenia jest nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nadtlenek wodoru utlenia cytochrom c, powodując spadek wartości absorbancji. Nadtlenek wodoru może powstawać w próbówce w wyniku samorzutnej autooksydacji wody, może być także produktem reakcji dysproporcjonacji anionorodnika ponadtlenkowego. Dlatego wytwarzanie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w obszarze pomiarowym może skutecznie zakłócić oznaczenia anionorodnika ponadtlenkowego, gdyż zamiast wywołanej przez ten rodnik redukcji cytochromu c, może zachodzić jego utlenianie przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, będącą bezpośrednim produktem reakcji z udziałem rodnika. Uzupełnienie katalazą (CAT) roztworu cytochromu C stabilizowało absorbancję testowanych próbek, co wskazuje na skuteczne wyłączenie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 5.3 Biodostępność tempola

Niejednoznaczne wyniki wcześniejszych badań, odnoszących się do wpływu tempola na ciśnienie tętnicze, wymagały wyjaśnienia jego dostępności w układzie krążenia przy różnych sposobach dawkowania. Publikacje odnoszące się do zaniku tempola w środowisku biologicznym dają obraz niejednoznaczny. Opisywano zarówno kilkuminutowy<sup>554</sup>, jak też trwający od 22 do 60 minut<sup>354,355,360</sup> okres jego połowicznego zaniku, w zależności od przyjętej metodyki badań. W oznaczeniach wykonanych na całym zwierzęciu problemem diagnostycznym była niska czułość pomiaru związana ze znaczną średnicą wnęki rezonancyjnej spektrometru EPR i ze znaczną objętością wody, zawartej w ciele zwierzęcia, która skutecznie tłumi sygnał widmowy.



Zaprojektowałem oryginalny układ doświadczalny z wykorzystaniem zewnętrznego połączenia tętniczo-żylnego przeprowadzonego przez wnękę rezonancyjną spektrometru EPR, co umożliwiło długotrwałą ciągłą ocenę występowania znacznika spinowego w krwiobiegu. Przy stosunkowo małej średnicy drenów łączących i ich niewielkiej pojemności przepływ krwi przez wytworzone połączenie tętniczo-żylnego był stosunkowo powolny i stanowiąc poniżej 1% rzutu minutowego serca. Tempol jest wykorzystywany w badaniach laboratoryjnych jako czuły wskaźnik obniżenia prężności tlenu, czego wykładnikiem jest zmiana całkowitej szerokości jego widma w spektroskopii EPR<sup>327,555</sup>. Podczas doświadczeń szerokość widma była stabilna, co świadczy, że wytworzone połączenie tętniczo-żylne funkcjonujące w narkozie nie przyczyniało się do powstania hipoksemii. Przeprowadzenie krwi krążącej przez wnękę rezonancyjną spektrometru pozwoliło na uzyskanie wysokiej czułości detekcji w warunkach przyżyciowych, wielokrotnie większej niż przy badaniu całych zwierząt umieszczonych w odpowiednio przystosowanych spektrometrach<sup>554,556</sup>. Układu doświadczalny może być także wykorzystany do testowania innych związków o właściwościach paramagnetycznych. Ilościowa ocena stężenia tempola w badanym materiale opiera się na pomiarze amplitudy jego widma EPR. Przy niskich stężeniach konieczne jest zastosowanie znacznego wzmocnienia sygnału w spektrometrze (10 000), co w praktyce wiąże się ze znacznym zwiększeniem amplitudy towarzyszących szumów pomiarowych. W pojedynczych pomiarach zdarza się, że można zidentyfikować zakłócenia szumu pomiarowego, które w przybliżeniu odpowiadają charakterystycznym składowym widma tempola, przy amplitudzie szumu w obrębie tych zakłóceń nawet nieznacznie mniejszej od przeciętnej szumu pomiarowego, gdyż czasami udaje się zaobserwować charakterystyczne zaburzenia w ukształtowaniu obrazu szumu. Jednakże dla regularnego i wiarygodnego zidentyfikowania obecności tempola w badanej próbce konieczne było określenie jednoznacznego i powtarzalnego kryterium rozpoznawczego. Założyłem, że optymalnym kryterium rozpoznawczym jest minimalny stosunek sygnału, czyli amplitudy środkowego szczytu widma tempola (ryc. 4) do przeciętnej wysokości szumu i przyjąłem, za Matsumoto i wsp.<sup>554</sup> wartość  $\log(S/N) \geq 0,1$  za progową.

Wyniki badań wskazują na wielogodzinne występowanie tempola w krwiobiegu po podaniu dawek w przedziale od 10  $\mu\text{mol}$  do 1  $\text{mmol/kg}$  masy ciała. Świadczy o tym nie tylko możliwość zarejestrowania charakterystycznego widma EPR przez ponad 6 godzin od podania pojedynczej dawki, ale także odtwarzanie sygnału tempola z jego zredukowanej formy (TPL-H) przez związek o właściwościach utleniających po upływie ponad 2 godzin od zaniku sygnału wywołanego podaniem pojedynczej dawki tempola. Wykazanie regeneracji tempola z jego podstawowego metabolitu (TPL-H) wskazuje, że zredukowana postać tempola utrzymuje się w krwiobiegu znacznie dłużej, niż cząsteczka macierzysta. Uwzględniając fakt, że w krwiobiegu i w tkankach powstają liczne molekuly o właściwościach utleniających, których stężenie zależy od aktualnego stanu metabolicznego ustroju, należy przyjąć, że w warunkach zwiększonej ekspresji czynników utleniających, zjawisko odtwarzania tempola z jego hydroksylaminowej pochodnej może zachodzić stosunkowo łatwo. W ten sposób pozornie nieaktywna, zredukowana forma związku nitroksylowego może uczestniczyć w reakcjach ustrojowych typu redoks<sup>557</sup>. Zatem tempol tworzy układ, który może działać w mikroskali na zasadzie kaskadowej. Można sobie łatwo wyobrazić, że przy następujących po sobie incydentach stresu oksydacyjnego, wywołanych np. powtarzaniem intensywnym wysiłkiem fizycznym, lub nawracającym niedokrwieniem tkanki, tempol może być każdorazowo odtwarzany ze swojej zredukowanej pochodnej.

Istotne znaczenie ma ujawnienie obecności tempola przez wiele godzin od jego podawania w homogenatach uzyskanych z licznych tkanek, w tym serca i aorty. W większości tkanek, w których stwierdzono obecność tempola, stosunek sygnału do szumu odpowiadał jego stężeniu w tkankach rzędu 80 – 500 nM<sup>556</sup>, co odpowiada oznaczeniom Zweiera i Kuppusamy'ego<sup>327</sup>. Pewne trudności w interpretacji wyników może nieść bardzo wysokie stężenie tempola w osoczu i krwinkach, gdyż całkowita eliminacja krwi z badanych tkanek nie była możliwa. Nie mniej jednak, zarejestrowanie we wcześniejszych badaniach własnych jedynie słabego sygnału EPR tempola w wątrobie<sup>558,559</sup>, gdzie ilość zmagazynowanej krwi jest duża wskazuje, iż lokalne czynniki tkankowe mogą faktycznie decydować o szybkości jego eliminacji. Struktura tempola zawierająca grupę hydroksylową wskazuje na preferencyjne rozmieszczenie tempola w środowisku wodnym<sup>560,561</sup>. Analiza frakcji lipidowej testowanych homogenatów tkankowych wskazuje jednak, że wszystkich testowanych tkankach, za wyjątkiem nerki, tempol może być także rozmieszczony w strukturach lipidowych, czyli w kompartmentcie błonowym komórki. Istotne znaczenie tego faktu polega na strategicznej roli błon komórkowych i wewnątrzkomórkowych w procesach sygnałowania. W odróżnieniu do wątroby i wielu innych tkanek, gdzie redukcja tempola zachodzi przede wszystkim w cytoplazmie, w nerkach tempol metabolizowany jest głównie w mitochondriach<sup>562</sup>. Sprzyja to jego szybkiej eliminacji i utrudnia osiągnięcie wysokiego stężenia tkankowego.

Przedstawione wyniki badań potwierdzają działanie hipotensyjne nitroksylowego wymiatacza ROS – tempola. Efekt ten wystąpił u większości, choć nie u wszystkich szczurów, w większym stopniu u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym, niż u ich odpowiedników normotensyjnych.

Podstawowym problemem w badaniach dotyczących antyoksydantów jest kinetyka reakcji z ich udziałem, która jest o wiele rzędów wielkości wolniejsza od szybkości powstawania podstawowych ROS: anionorodnika nadtlenkowego, rodnika wodorotlenowego, nadtlenoazotynu i rodników lipidowych<sup>63</sup>. Ogromna reaktywność i niespecyficzność działania takich rodników tlenowych, jak np. rodnika wodorotlenowego sprawia z jednej strony, że czas ich istnienia od chwili powstania jest niezwykle krótki, z drugiej zaś, że mogą one reagować niemal z każdą cząsteczką, którą napotkają na drodze. Dla rodnika hydroksylowego głównym czynnikiem ograniczającym możliwości jego działania jest tzw. bariera dyfuzyjna, czyli dystans, który cząsteczka rodnika może przebyć od momentu powstania do jej destrukcji w wyniku reakcji z najbliższą napotkaną molekułą. Oznacza to, że antyoksydant niejako przeznaczony do unicestwienia utleniaacza ma stosunkowo niewielkie szanse, aby w sposób preferencyjny uprzędzić reakcję zachodzącą z udziałem rodnika i zapobiec ewentualnym uszkodzeniom powstałym przy jego udziale. Szybkość reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru prowadzącej do powstania anionorodnika nadtlenkowego, a także reakcji anionorodnika nadtlenkowego z tlenkiem azotu (NO) generującej nadtlenoazotyn, a także wielu innych reakcji prowadzących do powstawania rodników tlenowych jest o kilka rzędów wielkości większa od kinetyki reakcji anionorodnika nadtlenkowego i innych rodników z większością egzogennych antyoksydantów<sup>63</sup>. Czy zatem można przyjąć, że antyoksydanty nie mają szansy przeciwdziałania nadmiernym procesom endogennego utleniania? Wdrożone ostatnio metody fizykochemiczne pozwalające na detekcję rodników tlenowych i ich bezpośrednich produktów w chwili ich powstawania jednoznacznie wskazują, że tak nie jest. Badania doświadczalne bezpośrednio wskazują, że antyoksydanty mogą ograniczać endogenne procesy utleniania<sup>63</sup>.

Biorąc pod uwagę, że reakcja pomiędzy znacznikami spinowymi a ROS zachodzi w sposób stechiometryczny oraz że szacunkowe stacjonarne stężenie ROS w większości

tkanek wynosi od 10 pM (cytoplazma hepatocyta) do 10 nM (cytoplazma bakterii), można przyjąć, że stężenia tempola uzyskane w zastosowanym układzie doświadczalnym w zupełności wystarczą do skutecznego wylapywania ROS<sup>63,563-567</sup>. Stężenia tempola określane były w dotychczasowym piśmiennictwie jako znacznie niższe, a przyczyną tych niezgodności może być różnica czułości pomiaru. Należy podkreślić, że w warunkach niestandardowych lokalne stężenie rodników tlenowych może być znacznie, nawet o kilka rzędów wielkości wyższe. Podczas reperfuzji serca poddanego uprzednio globalnej ischemii opisywano tkankowe stężenia ROS na poziomie 0.1 – 1  $\mu\text{mol/l}$ <sup>565,568-571(400)</sup>. Jest ono porównywalne jedynie ze stężeniem tempola w tkankach osiąganym kilka minut po jednorazowej dawce dożylniej.

Reasumując, wielogodzinne utrzymywanie się tempola w krwiobiegu, przy jego znacznej zdolności penetracji błon biologicznych pozwala przypuszczać, że może on w tym samym czasie znacząco oddziaływać na reaktywne formy tlenu tworzone wewnątrzkomórkowo. Stąd też istnieją racjonalne przesłanki do jego stosowania w długotrwałych procedurach doświadczalnych.

## 5.4 Efekt hipotensyjny tempola

W różnorodnych układach eksperymentalnych tempol wywierał istotne działanie hipotensyjne, którego charakter zależał od dawki, czasu i sposobu podawania oraz odmiennych właściwości czynnościowych poszczególnych grup zwierząt.

Hipotensyjne efekt tempola został opisany wcześniej przez dwa renomowane zespoły naukowe u szczurów z nadciśnieniem tętniczym wywołanym zahamowaniem endogennej syntezy tlenku azotu i u szczepu SHR<sup>361</sup>, a także u zwierząt normotensyjnych: szczurów WKY<sup>356,361</sup> i świń miniaturowych<sup>360</sup>. Prace zespołu Wilcoxa<sup>356,362</sup> posłużyły niebawem do złożenia wniosku patentowego, zastrzegającego stosowanie tempola i jego pochodnych w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Zastosowana w tych badaniach, później niejednokrotnie cytowanych, metodyka doświadczalna wzbudza szereg wątpliwości, szczególnie odnoszących się do wpływu tempola na ciśnienie tętnicze u zwierząt normotensyjnych. Praca Hahna i wsp.<sup>360</sup> wykonana na świnia miniaturowych nie zawiera elementów analizy statystycznej, a zaprezentowany jako wzorcowy, kilkuminutowy gwałtowny spadek ciśnienia tętniczego po podaniu 0,14 – 0,17 milimolowych dawek tempola uzyskano u jednego zwierzęcia. Pomiaru ciśnienia tętniczego dokonywano metodą pośrednią na podudziu, co nie wyklucza, że faktycznie oceniano zmiany lokalnego ukrwienia kończyny. W ponad 300 własnych doświadczeniach wykonanych latach 1995 – 2006 na szczurach bez narkozy i w znieczuleniu ogólnym nigdy nie zarejestrowałem tak gwałtownego spadku ciśnienia tętniczego po podaniu tempola, jak przedstawiony w pracy Hahna<sup>360</sup>. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy nie potwierdzają natychmiastowej reakcji ciśnieniowej na podanie tempola. We wcześniejszych nieopublikowanych doświadczeniach o charakterze pilotowym, wykonanych w warunkach stresu pooperacyjnego obserwowałem istotne spadki ciśnienia tętniczego po dożylnym podaniu tempola, ale nawet wtedy nie miały one charakteru tak dynamicznego i trwały przez wiele minut. Jedną z przyczyn różnice może być czystość zastosowanego związku, powszechnie stosowane odczynniki dostępne komercyjnie zawierają jedynie 70 – 90% właściwej substancji i przed jej zastosowaniem należy odczynnik oczyścić, co nie jest podane przez komercyjnego dystrybutora. Schnackenberg i wsp. przeprowadzili doświadczenia na szczurach w narkozie wywołanej tiobarbitaliem<sup>356,361</sup>,

co wydaje się niefortunne w świetle wcześniejszych doniesień o generowaniu rodników tlenowych, w tym rodnika wodorotlenowego przez barbiturany<sup>572-574</sup>. Głęboka narkoza mogła ponadto skutecznie wytlumiać mechanizmy odruchowej regulacji ciśnienia tętniczego. Stąd też nie można wykluczyć, że opisane w obu pracach efekty hemodynamiczne tempola polegały przede wszystkim na ograniczaniu niepożądanych efektów oksydacyjnych tiobarbitalu, a nie na bezpośrednim działaniu na układ sercowo-naczyniowy. Do innych niedostatków należy zaliczyć niedopasowanie zwierząt pod względem wyjściowego ciśnienia tętniczego (MAP), którego średnia wartość w grupach zakwalifikowanych jako normotensyjne wynosiła od 96 do 121 mm Hg. Mimo braku analizy korelacji można odnieść wrażenie, że efekt hipotensyjny tempola występuje głównie, o ile nie wyłącznie, u zwierząt z podwyższonym ciśnieniem tętniczym. Wątpliwości wzbudzają również szacunkowe ustalanie dawki tempola przy podawaniu doustnym oraz metoda bezpośredniego pomiaru ciśnienia tętniczego za pośrednictwem drenu wprowadzonego do tętnicy szyjnej wewnętrznej, gdzie występują znaczne fluktuacje ciśnienia tętniczego związane z ruchami oddechowymi

W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach regularny efekt hipotensyjny jednorazowej dawki tempola uwidocznił się w znacznie większym stopniu u szczurów z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym genetycznie (SHR) i zależnym od zahamowania endogennej syntazy NO (LNR), niż u ich odpowiedników normotensyjnych (WKY) i był znaczący przy dawkach o dwa rzędy wielkości mniejszych (ryc. 21 oraz ryc. 53 vs. ryc.55), niż przy podawaniu przewlekłym. Czynnikiem determinującym te różnice nie była zasadniczo wyjściowa wysokość średniego ciśnienia tętniczego (MAP), o czym świadczy nieistotna zależność pomiędzy MAP a odpowiedzią ciśnieniową na tempol w grupie WKY i słaba zależność w grupach SHR i LNR. Wydaje się raczej, że odmienna charakterystyka ilościowa odpowiedzi ciśnieniowych na tempol wynikała ze zmienionych właściwości naczyń ukształtowanych przez nadciśnienie tętnicze, lub jego czynniki sprawcze działające na poziomie efektora. Zastanawiającym faktem jest, że przy przedłużonym podawaniu tempola profil odpowiedzi ciśnieniowych wygląda ilościowo odmiennie: po dwu- i trzytygodniowym podawaniu tempola znaczący efekt hipotensyjny zaobserwowano jedynie w grupie szczurów SHR. Analogicznie, po 40 dniach doustnego dawkowania tempola największą różnicę ciśnienia skurczowego pomiędzy zwierzętami, którym podawano tempol i ich kontrolą stwierdzono w grupie SHR. Efekt ten trudno jednak określić wprost jako hipotensyjny, bo tempol nie spowodował obniżenia SBP, a jedynie zapobiegł jego wzrostowi, który jest naturalnym zjawiskiem u szczurów w obserwowanym przedziale wiekowym. Podobny efekt prewencyjny, choć o mniejszym nasileniu obserwowano u szczurów WKY. Z kolei u szczurów z niedoborem NO wywoływanym podaniem L-NNA, zaznaczyło się istotne działanie hipotensyjne tempola, chociaż różnica między ciśnieniem skurczowym pomiędzy zwierzętami, którym podawano tempol i ich kontrolą była ponad dwukrotnie mniejsza niż w grupie SHR. Należy zaznaczyć, że w odróżnieniu od szczurów SHR i WKY w grupie kontrolnej LNR ciśnienie skurczowe nie wzrastało w okresie 6-tygodniowej obserwacji., stąd też bezpośredni efekt hipotensyjny był łatwo zauważalny. O ile po podaniu jednorazowych dożylnych dawek tempola we wszystkich grupach efektowi hipotensyjnemu towarzyszyło zwolnienie HR, i produktu podwójnego – PRP to przy podawaniu 14-, 21- i 42-dniowym efekt ten nadal występował u grupach WKY i SHR, natomiast u zwierząt LNR, którym podawano L-NNA zanotowano istotne przyspieszenie HR, przy niezmienionym PRP. Zwolnienie HR przy niezmienionym ciśnieniu tętniczym może być wynikiem bezpośredniego działania kardiodepresyjnego<sup>515</sup>, lub może być pochodną przesterowania na odruchów regulacyjnych, w tym odruchu z baroreceptorów tętniczych<sup>429,440,443,445,446</sup>. Dla

Wyjaśnienia podłoża odpowiedzi sercowej wykonano doświadczenia na izolowanych preparatach serc z zachowaną spontaniczną rytmiką pobudzeń, jak również serie eksperymentów *in vivo* ukierunkowanych na ocenę odruchowych czynników regulacji rytmu serca, co omówiono w dalszej części dyskusji. PRP jest wskaźnikiem pracy wykonanej przez serce w jednostce czasu i koreluje z jego zapotrzebowaniem energetycznym. Zmniejszenie PRP podczas przewlekłego stosowania tempola w grupie WKY i SHR jest potencjalnie korzystne, gdyż ogranicza prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń metabolicznych wywołanych jego niedokrwieniem. Brak wpływu tempola na PRP w grupie szczurów, u których przewlekłe hamowano syntezę NO istotnie tę grupę wyróżnia. Oznacza bowiem, że potencjalnie korzystne działanie hipotensyjne tempola nie idzie w parze ze zmniejszeniem zapotrzebowania energetycznego serca i wobec tego nie zmniejsza ryzyka wystąpienia powikłań niedokrwiennych. Testowane w pracy dwa modele nadciśnienia tętniczego reprezentują w założeniu złożone, ale odmienne mechanizmy patogenetyczne. U szczurów SHR istotnym czynnikiem wzrostu ciśnienia tętniczego jest nadmierna aktywacja komponenty współczulnej ośrodkowej regulacji krążenia, zaś model nadciśnienia tętniczego indukowany zahamowaniem endogennej syntazy NO koresponduje z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego. Trudno jest ocenić w jakim zakresie wyniki badań doświadczalnych uzyskanych z konkretnych modeli eksperymentalnych można przenieść na mechanizmy nadciśnienia tętniczego u człowieka, gdzie czynnikiem zaburzeń funkcji i struktury śródbłonna naczyniowego jest indukcja lokalnego odczynu zapalnego, w którym uczestniczą ROS. Wydaje się jednak, że przy niedostatecznej syntezie NO w śródbłonku naczyniowym, co jest podstawowym wykładnikiem jego dysfunkcji, kardioprotekcyjne korzyści ze stosowania antyoksydanta mogą być znacznie ograniczone. Zasadniczym czynnikiem eliminacji endogennego NO jest, jak wykazał przed ponad 20 lat temu Gryglewski i wsp.<sup>342</sup>, anionorodnik ponadtlenkowy. Przy zredukowanej generacji NO możliwości uwidocznienia efektu wyłączenia anionorodnika ponadtlenkowego są ograniczone, gdyż jego wyłączenie nie powoduje zwiększonej generacji NO, a jedynie nieco zwiększa czas przetrwania już wytworzonego NO. U szczurów WKY, a zwłaszcza SHR, u których biosynteza NO w śródbłonku naczyniowym jest nasiloną<sup>470-473</sup>, ograniczenie anionorodnika ponadtlenkowego stwarza szansę na pełne ujawnienie efektów metabolicznych NO, czego jednym z przejawów jest ograniczenie wydatku energetycznego<sup>308,575,576</sup>.

Częściowe wyłączenie mechanizmów wolnorodnikowych przez zastosowanie tempola przyczyniło się do zwiększenia podatności dużych pni tętniczych, czego wyrazem było zmniejszenie maksymalnej szybkości narastania ciśnienia w aorcie,  $+(dP/dt)_{max}$ , zmniejszenie szybkości spadku rozkurczowego ciśnienia w aorcie,  $-dP/dt$  oraz istotne zmniejszenie szybkości rozprzestrzeniania fali tętna ( $v$ ; ryc.54). Efekt tempola uwidocznił się w największym stopniu u szczurów SHR, gdzie wyjściowa podatność naczyń była najmniejsza. U szczurów LNR wpływ tempola był stosunkowo niewielki, chociaż również istotny. Zwraca uwagę fakt, że korzystny efekt tempola występował w zakresie umiarkowanych dawek. Pod koniec 20-minutowej infuzji dawek 0,2 oraz 2 mmol/kg tempol nie tylko nie zwiększał podatności dużych pni tętniczych, ale ją istotnie obniżał. Może to korespondować, z doniesieniami o prooksydacyjnym działaniu jego wysokich dawek<sup>545,547,577,578</sup>. Opisano, że pulsacyjny charakter zjawisk naczynioruchowych przyczynia się do ograniczenia wydatku energetycznego potrzebnego do przemieszczenia krwi z serca na do tkanek obwodowych<sup>579</sup>, zwiększa dynamikę reakcji łożyska naczyniowego w odpowiedzi na bodźce metaboliczne<sup>579</sup>, przeciwdziała ograniczeniu przepływu wywołanemu przez reakcję miogenną drobnych tętniczek na wzrost ciśnienia krwi<sup>580</sup>, zwiększa efektywność termoregulacji<sup>581</sup>. Badania doświadczalne wskazują, że podczas

wyrzutu krwi z serca podatność ścian aorty ulega cyklicznym zmianom, które są sprzężone z równoległymi zmianami naprężenia ściany lewej komory serca<sup>580,582</sup>. Sprężenie to pozwala na znaczną redukcję kosztów energetycznych wyrzutu krwi z serca. Przy zmniejszonej podatności dużych pni tętniczych i zwiększonej szybkości rozprzestrzeniania fali tętna w dużych tętnicach, fala ta po dotarciu do naczyń oporowych z dużym impetem się od nich odbija, po czym jeszcze w fazie wyrzutu krwi powraca do serca<sup>583</sup>. Oznacza to, że przy zmniejszonej podatności dużych pni tętniczych lewa komora serca musi pokonać dodatkowe obciążenie pod koniec podokresu wyrzutu krwi. Przyspieszenie i zwiększenie fali powrotnej tętna prowadzi do rozkojarzenia czynności mechanicznej serca z właściwościami sprężystymi aorty i skutkuje znacznie większym wzrostem zużycia tlenu przez serce, niż wynikałoby to jedynie ze zwiększenia ciśnieniowego lewej komory serca w czasie skurczu. Efekt całkowitego rozkojarzenia właściwości mechanicznych lewej komory serca ze zmianami sprężystości aorty udało się wywołać w stosunkowo krótkim czasie u królików karmionych dietą miazdżycogenną o dużej zawartości cholesterolu, sprzyjającą nadmiernej generacji ROS w ścianie aorty<sup>580</sup>. Wieloośrodkowe próby kliniczne, a także badania eksperymentalne wykazały, że zwiększona dynamika fali tętna jest niezależnym od ciśnienia skurczowego i rozkurczowego czynnikiem ryzyka, o istotnym niekorzystnym znaczeniu rokowniczym<sup>584-586</sup>. Zarejestrowany efekt umiarkowanych dawek tempola wydaje się w tym kontekście niezwykle istotny, ogranicza bowiem tzw. centralne ciśnienie tętnicze i przez to redukuje obciążenia ciśnieniowe serca<sup>583</sup>. W modelu dominującej dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, reprezentowanym przez przewlekłe podawanie inhibitora NOS to korzystne działanie tempola jest zaznaczone w wyraźnie mniejszym stopniu niż u szczepu SHR, bardziej odpowiadającemu nadciśnieniu samoistnemu u człowieka.

## 5.5. Efekty tempola w izolowanym układzie naczyń tętniczych

Ograniczenie przy użyciu tempola mechanizmów wolnorodnikowych wpływało na izolowany preparat tętnic krezkowych w sposób kompleksowy, obejmujący wpływ na napięcie mięśniówki gładkiej naczyń, wrażliwość na czynniki naczyniokurczące i rozkurczające mięśniówkę naczyniową oraz na odpowiedź naczyniokurczącą na stymulację elektryczną włókien nerwowych okołonaczyniowych. Testowany układ tętniczy naczyń krezkowych zawierał szeroki przekrój naczyń o średnicy od około 1 do poniżej 0,1 mm<sup>417</sup>. Podstawowym czynnikiem oporu naczyniowego, determinującym ciśnienie perfuzyjne (PP) było napięcie mięśniówki gładkiej dystalnych naczyń oporowych preparatu. Można zatem w uproszczeniu przyjąć, że preparat reprezentuje przede wszystkim naczynia typu oporowego, bogato unerwione o dużym zakresie regulacyjnym. Jakkolwiek w warunkach podstawowej perfuzji tempol nie wpływał znacząco na PP, to nieznaczny efekt wazodilacyjny, który ujawnił się w warunkach zwiększonego napięcia czynnego preparatów SHR i w mniejszym stopniu LNR, może wskazywać, że komponenta naczyniowa może mieć pewien udział w efekcie hipotensyjnym tempola u szczurów z nadciśnieniem tętniczym. Podstawowym zadaniem tempola było wymiatanie *ex iuvantibus* anionorodnika ponadtlenkowego, co limitowało tworzenie rodników wtórnych, w tym niezwykle destruktywnego rodnika wodorotlenowego (OH<sup>•</sup>) i ograniczało wewnątrznaczyniowe procesy utleniania. W warunkach *in vivo* przez naczynia krwionośne przepływa krew bogata w żelazo hemowe, które może być efektywnym substratem reakcji wolnorodnikowych typu Fentona, generujących rodnik wodorotlenowy. Płyn wieolektrolitowy perfundujący krezkę w założeniu nie zawierał jonów metali i dlatego

można było oczekiwać, że efekty tempola mogą być lepiej widoczne w eksperymentach *in vivo*, niż w doświadczeniach przeprowadzonych na preparatach perfundowanych płynem wieloelektrolitowym. Okazało się jednak, że wartości zmian PP pod wpływem tempola były proporcjonalne do zmian SBP zarejestrowanych w takich samych grupach (SHR:  $\Delta PP \approx -3$  mm Hg,  $\Delta SBP = -25$  mm Hg; LNR:  $\Delta PP \approx -1,5$  mm Hg,  $\Delta SBP = -11$  mm Hg). Preparaty układu tętniczego krezki wyizolowane ze szczurów z nadciśnieniem tętniczym, zarówno samoistnym (SHR), jak też indukowanym zahamowaniem syntazy NO wykazywały zwiększoną skłonność do skurczu. Świadczy o tym: zwiększona wrażliwość preparatów na stymulację elektryczną, czego wyrazem między innymi: przesunięcie w lewo krzywych napięcie-odpowieź, obniżenie progu pobudliwości i czasu latencji odpowiedzi na stymulację elektryczną, nasilone odpowiedzi naczyniokurczące na noradrenalinę i fenylefrynę, zmniejszona odpowiedź wazorelaksacyjna na egzogenną acetylocholinę oraz podwyższone w warunkach podstawowych napięcie czynne mięśniówki naczyń, czego przejawem była zwiększona odpowiedź wazorelaksacyjna na nitroprusydek sodowy. Pod wpływem tempola wrażliwość na stymulację elektryczną obniżyła się, o czym świadczy zmniejszenie odpowiedzi maksymalnej, przesunięcie w prawo krzywych napięcie-odpowieź, istotne podwyższenie progu pobudliwości na stymulację elektryczną, nieduże, ale istotne obniżenie odpowiedzi efektora na noradrenalinę i fenylefrynę. Wydawałoby się zatem, że ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych na poziomie naczyniowym może być dominującym mechanizmem jego działania hipotensyjnego. Szczegółowa analiza przebiegu rejestrowanych odpowiedzi naczyniokurczących ujawniła jednak, że w grupie SHR, w której efekty naczyniowe tempol były najbardziej zaznaczone, a także w mniejszym stopniu w grupie normotensyjnej WKY, tempol istotnie przedłużał czas odpowiedzi naczyniokurczących. Okazało się, że uśrednione obciążenie ciśnieniowe ściany naczyniowej po zadziałaniu bodźca naczyniokurczącego praktycznie nie zmniejszyło się pod wpływem tempola. Efekt ten może pośrednio wynikać z ochronnego działania tempola w stosunku do noradrenaliny uwolnionej z zakończeń nerwowych, na co może wskazywać nasilenie przez tempol uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego do płynu perfundującego układ tętniczek krezkowych podczas stymulacji elektrycznej (tab. 19). Przedstawione wyniki badań dowodzą jak istotne znaczenie praktyczne może mieć analiza odpowiedzi ciśnieniowych obejmująca całościowy ich przebieg. Okazało się bowiem, że korzystny wpływ tempola na wielkość odpowiedzi, oceniany przez przyrządy maksymalnej chwilowej zmiany ciśnienia nie musi odzwierciedlać rzeczywistego obciążenia ciśnieniowego ściany naczyniowej wywołanego przez czynnik sprawczy. Zwiększenie przez tempol odpowiedzi wazorelaksacyjnej na acetylocholinę, obserwowane zwłaszcza u szczurów SHR, jest efektem potencjalnie korzystnym, ale nie musi rekompensować niekorzystnego wpływu tempola na przebieg odpowiedzi naczyniokurczących na NE. Składają się na to przynajmniej dwie przyczyny. Po pierwsze, znaczenie acetylocholiny w regulacji napięcia mięśniówki tętniczek jest limitowane skąpym unerwieniem cholinergicznym większości tętniczek oporowych. Po drugie, efekt wazorelaksacyjny acetylocholiny w istotnej mierze zależy od stymulowanego przez nią uwalniania NO. Przy nadekspresji NOS (eNOS i iNOS), którą ujawniono u szczurów SHR<sup>445,446</sup> i wzmocnionym uwalnianiem NO indukowanym przede wszystkim przez tarcie przepływającej krwi pod zwiększonym ciśnieniem, zwiększenie wrażliwości efektora na acetylocholinę nie zapewnia znacznego dodatkowego potencjału do rozkurczu mięśniówki naczyniowej. Zasadniczym problemem nadciśnienia tętniczego nie jest najczęściej bezwzględna wartość chwilowa ciśnienie tętniczego ale w aspekcie długofalowym przebudowa ścian naczyń i serca oraz postępująca dysfunkcja śródbłonna naczyniowego indukowana podwyższonym ciśnieniem. Badania prowadzone przez Roacha i

Burtona<sup>587</sup> na materiale autopsyjnym wskazują na ogromną wytrzymałość niezmiennych dużych i średnich naczyń tętniczych na rozciąganie, dowodząc, że ich rozerwanie jest w warunkach prawidłowych w zasadzie nieprawdopodobne. W badaniach Roacha i Burtona dopiero po osiągnięciu ciśnienia wewnątrznaczyniowego 900 mm Hg dochodziło do pęknięcia tętnicy biodrowej w trakcie eksperymentu. W chwili obecnej trudno jest bezspornie powiedzieć, co w większym stopniu stymuluje remodeling w układzie krążenia przy tym samym średnim obciążeniu ciśnieniowym: nieduży, lecz stabilny wzrost ciśnienia, czemu najwyraźniej sprzyja tempol, czy też liczne krótkotrwałe jego wzrosty o większej amplitudzie. Doświadczenia kliniczne wskazują, że warunkiem nieodzownym rozwoju angiopatii nadciśnieniowej i przerostu serca nie są bardzo wysokie wartości ciśnienia tętniczego. Należy podkreślić, że wykazanie, że zastosowany antyoksydant może faktycznie nie zmniejszać obciążenia ciśnieniowego ściany naczyniowej było możliwe dzięki zastosowaniu rozszerzonej procedury rejestracji i analizy danych, która nie jest standardem eksperymentalnym w badaniach naczyniowych. Uzyskane wyniki wskazują, że zarejestrowanie efektu hipotensyjnego polegającego na zmniejszeniu amplitudy odpowiedzi ciśnieniowej na aminy katecholowe, lub nieznaczego obniżenie ciśnienia tętniczego w warunkach standardowych, nie gwarantuje, że sumaryczne obciążenie ciśnieniowe łożyska naczyniowego i serca uległo zmniejszeniu.

## 5.6. Wpływ tempola na serce izolowane

Przy analizie danych uzyskanych z rejestracji czynności serca *in vitro* należy uwzględnić charakterystyczne cechy czynnościowe zastosowanego modelu. W warunkach *in vivo* przepływ wieńcowy, spontaniczna częstość akcji serca i czynność mechaniczna serca w skurczu i rozkurczu są ściśle z sobą powiązane. Natomiast w sercu perfundowanym wstecznie w układzie Langendorffa niektóre z analizowanych zmiennych są od siebie *de facto* niezależne. Przepływ wieńcowy nie jest powiązany z objętością wyrzutową, a maksymalne ciśnienie rozwijane w komorze serca podczas skurczu nie zależy od obciążenia wstępnego (preload) ścian komór serca. Przedstawione wyniki badań wskazują, że 30-min globalna ischemia była dla preparatów serc izolowanych dramatycznym wyzwaniem, którego skutkiem były znaczące cechy upośledzenia czynności serca. Uniwersalnym efektem tempola we wszystkich grupach doświadczalnych było zwolnienie rytmu serca, co wskazuje, na jego bezpośredni efekt kardiodepresyjny. Po wznowieniu perfuzji po 30-min ischemii czynność skurczowa, reprezentowana przez PSP i PRP była w największym stopniu upośledzona w sercach wyizolowanych z grupy LNR, której wcześniej podawano inhibitor syntazy NO. Tempol podawany przez 3 tygodnie poprzedzające wyizolowanie serca znacząco poprawił czynność skurczową serca podczas reperfuzji w grupie LNR, z deficytem NO, czego nie stwierdzono w grupach WKY i SHR. W grupie SHR wywołał trwały efekt chronotropowy ujemny, który jak wyniki z poprzednich doświadczeń sprzyja wystąpieniu zaburzeń rytmu<sup>588</sup>. Wyniki badań sugerują, że wpływ tempola na powrót czynności serca po ischemii może zależeć od dostępności NO. Przy jego niedoborze tempol zapobiega utrwałonej dysfunkcji skurczowej, przy nadmiarze, opisanym u szczurów SHR<sup>467,470,471,473</sup> dominuje efekt przeciwny. Po ischemii podatność ścian lewej komory we wszystkich sercach uległa dramatycznemu zmniejszeniu, na co wskazuje gwałtowny wzrost ciśnienia końcowo-rozkurczowego (EDP). W trakcie reperfuzji EDP stopniowo obniżało się, ale w grupie SHR ten korzystny trend uległ po 10 min zahamowaniu. Uzyskane wyniki korespondują z doniesieniami o zwiększonej wrażliwości szczurów SHR na niedotlenienie serca<sup>589-592</sup>,



drugiej zaś wskazują na brak protekcji czynności skurczowej w tej grupie przy zastosowaniu wmiatacza rodników tlenowych. We wszystkich grupach w sercach wyizolowanych od szczurów, którym uprzednio podawano tempol dynamika powrotu EDP była szybsza, co wskazuje, że ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych wywiera korzystny wpływ na czynność serca poddanego ischemii, niezależnie od podaży NO. Wpływ tempola na EDP nie korelował z innym wykładnikiem czynności rozkurczowej –  $(-dP/dt)_{max}$ , maksymalną szybkością spadku ciśnienia w lewej komorze podczas rozkurczu. Jakkolwiek EDP i  $(-dP/dt)_{max}$  korelują ze sobą, to w sercu izolowanym EDP zależy przede wszystkim od właściwości fizycznych ściany komory, a zwłaszcza jej podatności, natomiast największy chwilowy spadek ciśnienia w rozkurczu  $(-dP/dt)_{max}$  jest pochodną chwilowego statusu energetycznego komórki, której jednym z przejawów jest aktywność ATP-azy transportującej jony  $Ca^{2+}$  do siateczki śródplazmatycznej. W obydwu grupach nadciśnieniowych, a w szczególności w grupie LNR, tempol istotnie zwiększał dynamikę powrotu  $(-dP/dt)_{max}$  do wartości wyjściowych podczas reperfuzji. Podobny kierunek działania tempola w sercach SHR - o wysokim uwalnianiu  $NO^{467,470,471,473}$  i SHR - z niedoborem NO sugeruje, że NO nie jest zasadniczym czynnikiem powrotu czynności rozkurczowej po ischemii. W odrębnych cyklach doświadczeń grupa LNR demonstrowała najwyższe wartości ciśnienia tętniczego (ryc. 21a, 53, 55). Stąd też protekcyjny wpływ tempola na czynność izolowanego serca poddanego ischemii i reperfuzji, najwyraźniej zaznaczony u szczurów z niedoborem NO, może się dobrze przekładać na warunki *in vivo*, zwiększonego obciążenia następczego lewej komory. Trudno jest natomiast wyrokować, czy u szczurów SHR redukcja PRP po ischemii serca, związana niewątpliwie ze zmniejszonym wydatkiem energetycznym, jest w wymiarze długofalowym korzystna, gdyż wiąże się ze znacznym zwolnieniem rytmu serca, sprzyjającym wystąpieniu zaburzeń jego rytmu.

## 5.7. Regulacyjne aspekty supresji ROS przy użyciu tempola

Jednym z podstawowych ogniw w łańcuchu powiązań czynnościowych regulujących układ krążenia są odruchy z chemoreceptorów tętnicznych i chemodetektorów OUN. Przyjmuje się, że hipoksja powoduje pobudzenie przede wszystkim chemoreceptorów obwodowych, zaś hiperkapnia - ośrodkowych. Niedawne badania ujawniły, że kluczowym elementem aktywacji chemoreceptorów obwodowych są ROS, które powstają w wyniku niepełnej redukcji jego podstawowej formy  $O_2$ . Stąd sugestia, że możliwość wyłączenia ROS poprzez zastosowanie skutecznych antyoksydantów może spowodować przesunięcie równowagi regulacyjnej w sposób charakterystyczny dla niedoboru tlenu. Zmniejszone oddziaływanie ROS na chemoreceptory może hipotetycznie spowodować zwiększenie ich aktywności w sposób odpowiadający hipoksji, czyli powodujący wzrost aktywności układu współczulnego i spadek aktywności układu przywspółczulnego. Wiadomo, że zwiększenie udziału komponenty współczulnej regulacji rytmu serca jest niezależnym czynnikiem wystąpienia nagłego incydentu sercowego i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nagłego zgonu. Ujawnienie dyskretnych przesunięć w autonomicznej regulacji serca umożliwia analiza zmienności rytmu serca (HRV), która dotychczas nie była wykorzystywana w znaczącym stopniu w ocenie działania antyoksydantów. Nadal nie rozstrzygnięto, dlaczego w grupie pacjentów przyjmującej witaminę E w ramach badania CHAOS istotne zmniejszenie ryzyka zawału mięśnia sercowego wiązało się z aż 18% wzrostem ryzyka nagłego zgonu<sup>369</sup>. Można spekulatywnie założyć, że

zwiększona śmiertelność mogła być pochodną zwiększonej aktywności dosercowych włókien współczulnych, co mogło inicjować krytyczne zaburzenia rytmu serca.

Liczne badania doświadczalne ujawniły obecność ROS i NO praktycznie we wszystkich regionach ośrodkowego układu nerwowego związanych z regulacją krążenia, w tym w okolicach neuronów o działaniu pobudzającym i hamującym<sup>593,594</sup>. Wypadkowy efekt supresji ROS lub NO jest w złożonym układzie wzajemnych powiązań trudny do przewidzenia. W hierarchicznym układzie odruchowej regulacji krążenia odruch z chemoreceptorów tętnicznych wywiera wpływ hamujący na odruch z baroreceptorów tętnicznych. To dlatego nadmierna aktywacja odruchu z chemoreceptorów, obserwowana u szczurów SHR wiąże się z dysfunkcją odpowiedzi na wzrost ciśnienia tętniczego zachodzącej przy udziale baroreceptorów. W doświadczeniach wykonanych w ramach Procedury. 3.2.2.6 obserwowano dwie odmienne odpowiedzi układu krążenia: na hipoksję wywołaną obniżeniem ciśnienia atmosferycznego i na szybkie przywrócenie prawidłowego ciśnienia atmosferycznego – reoksygenację. Interesującym spostrzeżeniem jest znacznie większe nasilenie odpowiedzi na reoksygenację w stosunku do obserwowanych podczas hipoksji, co szczególnie było widoczne u szczurów, które otrzymywały inhibitor NOS – L-NNA. Dotychczas nie oceniano wpływu tempola na HRV. Wcześniejsze badania własne wskazują, że różne antyoksydanty: kwas askorbinowy, histydyna, troloks mogą w odmienny sposób wpływać na autonomiczną regulację serca, w sposób zależny od dawki<sup>595,596</sup>. Po przekroczeniu dawki krytycznej ujawniał się niekorzystny wpływ antyoksydantów przejawiający się zwiększeniem udziału komponenty współczulnej w autonomicznej regulacji rytmu serca<sup>595,596</sup>. Charakterystyczną odpowiedzią indukowaną przez hipoksję u szczurów WKY i w mniejszym stopniu SHR było ograniczenie wpływu autonomicznej regulacji na serce, o czym świadczy redukcja całkowitej mocy widma HRV (TP) i jego składowych (VLF, LF i HF) oraz wykładników HRV w domenie czasowej – rMSSD, SD1 i SD2. Tempol znosił supresję TP podczas hipoksji i zwiększał wpływ regulacji autonomicznej podczas reoksygenacji, co jest efektem potencjalnie korzystnym, zwiększającym możliwości regulacyjne ustroju. Przy wzorcu odpowiedzi hemodynamicznej u szczurów, polegającej na wzroście ciśnienia tętniczego z towarzyszącym zwolnieniem HR, efekt tempola oznacza działanie tłumiące naturalną odpowiedź odruchową na hipoksję. Jakkolwiek u szczurów SHR nie wiązało się to z redukcją przyrostu ciśnienia tętniczego, to obniżenie wskaźnika LF/HF w tej grupie sugeruje zmniejszenie udziału komponenty współczulnej odpowiedzi na hipoksję i reoksygenację. U ich odpowiedników normotensyjnych – WKY profil regulacyjny tempola był jakościowo odmienny: podczas hipoksji i reoksygenacji zwiększał się wpływ układu współczulnego na serce, przy redukcji odpowiedzi ciśnieniowej i sercowej ( $\Delta$ HR). Przy zahamowaniu endogennej syntezy NO skutki regulacyjne ograniczenia ROS, przy użyciu drobnocząsteczkowego ich wymiatacza, są odmiennie. Obserwowano wygórowane odpowiedzi ciśnieniowe i sercowe, czego tłem było zwiększenie udziału składowej współczulnej w regulacji serca podczas hipoksji i ograniczenie jej udziału przy reoksygenacji. Przy zwiększeniu TP – całkowitej mocy widma HRV, podczas hipoksji obserwowano zmniejszenie rMSSD, SD1 i HF, co wskazuje, że u szczurów z niedoborem NO tempol ograniczył odruchowe pobudzenie eferentnych włókien nerwu błędnego w odpowiedzi na hipoksję lub/i wywołany przez nią wzrost ciśnienia tętniczego. Na efekt tempola składają się najpewniej dwa mechanizmy. Doświadczenia przeprowadzone na szczurach z nadciśnieniem tętniczym sodo-zależnym wywołanym podawaniem deoksykortykosteronu (*DOCA-salt hypertension*) ujawniły, że efekt hipotensyjny tempola zależy jedynie w ograniczonym stopniu od funkcji śródbłonna naczyniowego oraz że jest w znacznej mierze niezależny od stresu oksydacyjnego<sup>597,598</sup>. Kolejne badania przeprowadzone na

poziomie molekularnym wykazały, że tempol, w przeciwieństwie do L-NNA aktywuje kanały potasowe zależne od wapnia ( $BK_{Ca^{2+}}$ ), co promuje hiperpolaryzację komórki i hamuje powolną spoczynkową depolaryzację, prowadząc do zwolnienia rytmu serca<sup>599</sup>. Mogłoby to odpowiadać za zwolnienie HR obserwowane w sercach wyziolowanych od szczurów, którym uprzednio podawano tempol (Procedura 3.2.2.2). Jednakże u szczurów, którym przewlekłe podawano L-NNA zdolność tempola do aktywowania kanałów  $BK_{Ca^{2+}}$  jest ograniczona, gdyż jak niedawno wykazali Bratz i wsp.<sup>448</sup> ekspresja tych kanałów jest wybitnie upośledzona przy zahamowaniu NOS. Tempol, który penetruje barierę krew-mózg<sup>600</sup>, zwiększa biodostępność NO, co może przyczyniać się do zmniejszenia względnego udziału napędu komponenty współczulnej autonomicznej regulacji czynności serca. Zestawiając mechanizmy działania tempola na poziomie efektora, z jego potencjalnym wpływem na aktywność neuronów centralnych ośrodków regulacyjnych, wydaje że profil obserwowanych odpowiedzi przemawia za dominującym działaniem na poziomie efektora.

Analiza sekwencji zmian ciśnienia tętniczego i HR wskazuje, że tempol w istotnym stopniu moduluje odruch z baroreceptorów tętniczych, ale wyraz tego działania nie jest jednoznaczny. Zwiększenie czułości odruchu (BRS) na wzrost ciśnienia tętniczego, obserwowane zwłaszcza w grupach WKY i SHR sprzyja szybkiemu wyrównywaniu wzrostów ciśnienia tętniczego, jest więc potencjalnie korzystne. Zmniejszenie częstości sekwencji nastawczych wzrostu ciśnienia tętniczego i zwiększenie przesunięcia fazowego tych sekwencji zmniejsza szansę na jego samoistny wzrost. Niestety u szczurów WKY i SHR pod wpływem tempola częstość spontanicznych sekwencji prowadzących odruchowego obniżenia ciśnienia tętniczego zmniejszyła się, przy zmniejszeniu wydajności (BEI), a ponadto zwiększyło się przesunięcie w fazie reakcji odruchowej, co świadczy o mniejszej stabilności odruchu. Zmniejszenie wrażliwości odruchu w odpowiedziach sercowych inicjowanych spadkiem ciśnienia tętniczego, co było widoczne szczególnie u szczurów SHR, a także zmniejszenie częstości tych sekwencji, sprzyja w tej grupie zwierząt obniżeniu ciśnienia tętniczego. W obrazie całościowym wpływu tempola na autogenne sekwencje wyrównujące ciśnienie tętnicze u szczurów z nadciśnieniem samoistnym szczepu SHR należy podkreślić zmniejszenie częstości zarówno wzrostów, jak i spadków ciśnienia tętniczego, co przemawia za ograniczeniem odruchowej kontroli ciśnienia tętniczego przy udziale baroreceptorów tętniczych. Wczesniejsze doniesienia z piśmiennictwa dotyczące wpływu tempola na odruch z baroreceptorów tętniczych oparte są jedynie na eksperymentach wykonanych w narkozie, przy dokomorowym podawaniu tempola i angiotensyny II. Wyniki tych badań wskazują, że działając na neurony dogłowego brzuszno-bocznego obszaru rdzenia przedłużonego (RVLM) tempol hamuje odśrodkowy napęd współczulny indukowany miejscową mikroiniekcją angiotensyny II<sup>601</sup>, a także stresem środowiskowym<sup>602</sup> oraz że efekt ten nasila inhibitor NOS: L-NAME, który samodzielnie nie wywiera wpływu na obwodową impulację współczulną<sup>602</sup>. Wyniki bieżących badań wskazują, że przy przewlekłym zahamowaniu NOS tempol zwiększa wrażliwość odruchowej odpowiedzi sercowej (BRS) inicjowanej zarówno wzrostem, jak i spadkiem ciśnienia tętniczego, zwiększając także częstość sekwencji nastawczych i regulacyjnych, skracając opóźnienie sekwencji sercowych o typie regulacyjnym w stosunku do ciśnieniowych, co ułatwia stabilizację ciśnienia tętniczego wokół wartości zadanej. Problem jawi się w tym, że tempol u szczurów LNR tempol wyraźnie zwiększał przesunięcie fazowe sekwencji nastawczych, co może przyczyniać się do destabilizacji ciśnienia tętniczego wskutek błędnego rozpoznawania wzorca nastawczego.

## 5.8. Wpływ tempola na wydolność fizyczną i przemiany energetyczne

Organizmy zarówno wyższe, jak też *Procaryota* wykształciły w odpowiedzi na stres oksydacyjny szereg mechanizmów aktywujących endogenne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej<sup>63,107,314</sup>. Przykładowo, intensywny wysiłek fizyczny powoduje z jednej strony uszkodzenia DNA<sup>402</sup> i utlenianie lipidów i białek<sup>603</sup>, z drugiej zaś pobudza mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, w tym wzrost aktywności SOD, katalazy, peroksydazy glutationu, a także indukuje przebudowę mięśnia i zwiększenie ekspresji jego białek kurczliwych<sup>604,605</sup>. Stres oksydacyjny jest warunkiem *sine qua non* poprawy wydolności fizycznej w wyniku treningu fizycznego.

Podczas intensywnego wysiłku fizycznego występują warunki do ujawnienia stresu oksydacyjnego, korespondujące z występującymi w trakcie rozwoju nadciśnienia tętniczego. Wydawać by się zatem mogło, że ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym o wysokiej aktywności fizycznej mogłoby przynieść szczególne korzyści. Po sześciotygodniowym treningu biegowym o wysokiej intensywności we wszystkich grupach stwierdzono nieznaczne obniżenie SBP i PRP, co odpowiadało założeniom wstępnym, natomiast efekty hemodynamiczne tempola były zróżnicowane. U trenowanych szczurów WKY i SHR tempol wykazał działanie hipotensyjne, co przy braku wpływu na HR, spowodowało również zmniejszenie PRP. Natomiast trenowane szczury LNR zareagowały na tempol utrzymującym się wzrostem SBP, przyspieszeniem HR i dramatycznym zwiększeniem PRP. Zatem przy zahamowaniu syntazy NO, co mogło imitować dysfunkcję śródbłonna naczyniowego, zastosowanie antyoksydanta wywołało działanie w istocie niekorzystne. Pośrednim tego potwierdzeniem jest zwiększona śmiertelność szczurów w tej grupie, brak przyrostu masy ciała oraz zahamowanie wzrostu wydolności fizycznej (EC) charakterystyczne dla przyjętego wzorca treningu biegowego. Podczas intensywnego wysiłku zużycie tlenu przez pracujące mięśnie wzrasta nawet kilkudziesięciokrotnie, co przy zwiększonym odsetku niepełnej redukcji tlenu w mitochondriach, może przyczyniać się do ponad stukrotnego zwiększenia generacji ROS. Przy dostępności NO nadmiar powstających rodników jest szybko eliminowany z wytworzeniem azotynów i azotanów jako produktów końcowych. Można domniemywać, że przy niedoborze NO, zwiększenie przez wysiłek i tak już zwiększonego wytwarzania ROS w przebiegu nadciśnienia tętniczego, nie jest kompensowane i dochodzi do niekorzystnego nasilenia endogennych procesów utleniania.

Wyniki badań wskazują, że efektem sześciotygodniowego treningu biegowego szczurów było zwiększenie gęstości tkankowej mitochondriów w sercu i reprezentatywnym mięśni szkieletowym – mięśni brzuchatym łydki. Dane z piśmiennictwa wskazywały, że czynnikiem limitującym wydolność fizyczną i korzystne efekty metaboliczne wysiłku fizycznego u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym są wytwarzane z nadmiarze ROS<sup>606,607</sup> oraz że ich przynajmniej częściowe wyłączenie może przyczynić się poprawy wydolności<sup>608</sup>. Tempol nieznacznie zwiększył gęstość tkankową mitochondriów w sercu i mięśni szkieletowym u szczurów kontrolnych szczurów nietrenowanych WKY, a także w mięśni szkieletowym szczurów SHR, natomiast u szczurów trenowanych jedynie w mięśniach szkieletowych grupy SHR tempol nieznacznie ją zwiększył, ale nie był to efekt addytywny. U szczurów, które otrzymywały inhibitor NOS efekt tempola był niekorzystny: w sercu u szczurów trenowanych oraz w mięśniach szczurów nietrenowanych i trenowanych pod wpływem tempola gęstość tkankowa mitochondriów ulegała wyraźnej redukcji. Istotnym mechanizmem, który może uniemożliwiać ujawnienie

korzystnego wpływu tempola u szczurów z niedoborem NO jest opisywane zmniejszenie ekspresji kanałów błonowych typu  $BK_{Ca^{2+}}$ , do które tempol otwiera. Zmniejszenie ekspresji tych kanałów w mięśniówce naczyniowej uniemożliwia ujawnienie efektu wazodilatacyjnego tempola<sup>448</sup>. Nadtlenek wodoru wytwarzany w reakcji tempola z generowanym miejscowo anionorodnikiem ponadtlenkowym może zamiast rozkurczania mięśniówki gładkiej naczyń<sup>280</sup> promować jej skurcz<sup>280,320,322</sup>. To zaś utrudnia dostarczenie tlenu do pracujących mięśni, a także serca. W rezultacie dochodzi do redukcji mitochondriów w tkance. U szczurów SHR, u których opisano kompensacyjną nadekspresję NOS<sup>445,609-611</sup>, podanie tempola zwiększa i tak już wysoką biodostępność NO, przez co przepływ krwi podczas wysiłku wzrasta. Zwiększony dopływ tlenu do tkanki może zaindukować zwiększenie gęstości mitochondriów. Przy zapewnieniu odpowiedniego dopływu krwi do pracujących mięśni trening typu wytrzymałościowego z reguły prowadzi do zwiększenia aktywności enzymatycznej mitochondriów<sup>612,613</sup>, a jedynie wysiłki skrajnie wyczerpujące wywierają efekt odwrotny<sup>614</sup> najprawdopodobniej wskutek destrukcyjnego działania stresu oksydacyjnego. Porównanie gęstości tkankowej mitochondriów wyznaczonej przez pomiar aktywności syntazy cytrynianowej (AMTD<sub>CS</sub>) i oksydazy cytochromu c (AMTD<sub>COX</sub>) ujawniło różnice w wynikach niektórych oznaczeń. W grupach: WKY nietrenowanej, która otrzymywała tempol (WKYs-T) oraz grupach trenowanych SHRtr-T – otrzymującej tempol, oraz LNR, której podawano (LNRtr-T) lub nie podawano tempol (LNRtr-C) AMTD<sub>COX</sub> była o ponad 25% niższa od AMTD<sub>CS</sub>. Przy znanej wrażliwości COX na destrukcyjne działanie oksydantów, może to sugerować zwiększone narażenie tych grup na stres oksydacyjny. Niedawno wykazałem, że tempol przyczynia się do oksydacyjnego uszkodzenia DNA limfocytów szczura oraz że nie zapobiega takim uszkodzeniom indukowanym przez submaksymalny jednorazowy wysiłek<sup>402</sup>. Jedynie u szczurów WKY pod wpływem treningu zaznaczyła się poprawa NAD-zależnej kontroli oddechowej (RCI, substraty oddechowe: pirogronian, i jabłczan) mitochondriów sercowych, przy czym tempol efekt ten dodatkowo wzmocnił. Brak korzystnego wpływu treningu i tempola na oddychanie mitochondriów sercowych u szczurów z nadciśnieniem tętniczym: SHR i LNR sugeruje, że czynnikiem limitującym może być przeciążenie ciśnieniowe lewej komory serca i że ograniczenie lokalnych mechanizmów wolnorodnikowych nie ma w tym przypadku zasadniczego znaczenia. U szczurów SHR i ich odpowiedników normotensyjnych WKY trening biegowy poprawił NAD-zależną kontrolę oddechową (RCI) mitochondriów mięśnia brzuchatego łydki, przy czym tempol efekt ten istotnie nasilił. Jednym z objawów towarzyszących rozwojowi nadciśnienia tętniczego jest obniżona tolerancja wysiłku i zwiększona męczliwość związana ze zmniejszającą się gęstością naczyń mikrokrążenia mięśniowego. Skłania to do ograniczenia aktywności fizycznej, co z kolei powoduje dalszą redukcję lokalnego mikrokrążenia. Poprawa oddychania komórkowego przez trening lub zastosowanie antyoksydanta stwarza szansę na przełamanie tego błędnego koła. Przy niskim wytwarzaniu endogenego NO, wskutek dysfunkcji śródbłonna naczyniowego lub zahamowania NOS przez jej inhibitory, intensywny trening połączony z zastosowaniem antyoksydanta wydaje się być zupełnie nieskuteczny, o czym świadczy pogorszenie kontroli oddechowej w grupie LNR.

## 5.9. Podsumowanie ważniejszych wyników badań

1. Tempol utrzymuje się w krwiobiegu i niektórych tkankach obwodowych przez wiele godzin po podaniu pojedynczej dawki, co umożliwia jego stosowanie przewlekle przy doustnym sposobie podawania.
2. Charakterystyka czynnościowa szczurów SHR z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanym samoistnie i LNR – indukowanym podawaniem inhibitora syntazy tlenu azotu (NOS) wykazuje znaczne rozbieżności w zakresie właściwości czynnościowych naczyń tętniczych i serca, ośrodkowej regulacji częstości akcji serca oraz podatności na działanie tempola.
3. Po jednorazowym podaniu tempol w sposób zależny od dawki obniżał ciśnienie tętnicze z towarzyszącym zwolnieniem rytmu serca u szczurów normotensyjnych WKY i u szczurów z nadciśnieniem tętniczym uwarunkowanych genetycznie (SHR) i wywołanym przez zahamowanie syntazy NO, natomiast przy podawaniu przewlekle obniżenie ciśnienia tętniczego było widoczne jedynie w grupie szczurów z niedoborem NO, podczas gdy u szczurów WKY i SHR tempol zapobiegał zależnemu od wieku naturalnemu wzrostowi ciśnienia tętniczego.
4. Tempol istotnie zwiększał podatność dużych pni tętniczych, przyczyniając się do redukcji obciążenia następczego lewej komory serca.
5. Wyniki doświadczeń *in vivo* i wykonanych na izolowanych preparatach serc wskazują, że u szczurów SHR i WKY długotrwałe podawanie tempola wiąże się ze zwolnieniem rytmu i zmniejszeniem dynamiki skurczu serca. Serca wyizolowane od szczurów SHR wykazywały większą podatność na uszkodzenie czynnościowe wywołane ischemią i reperfuzyją niż serca grup LNR, z deficytem endogennego NO. Tempol korzystnie wpłynął na powrót czynności rozkurczowej serca po ischemii oraz ułatwiał powrót czynności skurczowej serc wyizolowanych ze szczurów LNR, którym uprzednio przewlekle podawano inhibitor NOS.
6. Tempol w wielokierunkowy sposób wpływał na napięcie mięśniówki gładkiej małych i średnich naczyń tętniczych, reprezentowanych przez izolowany preparat naczyniowy krezki. Bezpośredni wpływ na mięśniówkę gładką, przejawiający nieznacznym obniżeniem jej napięcia zaobserwowano jedynie warunkach zwiększonego jej napięcia na drodze neurogennej, w preparatach wyizolowanych od szczurów z nadciśnieniem tętniczym. Tempol zwiększał całkowity potencjał relaksacyjny naczyń tętniczych, jak również odpowiedzi rozkurczowe mięśniówki zależne od śródbłonna naczyniowego. W dawce do 100  $\mu\text{mol/kg}$  tempol podnosił próg pobudliwości i zmniejszał amplitudę odpowiedzi naczyniokurczących na stymulację elektryczną, a także zmniejszał odpowiedzi naczyniowe na egzogenne aminy katecholowe: noradrenalinę i fenylefrynę. Wymienione wyżej efekty tempola, sprzyjające obniżeniu napięcia mięśniówki naczyniowej, były w najwyraźniej widoczne w preparatach krezki wyizolowanych od szczurów z nadciśnieniem tętniczym samoistnym (SHR), słabiej – u ich odpowiedników normotensyjnych WKY, zaś najslabiej - w grupie szczurów z niedoborem NO.
7. Czynnikiem, który w grupach WKY i SHR mógł znosić lub nawet odwracać, korzystny wpływ tempola polegający na ograniczeniu amplitudy odpowiedzi naczyniokurczących, było znaczne wydłużenie czasu odpowiedzi, co prowadziło *de facto*

- do zwiększenia sumarycznego obciążenia ciśnieniowego ściany naczyniowej podczas każdej odpowiedzi na czynnik naczyniokurczący.
8. W warunkach podstawowych perfuzji preparatów krezki płynem wieloelektrolitowym, które wyizolowano od szczurów uprzednio otrzymujących tempol, uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego do płynu perfuzyjnego było istotnie ograniczone. Wcześniejsze podawanie tempola sprzyjało ograniczeniu wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego po ischemii, co mogło zmniejszać stres oksydacyjny, aczkolwiek efekt ten występował w stosunkowo wąskim zakresie stosowanych dawek. We wszystkich preparatach krezki tempol w sposób zależny od wcześniej stosowanych dawek, ograniczał w znaczącym stopniu wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego podczas stymulacji elektrycznej włókien okołonaczyniowych. Efekt ten może mieć istotne znaczenie w nadciśnieniu tętniczym samoistnym, bądź uwarunkowanym przede wszystkim dysfunkcją śródbłonna naczyniowego ze zmniejszonym uwalnianiem NO. W obydwu modelach nadciśnienia tętniczego dochodzi do zwiększonego uwalniania amin katecholowych z lokalnych zakończeń nerwowych oraz do nasilonej generacji ROS, dlatego działanie tempola, ograniczające lokalny stres oksydacyjny może mieć istotne znaczenie w przełamaniu błędnego koła czynników promujących nadciśnienie tętnicze.
  9. Odpowiedzią na hipoksję wywołaną obniżeniem ciśnienia atmosferycznego o 100 do 200 mm Hg był wzrost ciśnienia tętniczego z towarzyszącym zwolnieniem akcji serca. Szybkie przywrócenie prawidłowego ciśnienia atmosferycznego (reoksygenacja) wyzwalalo ponowną odpowiedź krążeniową o kierunku odpowiadającym obserwowanemu podczas hipoksji, ale o większym nasileniu. Odpowiedź sercowa na reoksygenację była szczególnie zaznaczona w grupie szczurów LNR, którym podawano L-nitroargininę (L-NNA). U szczurów szczepu SHR odpowiedzi na hipoksję i reoksygenację były stosunkowo niewielkie. Analiza HRV wskazuje, że u szczurów SHR i ich odpowiedników normotensyjnych WKY podczas hipoksji zmniejsza się wpływ regulacji autonomicznej na czynność serca. Obie grupy szczurów nadciśnieniowych; SHR i LNR wykazywały w warunkach spoczynkowych, a także podczas hipoksji i reoksygenacji zwiększony udział komponenty współczulnej w autonomicznej regulacji rytmu serca. Podczas hipoksji tempol zmniejszał udział tej komponenty w grupie SHR, co jest efektem potencjalnie korzystnym, zaś u szczurów z niedoborem NO tempol zwiększał rolę komponenty współczulnej w regulacji czynności serca.
  10. Szczegółowa analiza odruchu z baroreceptorów tętniczych oparta na ocenie samoistnych sekwencji zmian ciśnienia tętniczego i częstości akcji serca ujawniła, że zahamowanie wytwarzania ROS przez zastosowanie drobnocząsteczkowego antyoksydanta wpływa w sposób wielokierunkowy na ten odruch. Pod wpływem tempola zmieniła się częstość odruchowych sekwencji regulacyjnych i ich wydajność, częstość sekwencji nastawczych, wrażliwość odruchu oceniana stopniem jego wzmocnienia, a także przesunięcie fazowe między sekwencjami zmiany HR i ciśnienia tętniczego. U szczurów SHR zwiększenie wrażliwości odruchu (BRS) na wzrost ciśnienia tętniczego i zmniejszenie BRS w sekwencjach jego spadku może ułatwiać przywracanie jego prawidłowych wartości. Z drugiej jednak strony tempol ograniczał wpływ układu autonomicznego na serce i destabilizował odruch – o czym świadaczy zwiększenie przesunięcia fazowego, co może całkowicie niwelować jego korzystny wpływ na BRS. U szczurów z niedoborem NO tempol zwiększał częstość

sekwencji sercowych i ciśnieniowych, zwiększał BRS odpowiedzi sercowych na wzrost i spadek ciśnienia tętniczego BRS, a także skracał przesunięcie fazowe między regulacyjnymi sekwencjami sercowymi i sekwencjami ciśnieniowymi. Profil działania tempola u szczurów LNR sprzyja zatem stabilizacji ciśnienia tętniczego wokół wartości zadanej (*set point*). Zwiększenie przesunięcia fazowego sekwencji nastawczych może jednak ten potencjalnie korzystny efekt zniweczyć, gdyż może utrudnić rozpoznanie przez układ regulacyjny zadanej wartości nastawczej.

11. Sześciotygodniowy trening biegowy o wysokiej intensywności nie wpłynął znacząco na ciśnienie tętnicze w grupie SHR i u ich odpowiedników normotensyjnych WKY, natomiast przyczynił się do istotnej redukcji ciśnienia tętniczego w grupie szczurów, której przewlekłe podawano inhibitor syntazy NO. Skojarzenie treningu fizycznego o wysokiej intensywności z podawaniem tempola u szczurów z niedoborem NO wywołało efekt wyraźnie niekorzystny, prowadząc do wzrostu i tak już podwyższonego ciśnienia tętniczego. U szczurów WKY i SHR, których nie obciążono treningiem biegowym podczas przewlekłego podawania tempola obserwowano zmniejszenie produktu podwójnego (PRP), będącego wyznacznikiem zapotrzebowania energetycznego serca. W obu grupach trenowanych PRP odpowiadał w przybliżeniu wartościom właściwym dla odpowiednich grup nietrenowanych, którym podawano tempol. Tempol nie wpływał istotnie na zapotrzebowanie energetyczne serc szczurów trenowanych WKY i SHR, natomiast znacząco zwiększał to zapotrzebowanie w grupie, której podawano inhibitor syntazy NO. U szczurów nietrenowanych z indukowanym niedoborem NO tempol nie wywierał wpływu na PRP, gdyż jego efekt hipotensyjny był kompensowany przyspieszeniem rytmu serca.
12. Intensywny trening typu wytrzymałościowego i podawanie antyoksydanta nie wpłynęły w istotny sposób na oddychanie mitochondriów sercowych u szczurów z nadciśnieniem tętniczym. Natomiast u szczurów SHR i ich odpowiedników normotensyjnych WKY trening, a także dodatkowo tempol, poprawiały NAD-zależną kontrolę oddechową mitochondriów reprezentatywnego mięśnia szkieletowego. Usprawnienie oddychania komórkowego w mięśniach szczurów SHR, które w znacznym stopniu reprezentują nadciśnienie samoistne występujące u człowieka pozwala przypuszczać, że trening fizyczny połączony z zastosowaniem antyoksydantów może przyczynić się do zmniejszenia dolegliwości wysiłkowych i zwiększenia aktywności fizycznej u chorych na nadciśnienie tętnicze. Niepokoić może natomiast niekorzystny wpływ tempola u szczurów, którym podawano inhibitor syntazy NO. Wskazuje to na mniejsze korzyści z zastosowania antyoksydantów przy zaawansowanej dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, wywołanej np. szybkim rozwojem miażdżycy.



## 6. WNIOSKI

1. Ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych przez zastosowanie wymiatacza ROS – tempola, wywołuje zróżnicowane działanie hipotensyjne, zależne od okresu dawkowania i testowanego modelu zwierzęcego. Przy podawaniu przewlekłym tempol obniża ciśnienie tętnicze u szczurów z niedoborem NO i zapobiega związanemu z wiekiem wzrostowi ciśnienia tętniczego w szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR) i u ich odpowiedników normotensyjnych (WKY).
2. Intensywny trening biegowy typu aerobowego znosi hipotensyjne działanie tempola u szczurów WKY i SHR i przyczynia się do wzrostu ciśnienia tętniczego u szczurów z niedoborem NO, które otrzymywały tempol.
3. Tempol wywiera wielokierunkowe działanie w układzie krążenia, wpływając bezpośrednio na czynność serca, pośrednio przez mechanizmy regulacji autonomicznej, a także modulując napięcie mięśniówki gładkiej naczyń i jej odpowiedzi na bodźce elektryczne i neurohumoralne.
4. Ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych przy użyciu tempola przyczynia się do nieznacznej zwiększenia wydolności fizycznej (EC) u szczurów normotensyjnych WKY, nie wpływa na EC u szczurów szczepu SHR i powoduje nieznaczne zmniejszenie EC u szczurów z niedoborem NO. Tempol korzystnie wpływa na adaptację do intensywnego wysiłku u szczurów WKY i SHR, natomiast u szczurów z niedoborem NO zapobiega zwiększeniu EC podczas treningu biegowego.
5. Badania kinetyki zaniku i biodystrybucji tempola wskazują, że związek ten utrzymuje się w układzie krążenia przez wiele godzin, niezależnie od sposobu dawkowania, co umożliwia jego długotrwałe stosowanie.
6. Wielokierunkowy obraz interakcji czynnościowych tempola w układzie krążenia u szczurów z nadciśnieniem tętniczym sugeruje, że w dalszych poszukiwaniach czynników terapeutycznych ograniczających stres oksydacyjny występujący w chorobach układu krążenia należy w szczególności uwzględnić czynniki, które wykazują działanie ograniczone do konkretnego mechanizmu patogenetycznego lub, których biodystrybucja będzie limitowała zakres ich bezpośredniego działania.

## 7. STRESZCZENIE

Reaktywne postaci tlenu (ROS) są postrzegane jako czynnik patogenetyczny nadciśnienia tętniczego, a stosowanie antyoksydantów wydaje się obiecującą perspektywą terapeutyczną. Rola ROS w regulacji krążenia jest rozpoznana fragmentarycznie, a szczegółowe mechanizmy działania antyoksydantów skrywają wiele zagadek.

Celem przeprowadzonych programu badań była ocena wpływu częściowego wyeliminowania reaktywnych postaci tlenu, przy użyciu tempola – nitroksylowego wymiatacza reaktywnych postaci tlenu o właściwościach dysmutazy ponadtlenkowej, na czynniki regulacji układu krążenia i wydolność fizyczną u szczurów z nadciśnieniem tętniczym.

Badania eksperymentalne obejmowały kompleksową ocenę wpływu tempola na: rozwój nadciśnienia tętniczego u szczurów z genetycznie uraunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR) i nadciśnieniem tętniczym zależnym od niedoboru endogenego tlenu (NO) wywołanego zahamowaniem endogennej syntazy NO, czynność serca izolowanego poddanego ischemii i reperfuzji, napięcie mięśniówki gładkiej małych i średnich naczyń tętniczych reprezentowanych przez izolowany układ naczyń tętniczych krezki, cechy fali tętna w dużych naczyniach tętniczych, autonomiczną regulację rytmu serca, ocenianą przy użyciu analizy zmienności rytmu serca (HRV), odruchową regulację układu krążenia zachodzącą przy udziale baroreceptorów i chemoreceptorów tętniczych, profil przemian energetycznych w sercu i mięśniach szkieletowych oraz wydolność fizyczną i adaptację do wysiłku fizycznego. Doświadczenia wykonano na szczurach samcach szczepu WKY i SHR oraz na szczurach WKY, u których indukowano nadciśnienie tętnicze przez zahamowanie syntazy NO przy użyciu L-nitroargininy (grupa LNR), a także na preparatach izolowanego serca i izolowanego układu tętniczego krezki.

Wykonano oznaczenia kinetyki zaniku i biodystrybucji tempola, które wskazują, że związek ten utrzymuje się w układzie krążenia przez wiele godzin, niezależnie od sposobu dawkowania, co umożliwia jego długotrwałe stosowanie.

Wyniki doświadczeń wskazują, że ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych przez zastosowanie wymiatacza ROS – tempola, wywołuje zróżnicowane działanie hipotensyjne, zależne od okresu dawkowania i testowanego modelu zwierzęcego. Przy podawaniu przewlekłym tempol obniża ciśnienie tętnicze u szczurów z niedoborem NO i zapobiega związanemu z wiekiem wzrostowi ciśnienia tętniczego w szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR) i u ich odpowiedników normotensyjnych (WKY). Tempol wywierał wielokierunkowe działanie w układzie krążenia, wpływając bezpośrednio na czynność serca, pośrednio przez mechanizmy regulacji autonomicznej, a także modulując napięcie mięśniówki gładkiej naczyń i jej odpowiedzi na bodźce elektryczne i neurohumoralne. Intensywny trening biegowy typu aerobowego znosi hipotensyjne działanie tempola u szczurów WKY i SHR i ewentualnie przyczynia się do wzrostu ciśnienia tętniczego u szczurów z niedoborem NO, które otrzymywały tempol. Ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych przy użyciu tempola przyczynia się do nieznacznego zwiększenia wydolności fizycznej (EC) u szczurów normotensyjnych WKY, nie wpływa na EC u szczurów szczepu SHR i powoduje nieznaczne zmniejszenie EC u szczurów z niedoborem NO. Tempol korzystnie wpływa na adaptację do intensywnego wysiłku u szczurów WKY i SHR, natomiast u szczurów z niedoborem NO zapobiega zwiększeniu EC podczas treningu biegowego.

## 8. SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) are concerned as a pathogenetic factor of arterial hypertension and so the use of antioxidants appear a potent prospective therapeutic strategy. The role of ROS in cardiovascular regulation is still poorly understood, and detailed mechanisms of their action conceal lot of unresolved puzzles.

The programme of study was designed to assess effects of partial elimination of ROS with use of a nitroxide ROS scavenger, tempol, which is a superoxide dismutase mimic, on mechanisms underlying cardiovascular regulation and also on endurance capacity in hypertensive rats.

The experimental studies involved complex analysis of effect of tempol on: development of hypertension, function of isolated heart challenged with ischemia and reperfusion, active vascular tone of small and middle size arterial vessels represented by the isolated system of arterial mesenteric circulation, characteristics of the pulse wave in large arteries, autonomic regulation of heart rhythm assessed by heart rate variability (HRV) analysis, baro- and chemoreflex reflex cardiovascular regulation, bioenergetic metabolic profile of heart and skeletal muscles and finally endurance capacity and adaptation to physical training.

The experiments were performed on male rats: spontaneously hypertensive (SHR), their normotensive control (WKY), and WKY rats with induced hypertension due to chronic inhibition of NO synthase with L-nitroarginine (L-NNA) and also on preparations of isolated heart, and isolated system of mesenteric arteries.

Data obtained from the studies on kinetics of tempol decay and its biodistribution indicate that tempol can persist in cardiovascular system for several hours, independently on the way of its administration, and so it may be recommended for prolonged usage.

The experimental data show that inhibition of oxidative mechanisms with use of ROS scavenger, tempol evoked diversified hypertensive effect, dependent upon the period of use and the tested animal model. On chronic supplementation tempol reduced blood pressure in the rats with hypertension induced by chronic NO deficiency and also prevented from age-matched increase in arterial pressure in SHR and their normotensive reference – WKY. Tempol evoked a multiarray effects in cardiovascular system, acting directly on heart rate, and indirectly through mechanism of autonomic regulation, tempol modulated active vascular tone or arterial vessels and their responsiveness towards electrical stimulation and neurohumoral factors. Intensive aerobic running training abolished the hypotensive effect of tempol in SHR and WKY rats, and eventually resulted in increase of arterial pressure in the NO-deficient rats supplemented with tempol. Suppression of endogenous oxidative mechanisms with use of tempol resulted in some increase in endurance capacity in WKY rats, failed it the SHRs, and reduced it in the NO-deficient ones. Tempol beneficially affected adaptation to intensive physical training in SHR and WKY rats, but in the NO-deficient rats it did prevent from increase of endurance capacity.

## 9. PIŚMIENICTWO

1. Meissner I.; Whisnant J. P.; Sheps S. G.; Schwartz G. L.; O'Fallon W. M.; Covalt J. L.; Sicks J. D.; Bailey K. R.; Wiebers D. O. Detection and control of high blood pressure in the community : Do we need a wake-up call? *Hypertension*, **1999**,*34*:466-471.
2. Chobanian A. V.; Bakris G. L.; Black H. R.; Cushman W. C.; Green L. A.; Izzo J. L., Jr.; Jones D. W.; Materson B. J.; Oparil S.; Wright J. T., Jr.; Roccella E. J. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, **2003**,*42*:1206-1252.
3. Kearney P. M.; Whelton M.; Reynolds K.; Muntner P.; Whelton P. K.; He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, **2005**,*365*:217-223.
4. Mark L.; Kondacs A.; Hanyecz V. [Cardiovascular risk factors: comparison of a Hungarian community with Germany]. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **1997**,*109*:683-687.
5. Wolf-Maier K.; Cooper R. S.; Banegas J. R.; Giampaoli S.; Hense H. W.; Joffres M.; Kastarinen M.; Poulter N.; Primatesta P.; Rodriguez-Artalejo F.; Stegmayr B.; Thamm M.; Tuomilehto J.; Vanuzzo D.; Vescio F. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA*, **2003**,*289*:2363-2369.
6. Dzerve V.; Britcina N.; Pakhomova J.; Markovitcha I.; Rinkuzs K.; Mitjusheva G. Prevalence and control of hypertension in Latvia. *J. Hum. Hypertens.*, **2004**,*18*:587-590.
7. Cifkova R.; Skodova Z.; Lanska V.; Adamkova V.; Novozamska E.; Petrzilkova Z.; Jozifova M.; Plaskova M.; Hejl Z.; Palous D.; Galovcova M. Trends in blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2000/01. *J. Hypertens.*, **2004**,*22*:1479-1485.
8. Cooper R. S.; Wolf-Maier K.; Luke A.; Adeyemo A.; Banegas J. R.; Forrester T.; Giampaoli S.; Joffres M.; Kastarinen M.; Primatesta P.; Stegmayr B.; Thamm M. An international comparative study of blood pressure in populations of European vs. African descent. *BMC. Med.*, **2005**,*3*:2.
9. Rywik S. [Epidemiology of arterial hypertension with emphasis on population studies conducted in Poland]. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **2001**,*105 Suppl*:253-256.
10. Broda G and Zdrojewski T. Czy w Polsce na progu XXI wieku nadciśnienie tętnicze jest prawidłowo diagnozowane i skutecznie leczone. *Kardiologia Pol* 56[2], 230-233. 2002.
11. Zdrojewski T.; Pienkowski R.; Szykiewicz M.; Krupa-Wojciechowska B. Have rapid socioeconomic changes influenced awareness of blood pressure in Poland? *J. Hum. Hypertens.*, **2001**,*15*:247-253.
12. Bastuji-Garin S.; Deverly A.; Moyses D.; Castaigne A.; Mancia G.; de Leeuw P. W.; Ruilope L. M.; Rosenthal T.; Chatellier G. The Framingham prediction rule is not valid in a European population of treated hypertensive patients. *J. Hypertens.*, **2002**,*20*:1973-1980.
13. Mancia G.; Volpe R.; Boros S.; Ilardi M.; Giannattasio C. Cardiovascular risk profile and blood pressure control in Italian hypertensive patients under specialist care. *J. Hypertens.*, **2004**,*22*:51-57.
14. Page I. H. The continuing failure to understand and treat hypertension. *JAMA*, **1979**,*241*:1897-1898.
15. Page, I. H. Pathogenesis of arterial hypertension. *JAMA* 140, 451-458. 1949.
16. Laroche P. Hypertension in the elderly. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **1990**,*4 Suppl* 5:947-950.
17. Vardulaki K. A.; Walker N. M.; Day N. E.; Duffy S. W.; Ashton H. A.; Scott R. A. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br. J. Surg.*, **2000**,*87*:195-200.
18. Messerli F. H.; Ventura H. O.; Reisin E. D.; Dreslinski G. R.; Dunn F. G.; Frohlich E. D. Obesity and essential hypertension. *Contrib. Nephrol.*, **1982**,*30*:116-123.
19. Reisin E.; Frohlich E. D. Effects of weight reduction on arterial pressure. *J. Chronic. Dis.*, **1982**,*35*:887-891.
20. Frohlich E. D. The first Irvine H. Page lecture. The mosaic of hypertension: past, present and future. *J. Hypertens. Suppl*, **1988**,*6*:S2-11.
21. Zanchetti A.; Hansson L.; Dahlof B.; Elmfeldt D.; Kjeldsen S.; Kollock R.; Laroche P.; McInnes G. T.; Mallion J. M.; Ruilope L.; Wedel H. Effects of individual risk factors on the incidence of cardiovascular events in the treated hypertensive patients of the Hypertension Optimal Treatment Study. HOT Study Group. *J. Hypertens.*, **2001**,*19*:1149-1159.
22. Harrap S. B. Where are all the blood-pressure genes? *Lancet*, **2003**,*361*:2149-2151.
23. Luft F. C. Present status of genetic mechanisms in hypertension. *Med. Clin. North Am.*, **2004**,*88*:1-18,
24. Mein C. A.; Caulfield M. J.; Dobson R. J.; Munroe P. B. Genetics of essential hypertension. *Hum. Mol. Genet.*, **2004**,*13 Spec No 1*:R169-R175.
25. Mancia G.; Ferrari A.; Gregorini L.; Parati G.; Pomidossi G.; Bertinieri G.; Grassi G.; di Rienzo M.; Pedotti A.; Zanchetti A. Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Circ. Res.*, **1983**,*53*:96-104.

26. Jordan J.; Tank J.; Hohenbleicher H.; Toka H.; Schroder C.; Sharma A. M.; Luft F. C. Heterogeneity of autonomic regulation in hypertension and neurovascular contact. *J Hypertens.*, **2002**,*20*:701-706.
27. Lucini D.; Mela G. S.; Malliani A.; Pagani M. Impairment in cardiac autonomic regulation preceding arterial hypertension in humans: insights from spectral analysis of beat-by-beat cardiovascular variability. *Circulation*, **2002**,*106*:2673-2679.
28. Berglund G. The role of salt in hypertension. *Acta Med Scand* 672 suppl., 117-120. 1983.
29. Durlach J.; Durlach V.; Rayssiguier Y.; Bara M.; Guet-Bara A. Magnesium and blood pressure. II. Clinical studies. *Magnes. Res.*, **1992**,*5*:147-153.
30. Ackerman M. J.; Clapham D. E. Ion channels--basic science and clinical disease. *N. Engl. J Med.*, **1997**,*336*:1575-1586.
31. Weder A. B.; Delgado M. C.; Zhu X.; Gleiberman L.; Kan D.; Chakravarti A. Erythrocyte sodium-lithium countertransport and blood pressure: a genome-wide linkage study. *Hypertension*, **2003**,*41*:842-846.
32. Anderson E. A.; Mark A. L. The vasodilator action of insulin. Implications for the insulin hypothesis of hypertension. *Hypertension*, **1993**,*21*:136-141.
33. Kopp W. Pathogenesis and etiology of essential hypertension: role of dietary carbohydrate. *Med. Hypotheses*, **2005**,*64*:782-787.
34. Suthanthiran M.; Li B.; Song J. O.; Ding R.; Sharma V. K.; Schwartz J. E.; August P. Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**,*97*:3479-3484.
35. Schut A. F.; Janssen J. A.; Deinum J.; Vergeer J. M.; Hofman A.; Lamberts S. W.; Oostra B. A.; Pols H. A.; Witteman J. C.; van Duijn C. M. Polymorphism in the promoter region of the insulin-like growth factor I gene is related to carotid intima-media thickness and aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension. *Stroke*, **2003**,*34*:1623-1627.
36. Barbieri M.; Ferrucci L.; Corsi A. M.; Macchi C.; Lauretani F.; Bonafe M.; Olivieri F.; Giovagnetti S.; Franceschi C.; Paolisso G. Is chronic inflammation a determinant of blood pressure in the elderly? *Am. J. Hypertens.*, **2003**,*16*:537-543.
37. Blake G. J.; Rifai N.; Buring J. E.; Ridker P. M. Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events. *Circulation*, **2003**,*108*:2993-2999.
38. Hansson G. K. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**,*21*:1876-1890.
39. Furchgott R. F.; Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **1980**,*288*:373-376.
40. Rajzer M. W.; Klocek M.; Kawecka-Jaszcz K.; Czarnecka D.; Baran W.; Dudek K.; Petriczek T. Aortic pulse wave velocity in young normotensives with a family history of hypertension. *J. Hypertens.*, **1999**,*17*:1821-1824.
41. Safar M. E.; Frohlich E. D. The arterial system in hypertension. A prospective view. *Hypertension*, **1995**,*26*:10-14.
42. Garland C. J.; Plane F.; Kemp B. K.; Cocks T. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1995**,*16*:23-30.
43. Sunano S.; Watanabe H.; Tanaka S.; Sekiguchi F.; Shimamura K. Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**,*126*:709-716.
44. Schiffrin E. L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2001**,*38* Suppl 2:S3-S6.
45. Gryglewski R. J.; Uracz W.; Chlopicki S.; Marcinkiewicz E. Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.*, **2002**,*21*:279-290.
46. Abe H.; Yamada N.; Kamata K.; Kuwaki T.; Shimada M.; Osuga J.; Shionoiri F.; Yahagi N.; Kadowaki T.; Tamemoto H.; Ishibashi S.; Yazaki Y.; Makuuchi M. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J. Clin. Invest.*, **1998**,*101*:1784-1788.
47. Islim I. F.; Bareford D.; Ebanks M.; Beevers D. G. The role of platelets in essential hypertension. *Blood Press*, **1995**,*4*:199-214.
48. Lee A. J. The role of rheological and haemostatic factors in hypertension. *J. Hum. Hypertens.*, **1997**,*11*:767-776.
49. Nadar S.; Lip G. Y. The prothrombotic state in hypertension and the effects of antihypertensive treatment. *Curr Pharm. Des.*, **2003**,*9*:1715-1732.
50. Brod J. Haemodynamic basis of ocute pressor reactions and hypertension. *Br. Heart J.*, **1963**,*25*:227-245.
51. Law C. M.; Shiell A. W. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J. Hypertens.*, **1996**,*14*:935-941.

52. Eriksson J.; Forsen T.; Tuomilehto J.; Osmond C.; Barker D. Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension*, **2000**,*36*:790-794.
53. Thame M.; Osmond C.; Wilks R. J.; Bennett F. I.; McFarlane-Anderson N.; Forrester T. E. Blood pressure is related to placental volume and birth weight. *Hypertension*, **2000**,*35*:662-667.
54. Januszewicz W and Sznajderman M. Nadciśnienie tętnicze u dzieci i młodzieży. Czy początki sięgają życia płodowego? *Kardiol.Pol.* **54**, 292-294. 2002.
55. Zhao M.; Shu X. O.; Jin F.; Yang G.; Li H. L.; Liu D. K.; Wen W.; Gao Y. T.; Zheng W. Birthweight, childhood growth and hypertension in adulthood. *Int. J. Epidemiol.*, **2002**,*31*:1043-1051.
56. Page I. H. The mosaic theory 32 years later. *Hypertension*, **1982**,*4*:177.
57. Tomita I.; Sano M.; Serizawa S.; Ohta K.; Katou M. Fluctuation of lipid peroxides and related enzyme activities at time of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, **1979**,*10*:323-326.
58. Orlov S. N.; Shevchenko A. S.; Postnov I. [Role of membrane-bound calcium in changes in the ATPase activity, permeability and structural state of human erythrocyte membranes]. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **1978**,*85*:682-685.
59. Chance B. The reaction of catalase in the presence of the notatin system. *Biochem J.* **1950**, *46*, 387-402.
60. Chance B and Herbert D. The enzyme-substrate compounds of bacterial catalase and peroxides. *Biochem J* **46**, 403-414. 1950.
61. Commoner B.; Townsend J.; Pake G. E. Free radicals in biological materials. *Nature*, **1954**,*174*:689-691.
62. Ramasarma T. Some radical queries. *Toxicology*, **2000**,*148*:85-91.
63. Bartosz G. *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, wyd.II . **2003**.
64. Haber F and Weiss J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaft*, **1932**, *51*, 948-950.
65. Gillette J. R.; Brodie B. B.; La Du B. N. The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **1957**,*119*:532-540.
66. Commoner B.; Ternberg J. L. Free radicals in surviving tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1961**,*47*:1374-1384.
67. Jensen P. K. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochim. Biophys Acta*, **1966**,*122*:157-166.
68. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.*, **1956**,*11*:298-300.
69. Freeman B. A.; Crapo J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **1982**,*47*:412-426.
70. Boveris A.; Oshino N.; Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J*, **1972**,*128*:617-630.
71. Boveris A.; Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, **1973**,*134*:707-716.
72. Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, **2003**,*552*:335-344.
73. Han D.; Antunes F.; Canali R.; Rettori D.; Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol. Chem.*, **2003**,*278*:5557-5563.
74. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med Biol.*, **1977**,*78*:67-82.
75. Jobsis F. F.; Rosenthal M. Behaviour of the mitochondrial respiratory chain in vivo. *Ciba Found. Symp.*, **1978**,*149*-169.
76. Ahotupa M.; Mantyla E.; Peltola V.; Puntala A.; Toivonen H. Pro-oxidant effects of normobaric hyperoxia in rat tissues. *Acta Physiol Scand*, **1992**,*145*:151-157.
77. Kazzaz J. A.; Xu J.; Palaia T. A.; Mantell L.; Fein A. M.; Horowitz S. Cellular oxygen toxicity. Oxidant injury without apoptosis. *J Biol. Chem.*, **1996**,*271*:15182-15186.
78. Barja G.; Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg. Biomembr.*, **1998**,*30*:235-243.
79. Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1998**,*854*:224-238.
80. Liu Y.; Fiskum G.; Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.*, **2002**,*80*:780-787.
81. Nicholls D. G. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **2002**,*34*:1372-1381.
82. Paddenberg R.; Ishaq B.; Goldenberg A.; Faulhammer P.; Rose F.; Weissmann N.; Braun-Dullaeus R. C.; Kummer W. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol*, **2003**,*284*:L710-L719.
83. Rosenstock T. R.; Carvalho A. C.; Jurkiewicz A.; Frussa-Filho R.; Smaili S. S. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem.*, **2004**,*88*:1220-1228.

84. Herrero A.; Barja G. Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J Bioenerg. Biomembr.*, **2000**,32:609-615.
85. Genova M. L.; Ventura B.; Giuliano G.; Bovina C.; Formiggini G.; Parenti C. G.; Lenaz G. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.*, **2001**,505:364-368.
86. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg. Biomembr.*, **1999**,31:347-366.
87. Turrens J. F.; Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, **1980**,191:421-427.
88. Chen Q.; Vazquez E. J.; Moghaddas S.; Hoppel C. L.; Lesnefsky E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol. Chem.*, **2003**,278:36027-36031.
89. Chance B.; Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. IV. The pathway of electron transfer. *J Biol. Chem.*, **1961**,236:1562-1568.
90. Hinkle P. C.; Butow R. A.; Racker E.; Chance B. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *J Biol. Chem.*, **1967**,242:5169-5173.
91. Cino M.; Del Maestro R. F. Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitation ischemia. *Arch. Biochem Biophys.*, **1989**,269:623-638.
92. Turrens J. F.; Freeman B. A.; Levitt J. G.; Crapo J. D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem Biophys.*, **1982**,217:401-410.
93. Messner K. R.; Imlay J. A. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.*, **1999**,274:10119-10128.
94. Nokubo M.; Ohta M.; Kitani K.; Nagy I. Identification of protein-bound riboflavin in rat hepatocyte plasma membrane as a source of autofluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**,981:303-308.
95. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin. Clin. Nutr. Metab Care*, **2002**,5:561-568.
96. Kachur A. V.; Koch C. J.; Biaglow J. E. Mechanism of copper-catalyzed autoxidation of cysteine. *Free Radic. Res.*, **1999**,31:23-34.
97. Misra H. P. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J Biol. Chem.*, **1974**,249:2151-2155.
98. Bors W.; Michel C.; Saran M.; Lengfelder E. Kinetic investigations of the autoxidation of adrenalin. *Z. Naturforsch. [C. J.]*, **1978**,33:891-896.
99. Bindoli A.; Scutari G.; Rigobello M. P. The role of adrenochrome in stimulating the oxidation of catecholamines. *Neurotox. Res.*, **1999**,1:71-80.
100. Misra H. P.; Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol. Chem.*, **1972**,247:6960-6962.
101. Wazawa T.; Matsuoka A.; Tajima G.; Sugawara Y.; Nakamura K.; Shikama K. Hydrogen peroxide plays a key role in the oxidation reaction of myoglobin by molecular oxygen. A computer simulation. *Biophys J*, **1992**,63:544-550.
102. McCord J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J Med.*, **1985**,312:159-163.
103. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**,33:774-797.
104. 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:R1014-R1030.
105. Morehouse L. A.; Thomas C. E.; Aust S. D. Superoxide generation by NADPH-cytochrome P-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation. *Arch. Biochem Biophys.*, **1984**,232:366-377.
106. Smith W. L.; Garavito R. M.; DeWitt D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol. Chem.*, **1996**,271:33157-33160.
107. Halliwell B, Gutteridge J M C Free Radicals in Biology and Medicine., Oxford University Press, **1999**.
108. Bray R. C. The inorganic biochemistry of molybdoenzymes. *Q. Rev. Biophys.*, **1988**,21:299-329.
109. Culcasi M.; Lafon-Cazal M.; Pietri S.; Bockaert J. Glutamate receptors induce a burst of superoxide via activation of nitric oxide synthase in arginine-depleted neurons. *J Biol. Chem.*, **1994**,269:12589-12593.
110. Gorren A. C.; Mayer B. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase. *Biochemistry (Mosc.)*, **1998**,63:734-743.
111. Vasquez-Vivar J.; Kalyanaraman B.; Martasek P.; Hogg N.; Masters B. S.; Karoui H.; Tordo P.; Pritchard K. A., Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**,95:9220-9225.

112. 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*:1201-1209.
113. Yim M. B.; Yim H. S.; Lee C.; Kang S. O.; Chock P. B. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2001**,*928*:48-53.
114. Luo G. M.; Qi D. H.; Zheng Y. G.; Mu Y.; Yan G. L.; Yang T. S.; Shen J. C. ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Lett.*, **2001**,*492*:29-32.
115. Rowe W. J. Interplanetary travel and permanent injury to normal heart. *Acta Astronaut.*, **1997**,*40*:719-722.
116. Zmyslony M.; Politanski P.; Rajkowska E.; Szymczak W.; Jajte J. Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation in vitro affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. *Bioelectromagnetics*, **2004**,*25*:324-328.
117. Cohen N.; Lubart R.; Rubinstein S.; Breitbart H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. *Photochem. Photobiol.*, **1998**,*68*:407-413.
118. Lam M.; Oleinick N. L.; Nieminen A. L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol. Chem.*, **2001**,*276*:47379-47386.
119. Wientjes F. B.; Segal A. W. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin. Cell Biol.*, **1995**,*6*:357-365.
120. Dahlgren, C; Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*,**2005**, *232*, 3-14.
121. Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**,*18*:93-105.
122. Winterbourn C. C.; Kettle A. J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**,*29*:403-409.
123. Salathe M.; Holderby M.; Forteza R.; Abraham W. M.; Wanner A.; Conner G. E. Isolation and characterization of a peroxidase from the airway. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.*, **1997**,*17*:97-105.
124. Naskalski J. W.; Bartosz G. Oxidative modifications of protein structures. *Adv. Clin. Chem.*, **2000**,*35*:161-253.
125. Staniszewska M and Gamian A. Właściwości biochemiczne i znaczenie kliniczne produktów glikacji białek. *Post Hig Med Dośw* **2003**, *57*, 123-147.
126. Davies K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol. Chem.*, **1987**,*262*:9895-9901.
127. McCord J. M.; Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.*, **1988**,*5*:363-369.
128. Maklashina E.; Ackrell B. A. Is defective electron transport at the hub of aging? *Aging Cell*, **2004**,*3*:21-27.
129. James A. M.; Murphy M. P. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed. Sci.*, **2002**,*9*:475-487.
130. Rattan S. I. Mechanisms of hormesis through mild heat stress on human cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2004**,*1019*:554-558.
131. Sies H. *Oxidative Stress.*, W: Academic Press, London, **1985**.
132. Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2004**,*1012*:1-13.
133. Prohaska J. R.; Gybina A. A. Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr.*, **2004**,*134*:1003-1006.
134. Barnes N.; Tsivkovskii R.; Tsivkovskaia N.; Lutsenko S. The Copper-transporting ATPases, Menkes and Wilson Disease Proteins, Have Distinct Roles in Adult and Developing Cerebellum. *J Biol. Chem.*, **2005**,*280*:9640-9645.
135. Thornalley P. J.; Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys Acta*, **1985**,*827*:36-44.
136. Kang Y. J. The antioxidant function of metallothionein in the heart. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1999**,*222*:263-273.
137. Gutteridge J. M.; Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J*, **1988**,*256*:861-865.
138. Halliwell B.; Gutteridge J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem Biophys.*, **1990**,*280*:1-8.
139. Svistunenko D. A. Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: The radical view. *Biochim. Biophys Acta*, **2005**,*1707*:127-155.



140. Hamilton E. W., III; Heckathorn S. A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol*, **2001**,126:1266-1274.
141. Papp E.; Nardai G.; Soti C.; Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors*, **2003**,17:249-257.
142. Reiter R. J.; Tan D. X.; Manchester L. C.; Lopez-Burillo S.; Sainz R. M.; Mayo J. C. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv. Exp. Med Biol.*, **2003**,527:539-548.
143. Obrosova I. G.; Minchenko A. G.; Marinescu V.; Fathallah L.; Kennedy A.; Stockert C. M.; Frank R. N.; Stevens M. J. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, **2001**,44:1102-1110.
144. Midaoui A. E.; Elimadi A.; Wu L.; Haddad P. S.; de Champlain J. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am. J. Hypertens.*, **2003**,16:173-179.
145. Skulachev V.P. NAD(P)(+) decomposition and antioxidant defense of the cell. *FEBS Lett.*, **2001**,492:1-3.
146. Willcox J. K.; Ash S. L.; Catignani G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, **2004**,44:275-295.
147. Scheibmeir H. D.; Christensen K.; Whitaker S. H.; Jegaethesan J.; Clancy R.; Pierce J. D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.*, **2005**,21:24-28.
148. Borges F.; Fernandes E.; Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem*, **2002**,9:195-217.
149. Gerasimov A. M.; Zakharov A. S. [Free radical mechanism of homogentisic acid in alkaptonuria]. *Vopr. Med Khim.*, **1988**,34:112-115.
150. Zhou X. J.; Laszik Z.; Wang X. Q.; Silva F. G.; Vaziri N. D. Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. *Lab Invest*, **2000**,80:1905-1914.
151. Princ F. G.; Juknat A. A.; Amitrano A. A.; Batlle A. Effect of reactive oxygen species promoted by delta-aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum. *Gen. Pharmacol.*, **1998**,31:143-148.
152. Bednarek J.; Wysocki H.; Sowinski J. Oxidation products and antioxidant markers in plasma of patients with Graves' disease and toxic multinodular goiter: effect of methimazole treatment. *Free Radic. Res.*, **2004**,38:659-664.
153. Crespo P.; Ros M. A.; Ordovas J. M.; Rodriguez J. C.; Ortiz J. M.; Leon J. Foam cells from aorta and spleen overexpress apolipoprotein E in the absence of hypercholesterolemia. *Biochem Biophys Res. Commun.*, **1992**,183:514-523.
154. Esterbauer H.; Gebicki J.; Puhl H.; Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med*, **1992**,13:341-390.
155. Harrison D.; Griendling K. K.; Landmesser U.; Hornig B.; Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, **2003**,91:7A-11A.
156. Jin Z. G.; Berk B. C. Role of secreted oxidative stress-induced factors (SOXFs) in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arch. Mal Coeur Vaiss.*, **2004**,97:1256-1259.
157. Cadet J. L.; Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem. Int*, **1998**,32:117-131.
158. Di M., V; Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.*, **2003**,2:95-107.
159. Gilgun-Sherki Y.; Melamed E.; Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol.*, **2004**,251:261-268.
160. Kastenbauer S.; Pfister H. W. Protection against meningitis-associated central nervous system complications by uric acid. *Med. Hypotheses*, **2002**,58:431.
161. Chamorro A.; Planas A. M.; Muner D. S.; Deulofeu R. Uric acid administration for neuroprotection in patients with acute brain ischemia. *Med. Hypotheses*, **2004**,62:173-176.
162. Hillard V. H.; Peng H.; Zhang Y.; Das K.; Murali R.; Etlinger J. D.; Zeman R. J. Tempol, a nitroxide antioxidant, improves locomotor and histological outcomes after spinal cord contusion in rats. *J Neurotrauma*, **2004**,21:1405-1414.
163. Robison W. G., Jr.; Jacot J. L.; Katz M. L.; Glover J. P. Retinal vascular changes induced by the oxidative stress of alpha-tocopherol deficiency contrasted with diabetic microangiopathy. *J Ocul. Pharmacol. Ther.*, **2000**,16:109-120.
164. Gracy R. W.; Talent J. M.; Kong Y.; Conrad C. C. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat. Res.*, **1999**,428:17-22.
165. Linetsky M.; James H. L.; Ortwerth B. J. Spontaneous generation of superoxide anion by human lens proteins and by calf lens proteins ascorbylated in vitro. *Exp. Eye Res.*, **1999**,69:239-248.

166. Tezel G.; Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2004**,*45*:4049-4059.
167. Banerjee T.; Kuypers F. A. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br. J Haematol.*, **2004**,*124*:391-402.
168. Pearl-Yafe M.; Halperin D.; Scheuerman O.; Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol.*, **2004**,*67*:539-546.
169. Amer J.; Fibach E. Oxidative status of platelets in normal and thalassemic blood. *Thromb. Haemost.*, **2004**,*92*:1052-1059.
170. McMillan D. C.; Bolchoz L. J.; Jollow D. J. Favism: effect of divicine on rat erythrocyte sulfhydryl status, hexose monophosphate shunt activity, morphology, and membrane skeletal proteins. *Toxicol. Sci.*, **2001**,*62*:353-359.
171. Akaike T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev. Med Virol.*, **2001**,*11*:87-101.
172. Koedel U.; Pfister H. W. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol.*, **1999**,*9*:57-67.
173. Gupta A.; Sharma S.; Nain C. K.; Sharma B. K.; Ganguly N. K. Reactive oxygen species-mediated tissue injury in experimental ascending pyelonephritis. *Kidney Int.*, **1996**,*49*:26-33.
174. Antosiewicz J.; Popinigis J.; Ishiguro H.; Hayakawa T.; Wakabayashi T. Cerulein-induced acute pancreatitis diminished vitamin E concentration in plasma and increased in the pancreas. *Int J Pancreatol.*, **1995**,*17*:231-236.
175. Preedy V.R., Reilly M.E., Mantle D, and Peters T.J. Oxidative damage in liver disease. *J Int Fed Clin Chem* 10, 16-20. 1998.
176. Kovacic P.; Jacintho J. D. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases from endogenous and exogenous agents: unifying theme of oxidative stress. *Mini. Rev. Med Chem*, **2003**,*3*:568-575.
177. Darlington L. G.; Stone T. W. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br. J Nutr.*, **2001**,*85*:251-269.
178. Budisavljevic M. N.; Hodge L.; Barber K.; Fulmer J. R.; Durazo-Arvizu R. A.; Self S. E.; Kuhlmann M.; Raymond J. R.; Greene E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am. J Physiol Renal Physiol*, **2003**,*285*:F1138-F1148.
179. Ames P. R.; Alves J.; Murat I.; Isenberg D. A.; Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement. *Rheumatology. (Oxford)*, **1999**,*38*:529-534.
180. Komosińska-Vassev K, Olczyk K, and Winsz K. Wolnorodnikowa koncepcja etiopatogenezy choroby Gravesa i Basedowa. *Post Hig Med Dosw*, **2000**, *54*, 225-237.
181. Petzold G. C.; Marcucci M.; Butler M. H.; van Landeghem F. K.; Einhaupl K. M.; Solimena M.; Valduenza J. M.; De Camilli P. Rhabdomyolysis and paraneoplastic stiff-man syndrome with amphiphysin autoimmunity. *Ann. Neurol.*, **2004**,*55*:286-290.
182. Ashok B. T.; Ali R. Binding of human anti-DNA autoantibodies to reactive oxygen species modified-DNA and probing oxidative DNA damage in cancer using monoclonal antibody. *Int J Cancer*, **1998**,*78*:404-409.
183. Andreadis A. A.; Hazen S. L.; Comhair S. A.; Erzurum S. C. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic. Biol. Med*, **2003**,*35*:213-225.
184. Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr Drug Targets. Inflamm. Allergy*, **2002**,*1*:291-315.
185. Gniadecki R.; Thorn T.; Vicanova J.; Petersen A.; Wulf H. C. Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress. *J Cell Biochem*, **2000**,*80*:216-222.
186. Santos F. X.; Arroyo C.; Garcia I.; Blasco R.; Obispo J. M.; Hamann C.; Espejo L. Role of mast cells in the pathogenesis of postburn inflammatory response: reactive oxygen species as mast cell stimulators. *Burns*, **2000**,*26*:145-147.
187. Prithivirajsingh S.; Story M. D.; Bergh S. A.; Geara F. B.; Ang K. K.; Ismail S. M.; Stevens C. W.; Buchholz T. A.; Brock W. A. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett.*, **2004**,*571*:227-232.
188. Ercal N.; Gurer-Orhan H.; Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top. Med Chem*, **2001**,*1*:529-539.
189. Shenker B. J.; Pankoski L.; Zekavat A.; Shapiro I. M. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid. Redox. Signal.*, **2002**,*4*:379-389.
190. Brent J. A.; Rumack B. H. Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury? *J Toxicol. Clin Toxicol.*, **1993**,*31*:173-196.
191. McGregor D.; Lang M. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat. Res.*, **1996**,*366*:181-195.
192. Liu L.; Zhang Q.; Feng J.; Deng L.; Zeng N.; Yang A.; Zhang W. The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat. Res.*, **1996**,*370*:145-150.

193. Skulachev V. P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.*, **1999**,*20*:139-184.
194. Ueda S.; Masutani H.; Nakamura H.; Tanaka T.; Ueno M.; Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid. Redox. Signal.*, **2002**,*4*:405-414.
195. Kopaczewska M and Kopaczewski B. Apoptoza - genetycznie zaprogramowana śmierć komórki. *Nowiny Lek.* 75[3], 389-392. 2004.
196. Pessayre D.; Mansouri A.; Haouzi D.; Fromenty B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol. Toxicol.*, **1999**,*15*:367-373.
197. Jimenez D. R.; Velez-Pardo C. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. *Arch. Med Res.*, **2004**,*35*:185-193.
198. Lee H. C.; Wei Y. H. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.*, **2005**,*37*:822-834.
199. Lyamzaev K. G.; Izyumov D. S.; Avetisyan A. V.; Yang F.; Pletjushkina O. Y.; Chernyak B. V. Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim. Pol.*, **2004**,*51*:553-562.
200. Sastry P. S.; Rao K. S. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem.*, **2000**,*74*:1-20.
201. Chatterjee S.; Stewart A. S.; Bish L. T.; Jayasankar V.; Kim E. M.; Pirolli T.; Burdick J.; Woo Y. J.; Gardner T. J.; Sweeney H. L. Viral gene transfer of the antiapoptotic factor Bcl-2 protects against chronic posts ischemic heart failure. *Circulation*, **2002**,*106*:1212-1217.
202. Yamaguchi O.; Higuchi Y.; Hirotani S.; Kashiwase K.; Nakayama H.; Hikoso S.; Takeda T.; Watanabe T.; Asahi M.; Taniike M.; Matsumura Y.; Tsujimoto I.; Hongo K.; Kusakari Y.; Kurihara S.; Nishida K.; Ichijo H.; Hori M.; Otsu K. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**,*100*:15883-15888.
203. Allen D. L.; Linderman J. K.; Roy R. R.; Bigbee A. J.; Grindeland R. E.; Mukku V.; Edgerton V. R. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am. J Physiol.*, **1997**,*273*:C579-C587.
204. Primeau A. J.; Adhietty P. J.; Hood D. A. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can. J Appl. Physiol.*, **2002**,*27*:349-395.
205. Podhorska-Okolow M.; Dziegiel P.; Murawska-Ciałowicz E.; Krajewska B.; Ciesielska U.; Jethon Z.; Zabel M. Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol. (Warsz.)*, **2004**,*63*:213-216.
206. Skulachev V. P. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *IUBMB. Life*, **2000**,*49*:365-373.
207. Kawanishi S.; Hiraku Y.; Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat. Res.*, **2001**,*488*:65-76.
208. Olinski R.; Gackowski D.; Foksinski M.; Rozalski R.; Roszkowski K.; Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**,*33*:192-200.
209. Taysi S.; Uslu C.; Akcay F.; Sutbeyaz M. Y. Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer. *Surg. Today*, **2003**,*33*:651-654.
210. Camphausen K.; Menard C.; Sproull M.; Goley E.; Basu S.; Coleman C. N. Isoprostane levels in the urine of patients with prostate cancer receiving radiotherapy are not elevated. *Int J Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2004**,*58*:1536-1539.
211. Janssen A. M.; van Duijn W.; Kubben F. J.; Griffioen G.; Lamers C. B.; van Krieken J. H.; van de Velde C. J.; Verspaget H. W. Prognostic significance of metallothionein in human gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res.*, **2002**,*8*:1889-1896.
212. Hack V.; Schmid D.; Breikreutz R.; Stahl-Henning C.; Drings P.; Kinscherf R.; Taut F.; Holm E.; Droge W. Cystine levels, cystine flux, and protein catabolism in cancer cachexia, HIV/SIV infection, and senescence. *FASEB J*, **1997**,*11*:84-92.
213. Harman D. Aging: overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2001**,*928*:1-21.
214. Ashok B. T.; Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp. Gerontol.*, **1999**,*34*:293-303.
215. Dukan S.; Nystrom T. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.*, **1998**,*12*:3431-3441.
216. Dukan S.; Farewell A.; Ballesteros M.; Taddei F.; Radman M.; Nystrom T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**,*97*:5746-5749.
217. Linnane A. W.; Marzuki S.; Ozawa T.; Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*, **1989**,*1*:642-645.
218. Drew B.; Leeuwenburgh C. Ageing and subcellular distribution of mitochondria: role of mitochondrial DNA deletions and energy production. *Acta Physiol Scand*, **2004**,*182*:333-341.

219. Kang D.; Hamasaki N. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem*, **2005**,*12*:429-441.
220. Druzhyina N.; Nair R. G.; LeDoux S. P.; Wilson G. L. Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome. *Mutat. Res.*, **1998**,*409*:81-89.
221. Stevnsner T.; Nyaga S.; Souza-Pinto N. C.; van der Horst G. T.; Gorgels T. G.; Hogue B. A.; Thorslund T.; Bohr V. A. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene*, **2002**,*21*:8675-8682.
222. Davies K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc. Symp.*, **1995**,*61*:1-31.
223. Liu P. K. Ischemia-reperfusion-related repair deficit after oxidative stress: implications of faulty transcripts in neuronal sensitivity after brain injury. *J Biomed. Sci.*, **2003**,*10*:4-13.
224. Bindoli A.; Cavallini L.; Rigobello M. P.; Coassin M.; Di Lisa F. Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **1988**,*4*:163-167.
225. Berry C. E.; Hare J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, **2004**,*555*:589-606.
226. Meerson F. Z.; Radzievskii S. A.; Giber L. M.; Kogan A. K.; Rozhitskaia I. I. [Heart damage during emotional stress and its prevention by preliminary adaptation to high altitude hypoxia]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **1977**,*237*:977-980.
227. Peterson D. A. An etiologic basis for congestive heart failure on the molecular level. *Med Hypotheses*, **1984**,*13*:109-113.
228. 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*:152-157.
229. Tsutsui H.; Ide T.; Hayashidani S.; Suematsu N.; Shiomi T.; Wen J.; Nakamura K.; Ichikawa K.; Utsumi H.; Takeshita A. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation*, **2001**,*104*:134-136.
230. Nian M.; Lee P.; Khaper N.; Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ. Res.*, **2004**,*94*:1543-1553.
231. Adegate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol. Cell Biochem*, **2004**,*261*:187-191.
232. Chaiswing L.; Cole M. P.; St Clair D. K.; Ittarat W.; Szweda L. I.; Oberley T. D. Oxidative damage precedes nitrate damage in adriamycin-induced cardiac mitochondrial injury. *Toxicol. Pathol.*, **2004**,*32*:536-547.
233. Demiryurek A. T.; Cakici I.; Wainwright C. L.; Wadsworth R. M.; Kane K. A. Effects of free radical production and scavengers on occlusion-reperfusion induced arrhythmias. *Pharmacol. Res.*, **1998**,*38*:433-439.
234. Kim Y. H.; Lim d. S.; Lee J. H.; Shim W. J.; Ro Y. M.; Park G. H.; Becker K. G.; Cho-Chung Y. S.; Kim M. K. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp. Mol. Med*, **2003**,*35*:336-349.
235. Ochoa J. J.; Vilchez M. J.; Mataix J.; Ibanez-Quiles S.; Palacios M. A.; Munoz-Hoyos A. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg. Res.*, **2003**,*111*:248-254.
236. Fitton T. P.; Wei C.; Lin R.; Bethea B. T.; Barreiro C. J.; Amado L.; Gage F.; Hare J.; Baumgartner W. A.; Conte J. V. Impact of 24 h continuous hypothermic perfusion on heart preservation by assessment of oxidative stress. *Clin Transplant.*, **2004**,*18 Suppl 12*:22-27.
237. Pechan I.; Danova K.; Olejarova I.; Halcak L.; Rendekova V.; Fabian J. Oxidative stress and antioxidant defense systems in patients after heart transplantation. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **2003**,*115*:648-651.
238. Phillips M.; Boehmer J. P.; Cataneo R. N.; Cheema T.; Eisen H. J.; Fallon J. T.; Fisher P. E.; Gass A.; Greenberg J.; Kobashigawa J.; Mancini D.; Rayburn B.; Zucker M. J. Prediction of heart transplant rejection with a breath test for markers of oxidative stress. *Am. J Cardiol.*, **2004**,*94*:1593-1594.
239. Williams R. J. The necessary and the desirable production of radicals in biology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **1985**,*311*:593-603.
240. Marshall P. J.; Kulmacz R. J.; Lands W. E. Constraints on prostaglandin biosynthesis in tissues. *J Biol. Chem*, **1987**,*262*:3510-3517.
241. Nordmann R. Radicaux libres, stress oxydatif et vitamines antioxydantes [Free radicals, oxidative stress and antioxidant vitamins]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **1993**,*187*:277-285.
242. Munday R. Autoxidation of naphthoquinones: effects of metals, chelating agents, and superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**,*22*:689-695.
243. Gu Z. P.; Mao B. Y.; Wang Y. X.; Zhang R. A.; Tan Y. Z.; Chen Z. X.; Cao L.; You G. D.; Segal S. J. Low dose gossypol for male contraception. *Asian J Androl*, **2000**,*2*:283-287.

244. Villegas J.; Kehr K.; Soto L.; Henkel R.; Miska W.; Sanchez R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*, **2003**,*35*:227-232.
245. Ben Yosef D.; Talmor A.; Shwartz L.; Granot Y.; Shalgi R. Tyrosyl-phosphorylated proteins are involved in regulation of meiosis in the rat egg. *Mol. Reprod. Dev.*, **1998**,*49*:176-185.
246. Hawkins C. L.; Rees M. D.; Davies M. J. Superoxide radicals can act synergistically with hypochlorite to induce damage to proteins. *FEBS Lett.*, **2002**,*510*:41-44.
247. Sohn H. Y.; Krotz F.; Zahler S.; Gloe T.; Keller M.; Theisen K.; Schiele T. M.; Klauss V.; Pohl U. Crucial role of local peroxynitrite formation in neutrophil-induced endothelial cell activation. *Cardiovasc. Res.*, **2003**,*57*:804-815.
248. Stief T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypotheses*, **2003**,*60*:567-572.
249. Ray S. D.; Lam T. S.; Rotollo J. A.; Phadke S.; Patel C.; Dontabhaktuni A.; Mohammad S.; Lee H.; Strika S.; Dobrogowska A.; Bruculeri C.; Chou A.; Patel S.; Patel R.; Manolas T.; Stohs S. Oxidative stress is the master operator of drug and chemically-induced programmed and unprogrammed cell death: Implications of natural antioxidants in vivo. *Biofactors*, **2004**,*21*:223-232.
250. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, **2002**,*82*:47-95.
251. Kimura S.; Zhang G. X.; Nishiyama A.; Shokoji T.; Yao L.; Fan Y. Y.; Rahman M.; Abe Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension*, **2005**,*45*:438-444.
252. Ben Mahdi M. H.; Andrieu V.; Pasquier C. Focal adhesion kinase regulation by oxidative stress in different cell types. *IUBMB. Life*, **2000**,*50*:291-299.
253. Juravleva E.; Barbakadze T.; Mikeladze D.; Kekelidze T. Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glia cells, modulates Ras/NF-kappaB signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci. Res.*, **2005**,*79*:224-230.
254. Tobiume K.; Matsuzawa A.; Takahashi T.; Nishitoh H.; Morita K.; Takeda K.; Minowa O.; Miyazono K.; Noda T.; Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.*, **2001**,*2*:222-228.
255. Gabbita S. P.; Robinson K. A.; Stewart C. A.; Floyd R. A.; Hensley K. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch Biochem Biophys*, **2000**,*376*:1-13.
256. Kunsch C.; Medford R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.*, **1999**,*85*:753-766.
257. Felty Q.; Roy D. Mitochondrial signals to nucleus regulate estrogen-induced cell growth. *Med Hypotheses*, **2005**,*64*:133-141.
258. Mattiasson G. Analysis of mitochondrial generation and release of reactive oxygen species. *Cytometry A*, **2004**,*62*:89-96.
259. Duval C.; Cantero A. V.; Auge N.; Mabile L.; Thiers J. C.; Negre-Salvayre A.; Salvayre R. Proliferation and wound healing of vascular cells trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**,*35*:1589-1598.
260. Lee H. B.; Yu M. R.; Song J. S.; Ha H. Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.*, **2004**,*65*:1170-1179.
261. Lopez-Pedreria C.; Dobado-Berrios P. M.; Ros R.; Torres A.; Garcia-Navarro S.; Jardi M.; Felez J.; Velasco F. Signal transduction pathways underlying the expression of tissue factor and thrombomodulin in promyelocytic cells induced to differentiate by retinoid acid and dibutyl cAMP. *Thromb. Haemost.*, **2001**,*85*:1031-1036.
262. Baran C. P.; Zeigler M. M.; Tridandapani S.; Marsh C. B. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. *Curr Pharm. Des.*, **2004**,*10*:855-866.
263. Bigelow D. J.; Squier T. C. Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim. Biophys Acta*, **2005**,*1703*:121-134.
264. Cairo G.; Pietrangelo A. Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem J*, **2000**,*352 Pt 2*:241-250.
265. Fillebeen C.; Pantopoulos K. Redox control of iron regulatory proteins. *Redox. Rep.*, **2002**,*7*:15-22.
266. Ludwig B.; Bender E.; Arnold S.; Huttemann M.; Lee I.; Kadenbach B. Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *ChemBiochem.*, **2001**,*2*:392-403.
267. Skulachev V. P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q. Rev. Biophys.*, **1996**,*29*:169-202.
268. Milatovic D.; Zivin M.; Gupta R. C.; Dettbarn W. D. Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res.*, **2001**,*912*:67-78.
269. Jezek P.; Zackova M.; Ruzicka M.; Skobisova E.; Jaburek M. Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies. *Physiol Res.*, **2004**,*53 Suppl 1*:S199-S211.

270. Simonyan R. A.; Jimenez M.; Ceddia R. B.; Giacobino J. P.; Muzzin P.; Skulachev V. P. Cold-induced changes in the energy coupling and the UCP3 level in rodent skeletal muscles. *Biochim. Biophys Acta*, **2001**,*1505*:271-279.
271. Korshunov S. S.; Korkina O. V.; Ruuge E. K.; Skulachev V. P.; Starkov A. A. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O<sub>2</sub>·- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett.*, **1998**,*435*:215-218.
272. Gurwitsch A.G. Über den Begriff den embryonalen Feldes. *Arch Entwicklungsmechanik* 51, 383-415. 1922.
273. Cadenas E.; Sies H. Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence, and lipid peroxidation. *Eur. J Biochem*, **1982**,*124*:349-356.
274. Nagl W.; Popp F. A. A physical (electromagnetic) model of differentiation. 1. Basic considerations. *Cytobios*, **1983**,*37*:45-62.
275. Shao C.; Furusawa Y.; Kobayashi Y.; Funayama T.; Wada S. Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study. *FASEB J*, **2003**,*17*:1422-1427.
276. Brune B. The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid. Redox. Signal.*, **2005**,*7*:497-507.
277. Peters S. L.; Mathy M. J.; Pfaffendorf M.; van Zwieten P. A. Reactive oxygen species-induced aortic vasoconstriction and deterioration of functional integrity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **2000**,*361*:127-133.
278. Nowicki P. T.; Flavahan S.; Hassanain H.; Mitra S.; Holland S.; Goldschmidt-Clermont P. J.; Flavahan N. A. Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ. Res.*, **2001**,*89*:114-116.
279. Ellis A.; Triggle C. R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **2003**,*81*:1013-1028.
280. Needleman P.; Jakschik B.; Johnson E. M., Jr. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **1973**,*187*:324-331.
281. Ager A.; Gordon J. L. Differential effects of hydrogen peroxide on indices of endothelial cell function. *J Exp. Med*, **1984**,*159*:592-603.
282. Torrecillas G.; Boyano-Adanez M. C.; Medina J.; Parra T.; Griera M.; Lopez-Ongil S.; Arilla E.; Rodriguez-Puyol M.; Rodriguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol. Pharmacol.*, **2001**,*59*:104-112.
283. Liu J. Q.; Folz R. J. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol*, **2004**,*287*:L1111-L1118.
284. Sato A.; Sakuma I.; Gutterman D. D. Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **2003**,*285*:H2345-H2354.
285. Kazama K.; Anrath J.; Zhou P.; Girouard H.; Frys K.; Milner T. A.; Iadecola C. Angiotensin II impairs neurovascular coupling in neocortex through NADPH oxidase-derived radicals. *Circ. Res.*, **2004**,*95*:1019-1026.
286. Rey F. E.; Pagano P. J. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2002**,*22*:1962-1971.
287. Basta G.; Schmidt A. M.; De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.*, **2004**,*63*:582-592.
288. Wood J. G.; Johnson J. S.; Mattioli L. F.; Gonzalez N. C. Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats. *J Appl. Physiol*, **2000**,*89*:1561-1568.
289. Klabunde R. E.; Anderson D. E. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in platelet-activating factor-induced microvascular leakage. *J Vasc. Res.*, **2002**,*39*:238-245.
290. Bailey S. R.; Mitra S.; Flavahan S.; Flavahan N. A. Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **2005**.
291. Samartsev V. N.; Simonyan R. A.; Markova O. V.; Mokhova E. N.; Skulachev V. P. Comparative study on uncoupling effects of laurate and lauryl sulfate on rat liver and skeletal muscle mitochondria. *Biochim. Biophys Acta*, **2000**,*1459*:179-190.
292. Barja d. Q. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med*, **1992**,*13*:325-340.
293. Dulloo A. G.; Seydoux J.; Jacquet J. Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance. *Physiol Behav*, **2004**,*83*:587-602.
294. Vidal-Puig A. J.; Grujic D.; Zhang C. Y.; Hagen T.; Boss O.; Ido Y.; Szczepanik A.; Wade J.; Mootha V.; Cortright R.; Muoio D. M.; Lowell B. B. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol. Chem*, **2000**,*275*:16258-16266.
295. Tsuboyama-Kasaoka N.; Ezaki O. Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) in skeletal muscle. *Front Biosci.*, **2001**,*6*:D570-D574.

296. Gonzalez C.; Sanz-Alfayate G.; Agapito M. T.; Gomez-Nino A.; Rocher A.; Obeso A. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. *Respir. Physiol Neurobiol.*, **2002**,*132*:17-41.
297. Kummer W.; Yamamoto Y. Cellular distribution of oxygen sensor candidates-oxidases, cytochromes, K<sup>+</sup>-channels--in the carotid body. *Microsc. Res. Tech.*, **2002**,*59*:234-242.
298. Acker T.; Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *J Exp. Biol.*, **2004**,*207*:3171-3188.
299. Hochachka P. W.; Land S. C.; Buck L. T. Oxygen sensing and signal transduction in metabolic defense against hypoxia: lessons from vertebrate facultative anaerobes. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, **1997**,*118*:23-29.
300. Pokorski M.; Sakagami H.; Kondo H. Classical protein kinase C and its hypoxic stimulus-induced translocation in the cat and rat carotid body. *Eur. Respir. J.*, **2000**,*16*:459-463.
301. Acker H. Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir. Physiol*, **1994**,*95*:1-10.
302. Kang P.; Porter K. E.; Boyle J. P.; Kemp P. J.; Peers C. Hypoxic modulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in human venous endothelial cells: Multiple roles for reactive oxygen species. *J Biol. Chem.* **2005**.
303. Obeso A.; Sanz-Alfayate G.; Agapito M. T.; Gonzalez C. Significance of ROS in oxygen chemoreception in the carotid body chemoreception. Apparent lack of a role for NADPH oxidase. *Adv. Exp. Med Biol.*, **2000**,*475*:425-434.
304. 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*:26-32.
305. Fu X. W.; Wang D.; Nurse C. A.; Dinauer M. C.; Cutz E. NADPH oxidase is an O<sub>2</sub> sensor in airway chemoreceptors: evidence from K<sup>+</sup> current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**,*97*:4374-4379.
306. Lopez-Barneo J.; del Toro R.; Levitsky K. L.; Chiara M. D.; Ortega-Saenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl. Physiol*, **2004**,*96*:1187-1195.
307. Daudu P. A.; Roy A.; Rozanov C.; Mokashi A.; Lahiri S. Extra- and intracellular free iron and the carotid body responses. *Respir. Physiol Neurobiol.*, **2002**,*130*:21-31.
308. Buerk D. G.; Lahiri S. Evidence that nitric oxide plays a role in O<sub>2</sub> sensing from tissue NO and PO<sub>2</sub> measurements in cat carotid body. *Adv. Exp. Med Biol.*, **2000**,*475*:337-347.
309. Kline D. D.; Prabhakar N. R. Peripheral chemosensitivity in mutant mice deficient in nitric oxide synthase. *Adv. Exp. Med Biol.*, **2000**,*475*:571-579.
310. Jiang C.; Haddad G. G. A direct mechanism for sensing low oxygen levels by central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1994**,*91*:7198-7201.
311. Dean J. B.; Mulkey D. K.; Henderson R. A., III; Potter S. J.; Putnam R. W. Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *J Appl. Physiol*, **2004**,*96*:784-791.
312. Mulkey D. K.; Henderson R. A., III; Ritucci N. A.; Putnam R. W.; Dean J. B. Oxidative stress decreases pH<sub>i</sub> and Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange and increases excitability of solitary complex neurons from rat brain slices. *Am. J Physiol Cell Physiol*, **2004**,*286*:C940-C951.
313. Mulkey D. K.; Henderson R. A., III; Putnam R. W.; Dean J. B. Hyperbaric oxygen and chemical oxidants stimulate CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup>-sensitive neurons in rat brain stem slices. *J Appl. Physiol*, **2003**,*95*:910-921.
314. Davies K. J. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB. Life*, **2000**,*50*:279-289.
315. Keyse S. M.; Tyrrell R. M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1989**,*86*:99-103.
316. Yamaoka K.; Komoto Y.; Suzuka I.; Edamatsu R.; Mori A. Effects of radon inhalation on biological function--lipid peroxide level, superoxide dismutase activity, and membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys*, **1993**,*302*:37-41.
317. Southman C.M and Ehrlich J. Effects of extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33, 517-524. 1943.
318. Glantz L.; Avramovich A.; Trembovler V.; Gurvitz V.; Kohen R.; Eidelman L. A.; Shohami E. Ischemic preconditioning increases antioxidants in the brain and peripheral organs after cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, **2005**,*192*:117-124.
319. Tang X. L.; Takano H.; Rizvi A.; Turrens J. F.; Qiu Y.; Wu W. J.; Zhang Q.; Bolli R. Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **2002**,*282*:H281-H291.

320. Yaguchi Y.; Satoh H.; Wakahara N.; Katoh H.; Uehara A.; Terada H.; Fujise Y.; Hayashi H. Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts. *Circ. J.* **2003**,*67*:253-258.
321. Mittal C. K.; Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**,*74*:4360-4364.
322. Rosenblum W. I. Effects of free radical generation on mouse pial arterioles: probable role of hydroxyl radicals. *Am. J. Physiol.* **1983**,*245*:H139-H142.
323. Lamb F. S.; Webb R. C. Vascular effects of free radicals generated by electrical stimulation. *Am. J. Physiol.* **1984**,*247*:H709-H714.
324. Katusic Z. S.; Vanhoutte P. M. Anoxic contractions in isolated canine cerebral arteries: contribution of endothelium-derived factors, metabolites of arachidonic acid, and calcium entry. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1986**,*8 Suppl 8*:S97-101.
325. Kontos H.A. Role of products of univalent reduction of oxygen in hypertensive vascular injury. W: W: Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis, and Management; Laragh J.H; Brenner B.M.Red. **Raven Press, New York 1990**: 667-675.
326. Ager A.; Gordon J. L. Differential effects of hydrogen peroxide on indices of endothelial cell function. *J. Exp. Med.* **1984**,*159*:592-603.
327. Zweier J. L.; Kuppusamy P.; Lutty G. A. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**,*85*:4046-4050.
328. Nakazono K.; Watanabe N.; Matsuno K.; Sasaki J.; Sato T.; Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**,*88*:10045-10048.
329. Orlov S. N.; Pokudin N. I.; Postnov I. [Permeability for monovalent ions, intracellular calcium distribution and the contractility of vascular smooth muscle cells in arterial hypertension]. *Kardiologija.* **1978**,*18*:131-139.
330. Tomita I.; Sano M.; Serizawa S.; Takata T.; Furukawa M. Studies on the oxidation and peroxide scavenging potentials of tissues in spontaneously hypertensive rats (SHR) and stroke-prone SHR [proceedings]. *Jpn. Heart J.* **1977**,*18*:608-609.
331. Rubanyi G. M.; Vanhoutte P. M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **1986**,*250*:H815-H821.
332. Di Wang H.; Hope S.; Du Y.; Quinn M. T.; Cayatte A.; Pagano P. J.; Cohen R. A. Paracrine role of adventitial superoxide anion in mediating spontaneous tone of the isolated rat aorta in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* **1999**,*33*:1225-1232.
333. Katusic Z. S.; Vanhoutte P. M. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am. J. Physiol.* **1989**,*257*:H33-H37.
334. Jun T.; Ke-yan F.; Catalano M. Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **1996**,*10*:305-309.
335. Lacy F.; O'Connor D. T.; Schmid-Schonbein G. W. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* **1998**,*16*:291-303.
336. Wilson S. K. Role of oxygen-derived free radicals in acute angiotensin II--induced hypertensive vascular disease in the rat. *Circ. Res.* **1990**,*66*:722-734.
337. Berry C.; Hamilton C. A.; Brosnan M. J.; Magill F. G.; Berg G. A.; McMurray J. J.; Dominiczak A. F. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* **2000**,*101*:2206-2212.
338. Usui M.; Egashira K.; Kitamoto S.; Koyanagi M.; Katoh M.; Kataoka C.; Shimokawa H.; Takeshita A. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* **1999**,*34*:546-551.
339. Somers M. J.; Mavromatis K.; Galis Z. S.; Harrison D. G. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* **2000**,*101*:1722-1728.
340. Swei A.; Lacy F.; Delano F. A.; Parks D. A.; Schmid-Schonbein G. W. A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. *Microcirculation.* **1999**,*6*:179-187.
341. Zalba G.; Beaumont F. J.; San Jose G.; Fortuno A.; Fortuno M. A.; Etayo J. C.; Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **2000**,*35*:1055-1061.
342. Gryglewski R. J.; Palmer R. M.; Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **1986**,*320*:454-456.
343. Weiss S. J.; Young J.; LoBuglio A. F.; Slivka A.; Nimeh N. F. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **1981**,*68*:714-721.



344. Freeman B. A.; Crapo J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **1982**,*47*:412-426.
345. Laursen J. B.; Rajagopalan S.; Galis Z.; Tarpey M.; Freeman B. A.; Harrison D. G. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, **1997**,*95*:588-593.
346. Zhang X. M.; Ellis E. F. Superoxide dismutase decreases mortality, blood pressure, and cerebral blood flow responses induced by acute hypertension in rats. *Stroke*, **1991**,*22*:489-494.
347. Chen Z.; Oberley T. D.; Ho Y.; Chua C. C.; Siu B.; Hamdy R. C.; Epstein C. J.; Chua B. H. Overexpression of CuZnSOD in coronary vascular cells attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**,*29*:589-596.
348. Takashima S.; Hori M.; Kitakaze M.; Sato H.; Inoue M.; Kamada T. Superoxide dismutase restores contractile and metabolic dysfunction through augmentation of adenosine release in coronary microembolization. *Circulation*, **1993**,*87*:982-995.
349. Mitchell J. B.; Samuni A.; Krishna M. C.; DeGraff W. G.; Ahn M. S.; Samuni U.; Russo A. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry*, **1990**, *29* 2802-2807.
350. Krishna M. C.; Russo A.; Mitchell J. B.; Goldstein S.; Dafni H.; Samuni A. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O<sub>2</sub><sup>-</sup> or as SOD mimics? *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*:26026-26031.
351. Wierzba T.H., Cherek M., Nowak J., Wypych Z. Tissue distribution and decay of tempol after its single intravenous or intraperitoneal injection. *Curr.Topics.Biophys.*, **2000**, *24*, 231-240.
352. Matsumoto S.; Mori N.; Tsuchihashi N.; Ogata T.; Lin Y.; Yokoyama H.; Ishida S. Enhancement of nitroxide-reducing activity in rats after chronic administration of vitamin E, vitamin C, and idebenone examined by an in vivo electron spin resonance technique. *Magn Reson. Med.*, **1998**,*40*:330-333.
353. Hahn S. M.; Krishna C. M.; Samuni A.; DeGraff W.; Cuscela D. O.; Johnstone P.; Mitchell J. B. Potential use of nitroxides in radiation oncology. *Cancer Res.*, **1994**,*54*:2006s-2010s.
354. Kuppusamy P.; Chzhan M.; Vij K.; Shteynbuk M.; Lefer D. J.; Giannella E.; Zweier J. L. Three-dimensional spectral-spatial EPR imaging of free radicals in the heart: a technique for imaging tissue metabolism and oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1994**,*91*:3388-3392.
355. Rosen G. M.; Halpern H. J.; Brunsting L. A.; Spencer D. P.; Strauss K. E.; Bowman M. K.; Wechsler A. S. Direct measurement of nitroxide pharmacokinetics in isolated hearts situated in a low-frequency electron spin resonance spectrometer: implications for spin trapping and in vivo oxymetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**,*85*:7772-7776.
356. Schnackenberg C. G.; Wilcox C. S. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f<sub>2</sub>alpha. *Hypertension*, **1999**,*33*:424-428.
357. Wierzbą T.H., Cherek M., Musiał P., Wszędybył-Winklewska M., Wypych Z. Postischemic dysfunction partially prevented by a nitroxide SOD mimic - the experimental study on isolated rat heart. *Med.Sport.*, **2001**, *17*, 39-43.
358. Wierzbą T.H., Cherek M., Wypych Z., and Wypych Z. Effect of substituted piperidine nitroxides on functional characteristics of the isolated heart challenged with ischemia. *Med.Sport.*, **2001**, *17*, 44-48.
359. Gelvan D.; Saltman P.; Powell S. R. Cardiac reperfusion damage prevented by a nitroxide free radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1991**,*88*:4680-4684.
360. Hahn S. M.; Sullivan F. J.; DeLuca A. M.; Bacher J. D.; Liebmann J.; Krishna M. C.; Coffin D.; Mitchell J. B. Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**,*27*:529-535.
361. Schnackenberg C. G.; Welch W. J.; Wilcox C. S. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*, **1998**,*32*:59-64.
362. Schnackenberg C. G.; Wilcox C. S. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f<sub>2</sub>alpha. *Hypertension*, **1999**,*33*:424-428.
363. Kushi L. H.; Folsom A. R.; Prineas R. J.; Mink P. J.; Wu Y.; Bostick R. M. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.*, **1996**,*334*:1156-1162.
364. Lee I. M.; Cook N. R.; Gaziano J. M.; Gordon D.; Ridker P. M.; Manson J. E.; Hennekens C. H.; Buring J. E. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*, **2005**,*294*:56-65.
365. Omenn G. S.; Goodman G. E.; Thornquist M. D.; Balmes J.; Cullen M. R.; Glass A.; Keogh J. P.; Meyskens F. L.; Valanis B.; Williams J. H.; Barnhart S.; Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, **1996**,*334*:1150-1155.
366. Virtamo J.; Rapola J. M.; Ripatti S.; Heinonen O. P.; Taylor P. R.; Albanes D.; Huttunen J. K. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.*, **1998**,*158*:668-675.
367. Rapola J. M.; Virtamo J.; Ripatti S.; Huttunen J. K.; Albanes D.; Taylor P. R.; Heinonen O. P. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet*, **1997**,*349*:1715-1720.

368. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*, **1999**,354:447-455.
369. Stephens N. G.; Parsons A.; Schofield P. M.; Kelly F.; Cheeseman K.; Mitchinson M. J. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, **1996**,347:781-786.
370. Yusuf S.; Dagenais G.; Pogue J.; Bosch J.; Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.*, **2000**,342:154-160.
371. Collins R.; Peto R.; Armitage J. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int. J. Clin. Pract.*, **2002**,56:53-56.
372. Huxley R. R.; Neil H. A. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2003**,57:904-908.
373. Vivekananthan D. P.; Penn M. S.; Sapp S. K.; Hsu A.; Topol E. J. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, **2003**,361:2017-2023.
374. Knekt P.; Ritz J.; Pereira M. A.; O'Reilly E. J.; Augustsson K.; Fraser G. E.; Goldbourt U.; Heitmann B. L.; Hallmans G.; Liu S.; Pietinen P.; Spiegelman D.; Stevens J.; Virtamo J.; Willett W. C.; Rimm E. B.; Ascherio A. Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**,80:1508-1520.
375. Wierzba T.H. Nieoczekiwane niepowodzenia prób klinicznych z antyoksydantami. *Kardiol.Pol.*, **2005**, 63, supl. 2, S472-S482.
376. Wierzba T, Juzwa W., Przyborska A., Jurkowski M.K., Lammek B., Rekowski P., Kupryszewski G. The vasoconstrictor, pressor, and centrally-evoked modulatory effect of the three novel arginine-vasopressin (AVP) analogues in the cardiovascular system of rat. *Pol.J.Pharmacol.Pharm.*, **1987**, 38, supl. 30, 206-207.
377. Wierzba T, Czaja M., Lammek B., Juzwa W. cardiovascular and anti-antidiuretic effects of the novel acyclic antagonists of arginine-vasopressin (AVP) modified at their N-terminus in conscious rats. *Pol.J.Pharmacol.Pharm.*, **1992**, 44, supl., 250.
378. Juzwa W., Wierzba T. Potęgowanie noradrenalinowego skurczu izolowanych naczyń trzewnych szczura przez wysokie stężenie oksytocyny. *Ann.Acad.Med.Gedan.*, **1987**, 17, 99-114.
379. Juzwa W., Wierzba T., Redlarski G., Przyborska A., Kaliszan R. Oksytocyna jako antagonistą naczyniowo-zwężającego działania noradrenaliny w naczyniach trzewnych szczura. *Ann.Acad.Med.Gedan.* 18, 105-117. 1988.
380. Wang Y. X.; Gavras I.; Wierzba T.; Lammek B.; Gavras H. Inhibition of nitric oxide, bradykinin, and prostaglandins in normal rats. *Hypertension*, **1992**,19:II255-II261.
381. Wierzba T.H, Winklewski P., Wszędybył M., and Juzwa W. Diverse implications of the inhibition of nitric oxide biosynthesis in the circulatory homeostasis in rat. *J.Physiol.Pharmacol.* 47,supl.2, 62-63. 2007.
382. Wierzba T.H, Juzwa W. Sezonowe zmiany reaktywności na noradrenalinę układu izolowanych naczyń kręzkowych szczura. *Ann.Acad.Med.Gedan.* 33, 243-250. 2003.
383. Dawidowska O.; Prahł A.; Kowalczyk W.; Derdowska I.; Lammek B.; Wierzba T. H.; Juzwa W.; Neuberger K.; Zabrocki J.; Olejniczak B. Potent bradykinin antagonists containing N-benzylglycine or N-benzyl-L-alanine in position 8. *J. Pept. Res.*, **2004**,63:29-35.
384. Wang Y. X.; Gavras I.; Wierzba T.; Gavras H. Comparison of systemic and regional hemodynamic effects of a diuretic, an angiotensin II receptor antagonist, and an angiotensin-converting enzyme inhibitor in conscious renovascular hypertensive rats. *J. Lab Clin. Med.*, **1992**,119:267-272.
385. Winklewski P., Wierzba T.H., Wszędybył M., Juzwa W. Interakcje czynnościowe między endogennym tlenkiem azotu (NO) i angiotensyną II w regulacji ciśnienia tętniczego u szczura. *Med.Sci.Monitor*, **1996**, 2, supl.4, 23-24.
386. Zimmerman M. C.; Lazartigues E.; Lang J. A.; Sinnayah P.; Ahmad I. M.; Spitz D. R.; Davissou R. L. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ. Res.*, **2002**,91:1038-1045.
387. Just A.; Olson A. J.; Whitten C. L.; Arendshorst W. J. Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **2007**,292:H83-H92.
388. Oldenburg O.; Qin Q.; Krieg T.; Yang X. M.; Philipp S.; Critz S. D.; Cohen M. V.; Downey J. M. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **2004**,286:H468-H476.
389. Kozłowski V. I.; Olszanecki R.; Chłopicki S. Free radicals generated by xanthine/xanthine oxidase system augment nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX)-independent component of bradykinin-induced vasodilatation in the isolated guinea pig heart. *Pharmacol. Rep.*, **2006**,58:405-412.

390. Biyikli N. K.; Tugtepe H.; Sener G.; Velioglu-Ogunc A.; Cetinel S.; Midillioglu S.; Gedik N.; Yegen B. C. Oxytocin alleviates oxidative renal injury in pyelonephritic rats via a neutrophil-dependent mechanism. *Peptides*, **2006**,*27*:2249-2257.
391. Warren A. Y.; Matharoo-Ball B.; Shaw R. W.; Khan R. N. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility. *Reproduction*, **2005**,*130*:539-544.
392. Lammek B.; Derdowska I.; Wierzba T.; Juzwa W. Synthesis of four new V1 antagonists of arginine-vasopressin (AVP) containing new thioacids at position 1 and their vasoconstrictor activity towards mesenteric arterial vessels of rats. *Collect.Czech.Chem.Comm.*, **1991**, *56*, 491-498.
393. Lammek B.; Konieczna E.; Wierzba T.; Wang Y. X.; Gavras H. Synthesis and some pharmacological properties of new V1/V2 antagonists of arginine-vasopressin with structural changes at their N-terminals. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **1992**,*44*:179-186.
394. Derdowska I.; Prahla A.; Neubert K.; Hartrodt B.; Kania A.; Dobrowolski D.; Melhem S.; Trzeciak H. I.; Wierzba T.; Lammek B. New analogues of bradykinin containing a conformationally restricted dipeptide fragment in their molecules. *J. Pept. Res.*, **2001**,*57*:11-18.
395. Dawidowska O.; Prahla A.; Wierzba T.; Nowakowski L.; Kowalczyk W.; Slaninova J.; Lammek B. New acylated bradykinin analogues: effect on rat blood pressure and rat uterus. *J. Pept. Sci.*, **2005**,*11*:436-439.
396. Labudda-Dawidowska O.; Wierzba T. H.; Prahla A.; Kowalczyk W.; Gawinski L.; Plackova M.; Slaninova J.; Lammek B. New bradykinin analogues modified in the C-terminal part with sterically restricted 1-aminocyclohexane-1-carboxylic acid. *J. Med. Chem.*, **2005**,*48*:8055-8059.
397. Prahla, A. Wierzba T.H., and Winklewski P. Wszędybył M., Cherek M. Juzwa W. Lammek B. Influence of C-terminal modifications of bradykinin antagonists on their activity. *Collect.Czech.Chem.Comm.* **1997**, *62*, 1940-1946.
398. Labudda O.; Wierzba T.; Sobolewski D.; Sleszynska M.; Gawinski L.; Plackova M.; Slaninova J.; Prahla A. New bradykinin analogues acylated on the N-terminus: effect on rat uterus and blood pressure. *Acta Biochim. Pol.*, **2007**,*54*:193-198.
399. Labudda O.; Wierzba T.; Sobolewski D.; Kowalczyk W.; Sleszynska M.; Gawinski L.; Plackova M.; Slaninova J.; Prahla A. New bradykinin analogues substituted in positions 7 and 8 with sterically restricted 1-aminocyclopentane-1-carboxylic acid. *J. Pept. Sci.*, **2006**,*12*:775-779.
400. Wang Y. X.; Gavras I.; Wierzba T.; Gavras H. Comparison of systemic and regional hemodynamic effects of a diuretic, an angiotensin II receptor antagonist, and an angiotensin-converting enzyme inhibitor in conscious renovascular hypertensive rats. *J. Lab Clin. Med.*, **1992**,*119*:267-272.
401. Lammek B.; Konieczna E.; Wierzba T.; Wang Y. X.; Gavras H. Synthesis and some pharmacological properties of new V1/V2 antagonists of arginine-vasopressin with structural changes at their N-terminals. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **1992**,*44*:179-186.
402. Wierzba T. H.; Olek R. A.; Fedeli D.; Falcioni G. Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J. Physiol Pharmacol.*, **2006**,*57 Suppl 10*:115-131.
403. Lammek B.; Konieczna E.; Wierzba T.; Wang Y. X.; Gavras H. Synthesis and some pharmacological properties of new V1/V2 antagonists of arginine-vasopressin with structural changes at their N-terminals. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **1992**,*44*:179-186.
404. Wierzba., Ciesielski B, Nowak J., Musial P., and Wypych Z. Racjonalne podstawy przewlekłego stosowania tempola. *Ann.Acad.Med.Gedan.*,**2001**, *31*, 113-120.
405. Chen K.; Swartz H. M. Oxidation of hydroxylamines to nitroxide spin labels in living cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1988**,*970*:270-277.
406. Krishna M. C.; Russo A.; Mitchell J. B.; Goldstein S.; Dafni H.; Samuni A. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O<sub>2</sub><sup>-</sup> or as SOD mimics? *J. Biol. Chem.*, **1996**,*271*:26026-26031.
407. Tipton C. M. Determinants of VO<sub>2</sub> max: insights gained from non-human species. *Acta Physiol Scand. Suppl*, **1986**,*556*:33-43.
408. Gava N. S.; Veras-Silva A. S.; Negrao C. E.; Krieger E. M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **1995**,*26*:1129-1133.
409. Kurtz T. W.; Griffin K. A.; Bidani A. K.; Davisson R. L.; Hall J. E. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2005**,*25*:e22-e33.
410. Bertinieri G.; di Rienzo M.; Cavallazzi A.; Ferrari A. U.; Pedotti A.; Mancia G. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. *J. Hypertens. Suppl*, **1985**,*3*:S79-S81.
411. Oosting J.; Struijker-Boudier H. A.; Janssen B. J. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. *J. Hypertens.*, **1997**,*15*:391-399.

412. di Rienzo M.; Parati G.; Castiglioni P.; Tordi R.; Mancia G.; Pedotti A. Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2001**,*280*:R744-R751.
413. Halamek J.; Kara T.; Jurak P.; Soucek M.; Francis D. P.; Davies L. C.; Shen W. K.; Coats A. J.; Novak M.; Novakova Z.; Panovsky R.; Toman J.; Sumner J.; Somers V. K. Variability of phase shift between blood pressure and heart rate fluctuations: a marker of short-term circulation control. *Circulation*, **2003**,*108*:292-297.
414. Niskanen J. P.; Tarvainen M. P.; Ranta-Aho P. O.; Karjalainen P. A. Software for advanced HRV analysis. *Comput. Methods Programs Biomed.*, **2004**,*76*:73-81.
415. Tarvainen M. P.; Georgiadis S. D.; Ranta-Aho P. O.; Karjalainen P. A. Time-varying analysis of heart rate variability signals with a Kalman smoother algorithm. *Physiol. Meas.*, **2006**,*27*:225-239.
416. Kobayashi H.; Ishibashi K.; Noguchi H. Heart rate variability; an index for monitoring and analyzing human autonomic activities. *Appl. Human Sci.*, **1999**,*18*:53-59.
417. Mc Gregor D. D. The effect of sympathetic nerve stimulation of vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.*, **1965**,*177*:21-30.
418. Southworth R.; Shattock M. J.; Hearse D. J.; Kelly F. J. Developmental differences in superoxide production in isolated guinea-pig hearts during reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **1998**,*30*:1391-1399.
419. van Gelder B.; Slated E. C. The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, **1962**,*58*:593-595.
420. Southworth R.; Shattock M. J.; Hearse D. J.; Kelly F. J. Developmental differences in superoxide production in isolated guinea-pig hearts during reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **1998**,*30*:1391-1399.
421. Lowry O. H.; Rosenbrough N. J.; Farr A. L.; Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**,*193*:265-275.
422. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratio. W: *Methods in enzymology (Estabrook R.W., Pullman M.E. red.)*, Academic Press, New York, **1967**, *10*, 41-47.
423. Swierczynski J.; Scislawski P. W.; Aleksandrowicz Z.; Zydowo M. M. Intracellular distribution of fumarase in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**,*756*:271-278.
424. Wharton, D. C and Tzagaloff, A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. W: *Methods in enzymology (Estabrook R.W., Pullman M.E. red.)*, Academic Press, New York, **1967**, *10*, 245-250.
425. Klingenberg M. Muskelmitochondrien [Muscle mitochondria]. *Ergeb. Physiol.*, **1964**,*55*:131-189.
426. Makinen M. W.; Lee C. P. Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria. I. Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of mammalian skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1968**,*126*:75-82.
427. Rozantsev E.G. Free nitroxyl radicals. Plenum Press, New York., **1970**, 212-216
428. Armitage P. Metody Statystyczne w Badaniach Medycznych., W: PZWL, Warszawa, **1978**.
429. Chowdhary S.; Townend J. N. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clin. Sci. (Lond)*, **1999**,*97*:5-17.
430. Morales M. E.; Santillan M. B.; Jauregui E. A.; Ciuffo G. M. Structure-activity relationship of nitric oxide synthase inhibitors: a theoretical approach. *Cell Mol. Biol. (Noisy -le-grand)*, **2002**,*48*:547-555.
431. Thakali K. M.; Lau Y.; Fink G. D.; Galligan J. J.; Chen A. F.; Watts S. W. Mechanisms of hypertension induced by nitric oxide (NO) deficiency: focus on venous function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2006**,*47*:742-750.
432. Szczepańska-Sadowska E. Ekperymentalne modele nadciśnienia tętniczego. W: *Nadciśnienie Tętnicze (Januszewicz A., Januszewicz W., Szczepańska-Sadowska E., Sznajderman M., red.)*; Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków, **2004**: 73-80.
433. Pagliaro P.; Dalla V. R.; Gattullo D.; Merletti A.; Marsh N. A. The heart rate after inhibition of nitric oxide release in the anaesthetized dog. *Gen. Pharmacol.*, **1996**,*27*:695-699.
434. Ward J. E.; Angus J. A. Acute and chronic inhibition of nitric oxide synthase in conscious rabbits: role of nitric oxide in the control of vascular tone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1993**,*21*:804-814.
435. Kojda G.; Kottenberg K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc. Res.*, **1999**,*41*:514-523.
436. Castellano M.; Rizzoni D.; Beschi M.; Muesan M. L.; Porteri E.; Bettoni G.; Salvetti M.; Cinelli A.; Zulli R.; Agabiti-Rosei E. Relationship between sympathetic nervous system activity, baroreflex and cardiovascular effects after acute nitric oxide synthesis inhibition in humans. *J. Hypertens.*, **1995**,*13*:1153-1161.
437. Spieker L. E.; Corti R.; Binggeli C.; Luscher T. F.; Noll G. Baroreceptor dysfunction induced by nitric oxide synthase inhibition in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2000**,*36*:213-218.
438. Lepori M.; Sartori C.; Trueb L.; Owlya R.; Nicod P.; Scherrer U. Haemodynamic and sympathetic effects of inhibition of nitric oxide synthase by systemic infusion of N(G)-monomethyl-L-arginine into humans are dose dependent. *J. Hypertens.*, **1998**,*16*:519-523.

439. Sander M.; Hansen P. G.; Victor R. G. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension*, **1995**,*26*:691-695.
440. Scrogin K. E.; Veelken R.; Luft F. C. Sympathetic baroreceptor responses after chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment in conscious rats. *Hypertension*, **1994**,*23*:982-986.
441. Rastaldo R.; Pagliaro P.; Cappello S.; Penna C.; Mancardi D.; Westerhof N.; Losano G. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci.*, **2007**,*81*:779-793.
442. Fellet A. L.; Arza P.; Arreche N.; Arranz C.; Balaszczuk A. M. Nitric oxide and thyroid gland: modulation of cardiovascular function in autonomic-blocked anaesthetized rats. *Exp. Physiol*, **2004**,*89*:303-312.
443. Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton. Neurosci.*, **2002**,*98*:24-27.
444. Tai M. H.; Wang L. L.; Wu K. L.; Chan J. Y. Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, **2005**,*38*:450-462.
445. Sweeney C.; Markos F. The role of neuronal nitric oxide in the vagal control of cardiac interval of the rat heart in vitro. *Auton. Neurosci.*, **2004**,*111*:110-115.
446. Martins-Pinge M. C.; Garcia M. R.; Zoccal D. B.; Crestani C. C.; Pinge-Filho P. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. *Auton. Neurosci.*, **2007**,*131*:65-69.
447. Herring N.; Paterson D. J. Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. *J. Physiol*, **2001**,*535*:507-518.
448. Bratz I. N.; Swafford A. N., Jr.; Kanagy N. L.; Dick G. M. Reduced functional expression of K(+) channels in vascular smooth muscle cells from rats made hypertensive with N{omega}-nitro-L-arginine. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **2005**,*289*:H1284-H1290.
449. Hano T.; Rho J. Norepinephrine overflow in perfused mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **1989**,*14*:44-53.
450. Schwarz P.; Diem R.; Dun N. J.; Forstermann U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ. Res.*, **1995**,*77*:841-848.
451. Pinto R.; Barrento C.; Mota-Filipe H.; Lima B. S. Phenylephrine induces endogenous noradrenaline release in the rat vas deferens through nitric oxide synthase pathway. *Pharmacol. Toxicol.*, **2003**,*93*:191-196.
452. Hano T.; Jeng Y.; Rho J. Norepinephrine release and reuptake by hypothalamic synaptosomes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **1989**,*13*:250-255.
453. Harkin A.; Connor T. J.; Burns M. P.; Kelly J. P. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **2004**,*14*:274-281.
454. Kaye D. M.; Gruskin S.; Smith A. I.; Esler M. D. Nitric oxide mediated modulation of norepinephrine transport: identification of a potential target for S-nitrosylation. *Br. J. Pharmacol.*, **2000**,*130*:1060-1064.
455. Chies A. B.; Custodio R. C.; de Souza G. L.; Correa F. M.; Pereira O. C. Pharmacological evidence that methylene blue inhibits noradrenaline neuronal uptake in the rat vas deferens. *Pol. J. Pharmacol.*, **2003**,*55*:573-579.
456. Szoko E.; Haberer D.; Halasz A. S.; Tekes K.; Magyar K. Protective effect of 7-nitroindazole against DSP-4 induced noradrenaline depletion in mouse hippocampus. *J. Neural Transm.*, **2001**,*108*:407-413.
457. Li X.; Rose G.; Dongre N.; Pan H. L.; Tobin J. R.; Eisenach J. C. S-nitroso-l-cysteine releases norepinephrine in rat spinal synaptosomes. *Brain Res.*, **2000**,*872*:301-307.
458. Poggetti R. S.; Moore F. A.; Moore E. E.; Koeike K.; Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. *J. Trauma*, **1992**,*32*:723-727.
459. Bianciardi P.; Scorza R.; Ghilardi G.; Samaja M. Xanthine oxidoreductase activity in ischemic human and rat intestine. *Free Radic. Res.*, **2004**,*38*:919-925.
460. Berg T. Increased counteracting effect of eNOS and nNOS on an alpha1-adrenergic rise in total peripheral vascular resistance in spontaneous hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, **2005**,*67*:736-744.
461. Vo P. A.; Reid J. J.; Rand M. J. Attenuation of vasoconstriction by endogenous nitric oxide in rat caudal artery. *Br. J. Pharmacol.*, **1992**,*107*:1121-1128.
462. Adeagbo A. S.; Tabrizchi R.; Triggle C. R. The effects of perfusion rate and NG-nitro-L-arginine methyl ester on cirazoline- and KCl-induced responses in the perfused mesenteric arterial bed of rats. *Br. J. Pharmacol.*, **1994**,*111*:13-20.
463. Peotta V. A.; Vasquez E. C.; Meyrelles S. S. Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. *Hypertension*, **2001**,*38*:555-559.
464. Dowell F. J.; Henrion D.; Duriez M.; Michel J. B. Vascular reactivity in mesenteric resistance arteries following chronic nitric oxide synthase inhibition in Wistar rats. *Br. J. Pharmacol.*, **1996**,*117*:341-346.
465. Wierzbicka T.H., Gawiński Ł., and Chorążewicz J. Modulatory effect of tempol on vascular tone of isolated rat arteries. *Proc. Progr. Biomed. Sci. (Bertoli E., Usukura J., Tanaka M., red.)* **2004**, *1*, 26-35.

466. Bauersachs J.; Bouloumie A.; Mulsch A.; Wiemer G.; Fleming I.; Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc. Res.*, **1998**,*37*:772-779.
467. Ghosh M.; Wang H. D.; McNeill J. R. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **2004**,*141*:562-573.
468. Maffei A.; Poulet R.; Vecchione C.; Colella S.; Fratta L.; Frati G.; Trimarco V.; Trimarco B.; Lembo G. Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J. Hypertens.*, **2002**,*20*:1135-1142.
469. Nabha L.; Garbern J. C.; Buller C. L.; Charpie J. R. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.*, **2005**,*27*:71-82.
470. Vaziri N. D.; Ni Z.; Oveisi F.; Trnavsky-Hobbs D. L. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*, **2000**,*36*:957-964.
471. Wu C. C.; Yen M. H. Higher level of plasma nitric oxide in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.*, **1999**,*12*:476-482.
472. Kimura Y.; Hirooka Y.; Sagara Y.; Sunagawa K. Long-acting calcium channel blocker, azelnidipine, increases endothelial nitric oxide synthase in the brain and inhibits sympathetic nerve activity. *Clin. Exp. Hypertens.*, **2007**,*29*:13-21.
473. Racasan S.; Braam B.; Koomans H. A.; Joles J. A. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am. J. Physiol Renal Physiol*, **2005**,*288*:F626-F636.
474. Liu H.; Ledingham J. M.; Mullaney I.; Laverty R. Endothelial function in mesenteric resistance arteries from the genetically hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **2002**,*29*:405-411.
475. Chang H. R.; Lee R. P.; Wu C. Y.; Chen H. I. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **2002**,*29*:275-280.
476. Marquer-Domagala F.; Finet M. Comparison of the nitric oxide and cyclo-oxygenase pathway in mesenteric resistance vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **1997**,*121*:588-594.
477. Conrad K. P.; Whittemore S. L. NG-monomethyl-L-arginine and nitroarginine potentiate pressor responsiveness of vasoconstrictors in conscious rats. *Am. J. Physiol*, **1992**,*262*:R1137-R1144.
478. Bendall J. K.; Alp N. J.; Warrick N.; Cai S.; Adlam D.; Rockett K.; Yokoyama M.; Kawashima S.; Channon K. M. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ. Res.*, **2005**,*97*:864-871.
479. Bevers L. M.; Braam B.; Post J. A.; van Zonneveld A. J.; Rabelink T. J.; Koomans H. A.; Verhaar M. C.; Joles J. A. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*, **2006**,*47*:87-94.
480. Takimoto E.; Champion H. C.; Li M.; Ren S.; Rodriguez E. R.; Tavazzi B.; Lazzarino G.; Paolucci N.; Gabrielson K. L.; Wang Y.; Kass D. A. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J. Clin. Invest*, **2005**,*115*:1221-1231.
481. Takimoto E.; Kass D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*, **2007**,*49*:241-248.
482. Zicha J.; Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.*, **1999**,*79*:1227-1282.
483. Habeck J. O.; Przybylski J. Carotid and aortic bodies in chronically anemic normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **1989**,*28*:219-225.
484. Corvol P.; Jeunemaitre X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr. Rev.*, **1997**,*18*:662-677.
485. Ando H.; Zhou J.; Macova M.; Imboden H.; Saavedra J. M. Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, **2004**,*35*:1726-1731.
486. Kaehler S. T.; Salchner P.; Singewald N.; Philippu A. Differential amino acid transmission in the locus coeruleus of Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2004**,*370*:381-387.
487. Matias A.; Zimmer F. J.; Lorenzen A.; Keil R.; Schwabe U. Affinity of central adenosine A1 receptors is decreased in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**,*244*:223-230.
488. Giuliano R.; Brezenoff H. E. Increased central cholinergic activity in rat models of hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1987**,*10*:113-122.
489. Przybylski J.; Szczepek A. J.; Sieminska J. Does excessive tissue oxygen supply contribute to the development of spontaneous arterial hypertension in rats? *Biomed. Biochim. Acta*, **1987**,*46*:945-951.
490. Trzebski A.; Tafil M.; Zoltowski M.; Przybylski J. Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **1982**,*16*:163-172.

491. Hayward L. F.; Johnson A. K.; Felder R. B. Arterial chemoreflex in conscious normotensive and hypertensive adult rats. *Am. J. Physiol.*, **1999**,276:H1215-H1222.
492. Przybylski J.; Trzebski A.; Przybyszewski A. Circulatory responses to acute hypoxia in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Acta Physiol Pol.*, **1980**,31:463-468.
493. Przybylski J.; Brożyna W. Reduced blood pressure response to carotid body chemoreceptor stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Pol.*, **1981**,32:117-120.
494. Ono A.; Kuwaki T.; Kumada M.; Fujita T. Differential central modulation of the baroreflex by salt loading in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **1997**,29:808-814.
495. Kumagai H.; Averill D. B.; Ferrario C. M. Renal nerve activity in rats with spontaneous hypertension: effect of converting enzyme inhibitor. *Am. J. Physiol.*, **1992**,263:R109-R115.
496. Lundin S.; Ricksten S. E.; Thoren P. Interaction between mental stress and baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *J. Hypertens. Suppl.*, **1983**,1:68-70.
497. Nagai R.; Nagata S.; Fukuya F.; Higaki J.; Rakugi H.; Ogihara T. Changes in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2003**,30:419-425.
498. Oosting J.; Struijker-Boudier H. A.; Janssen B. J. Autonomic control of ultradian and circadian rhythms of blood pressure, heart rate, and baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **1997**,15:401-410.
499. Vasquez E. C.; Cunha R. S.; Cabral A. M. Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1994**,27:767-774.
500. Souza H. C.; Ballejo G.; Salgado M. C.; Da Silva V. J.; Salgado H. C. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2001**,280:H844-H850.
501. Wang D. S.; Xie H. H.; Shen F. M.; Cai G. J.; Su D. F. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2005**,32:545-552.
502. Bertagnoli M.; Campos C.; Schenkel P. C.; de Oliveira V. L.; De Angelis K.; Bello-Klein A.; Rigatto K.; Irigoyen M. C. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.*, **2006**,24:2437-2443.
503. Zoccoli G.; Andreoli E.; Bojic T.; Cianci T.; Franzini C.; Predieri S.; Lenzi P. Central and baroreflex control of heart rate during the wake-sleep cycle in rat. *Sleep*, **2001**,24:753-758.
504. Hughson R. L.; Quintin L.; Annat G.; Yamamoto Y.; Gharib C. Spontaneous baroreflex by sequence and power spectral methods in humans. *Clin. Physiol.*, **1993**,13:663-676.
505. Parati G.; di Rienzo M.; Mancia G. How to measure baroreflex sensitivity: from the cardiovascular laboratory to daily life. *J. Hypertens.*, **2000**,18:7-19.
506. di Rienzo M.; Castiglioni P.; Mancia G.; Pedotti A.; Parati G. Advancements in estimating baroreflex function. *IEEE Eng Med. Biol. Mag.*, **2001**,20:25-32.
507. Rudiger H.; Bald M. Spontaneous baroreflex sensitivity in children and young adults calculated in the time and frequency domain. *Auton. Neurosci.*, **2001**,93:71-78.
508. Farah V. M.; Joaquim L. F.; Bernatova I.; Morris M. Acute and chronic stress influence blood pressure variability in mice. *Physiol Behav.*, **2004**,83:135-142.
509. Lantelme P.; Cerutti C.; Lo M.; Paultre C. Z.; Ducher M. Mechanisms of spontaneous baroreflex impairment in Lyon hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, **1998**,275:R920-R925.
510. Pickering T. G.; Gribbin B.; Sleight P. Comparison of the reflex heart rate response to rising and falling arterial pressure in man. *Cardiovasc. Res.*, **1972**,6:277-283.
511. Swynghedauw B.; Jasson S.; Chevalier B.; Clairambault J.; Hardouin S.; Heymes C.; Mangin L.; Mansier P.; Medigue C.; Moalic J. M.; Thibault N.; Carre F. Heart rate and heart rate variability, a pharmacological target. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **1997**,10:677-685.
512. Linden D.; Diehl R. R. Estimation of baroreflex sensitivity using transfer function analysis: normal values and theoretical considerations. *Clin. Auton. Res.*, **1996**,6:157-161.
513. Wichterle D.; Melenovsky V.; Simek J.; Necasova L.; Kautzner J.; Malik M. Cross-spectral analysis of heart rate and blood pressure modulations. *Pacing Clin. Electrophysiol.*, **2000**,23:1425-1430.
514. Przybylski J.; Tafil-Klawe M.; Trzebski A.; Klawe J. Increased resistance to acute anoxia of the respiratory and cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Pol.*, **1985**,36:42-50.
515. Araujo M. T.; Barker L. A.; Cabral A. M.; Vasquez E. C. Inhibition of nitric oxide synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch reflex. *Am. J. Hypertens.*, **1998**,11:66-72.
516. Matsumura K.; Tsuchihashi T.; Kagiyama S.; Abe I.; Fujishima M. Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats. *Brain Res.*, **1998**,798:232-238.

517. Dias A. C.; Vitela M.; Colombari E.; Mifflin S. W. Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2005**,288:H256-H262.
518. : Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur. Heart J.*, **1996**,17:354-381.
519. Pomeranz B.; Macaulay R. J.; Caudill M. A.; Kutz I.; Adam D.; Gordon D.; Kilborn K. M.; Barger A. C.; Shannon D. C.; Cohen R. J.; . Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am. J. Physiol.*, **1985**,248:H151-H153.
520. Gehrmann J.; Hammer P. E.; Maguire C. T.; Wakimoto H.; Triedman J. K.; Berul C. I. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2000**,279:H733-H740.
521. Perlstein I.; Stepensky D.; Sapoznikov D.; Hoffman A. Power spectral analysis of heart rate variability in rats as a quantitative tool in the PK-PD analysis of the parasympatholytic activity of atropine. *Pharm. Res.*, **2001**,18:1220-1225.
522. Murasato Y.; Hirakawa H.; Harada Y.; Nakamura T.; Hayashida Y. Effects of systemic hypoxia on R-R interval and blood pressure variabilities in conscious rats. *Am. J. Physiol.*, **1998**,275:H797-H804.
523. Ramaekers D.; Beckers F.; Demeulemeester H.; Aubert A. E. Cardiovascular autonomic function in conscious rats: a novel approach to facilitate stationary conditions. *Ann. Noninvasive. Electrocardiol.*, **2002**,7:307-318.
524. Chang C. C.; Hwang J. S.; Chan C. C.; Cheng T. J. Interaction effects of ultrafine carbon black with iron and nickel on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats. *Environ. Health Perspect.*, **2007**,115:1012-1017.
525. Aubert A. E.; Ramaekers D.; Beckers F.; Broom R.; Deneff C.; Van de W. F.; Ector H. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput. Methods Programs Biomed.*, **1999**,60:197-213.
526. Mangin L.; Swynghedauw B.; Benis A.; Thibault N.; Lerebours G.; Carre F. Relationships between heart rate and heart rate variability: study in conscious rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1998**,32:601-607.
527. Ju K.; Kubo T. Power spectral analysis of autonomic nervous activity in spontaneously hypertensive rats. *Biomed. Sci. Instrum.*, **1997**,33:338-343.
528. Cerutti C.; Gustin M. P.; Paultre C. Z.; Lo M.; Julien C.; Vincent M.; Sassard J. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am. J. Physiol.*, **1991**,261:H1292-H1299.
529. Jovanov E. On Spectral Analysis of Heart Rate Variability during Very Slow Yogic Breathing. *Conf. Proc. IEEE Eng Med. Biol. Soc.*, **2005**,3:2467-2470.
530. Arlt J.; Jahn H.; Kellner M.; Strohle A.; Yassouridis A.; Wiedemann K. Modulation of sympathetic activity by corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide. *Neuropeptides*, **2003**,37:362-368.
531. Bilge A. R.; Stein P. K.; Domitrovich P. P.; Gerard P. L.; Rottman J. N.; Kleiger R. E.; Kulbertus H. E.; Pierard L. A. Assessment of ultra low frequency band power of heart rate variability: validation of alternative methods. *Int. J. Cardiol.*, **1999**,71:1-6.
532. Burger A. J.; Aronson D. Activity of the neurohormonal system and its relationship to autonomic abnormalities in decompensated heart failure. *J. Card Fail.*, **2001**,7:122-128.
533. Karas M.; Lacourciere Y.; LeBlanc A. R.; Nadeau R.; Dube B.; Florescu M.; Lamarre-Cliche M.; Poirier L.; Larochelle P.; de Champlain J. Effect of the renin-angiotensin system or calcium channel blockade on the circadian variation of heart rate variability, blood pressure and circulating catecholamines in hypertensive patients. *J. Hypertens.*, **2005**,23:1251-1260.
534. Wessel N.; Malberg H.; Heringer-Walther S.; Schultheiss H. P.; Walther T. The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 dominates the circadian rhythm and baroreflex in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2007**,49:67-73.
535. Kinugasa H.; Hirayanagi K. Effects of skin surface cooling and heating on autonomic nervous activity and baroreflex sensitivity in humans. *Exp. Physiol.*, **1999**,84:369-377.
536. Thayer J. F.; Nabors-Oberg R.; Sollers J. J., III ; Thermoregulation and cardiac variability: a time-frequency analysis. *Biomed. Sci. Instrum.*, **1997**,34:252-256.
537. Malpas S. C. Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2002**,282:H6-20.
538. Ewing D. J.; Neilson J. M.; Travis P. New method for assessing cardiac parasympathetic activity using 24 hour electrocardiograms. *Br. Heart J.*, **1984**,52:396-402.
539. Mietus J. E.; Peng C. K.; Henry I.; Goldsmith R. L.; Goldberger A. L. The pNNx files: re-examining a widely used heart rate variability measure. *Heart*, **2002**,88:378-380.



540. Beresewicz A.; Maczewski M.; Duda M. Effect of classic preconditioning and diazoxide on endothelial function and O<sub>2</sub>- and NO generation in the post-ischemic guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.*, **2004**,*63*:118-129.
541. Maczewski M.; Duda M.; Pawlak W.; Beresewicz A. Endothelial protection from reperfusion injury by ischemic preconditioning and diazoxide involves a SOD-like anti-O<sub>2</sub>- mechanism. *J. Physiol Pharmacol.*, **2004**,*55*:537-550.
542. Southworth R.; Shattock M. J.; Hearse D. J.; Kelly F. J. Developmental differences in superoxide production in isolated guinea-pig hearts during reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **1998**,*30*:1391-1399.
543. Napoli C.; de Nigris F.; Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem*, **2001**,*82*:674-682.
544. Dhalla N. S.; Temsah R. M.; Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.*, **2000**,*18*:655-673.
545. Gariboldi M. B.; Rimoldi V.; Supino R.; Favini E.; Monti E. The nitroxide tempol induces oxidative stress, p21(WAF1/CIP1), and cell death in HL60 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**,*29*:633-641.
546. Nelson S. K.; Bose S. K.; McCord J. M. The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**,*16*:195-200.
547. Offer T.; Russo A.; Samuni A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J.*, **2000**,*14*:1215-1223.
548. Zeltzer G.; Berenshtein E.; Kitrossky N.; Chevion M.; Samuni A. Time window of nitroxide effect on myocardial ischemic-reperfusion injury potentiated by iron. *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**,*32*:912-919.
549. Wink D. A.; Feelisch M.; Fukuto J.; Chistodoulou D.; Jour'dheuil D.; Grisham M. B.; Vodovotz Y.; Cook J. A.; Krishna M.; DeGraff W. G.; Kim S.; Gamson J.; Mitchell J. B. The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**,*351*:66-74.
550. Wierzbza T.H., Ziółkowski W, Borkowski T, Gawiński L, Chorążewicz J, Nowak J, Swirydowicz S, Kaczor J.J Effect of chronic tempol administration on endurance capacity and respiration of the skeletal muscle mitochondria of spontaneously hypertensive rats (SHR). W: *Proc.Progr.Biomed.Sci. (Bertoli E., Usukura J., Tanaka M., red.), Gdańsk*, **2004**, **2004**: 1,84-98.
551. Weinberg A.; Nylander K. D.; Yan C.; Ma L.; Hsia C. J.; Tyurin V. A.; Kagan V. E.; Schor N. F. Prevention of catecholaminergic oxidative toxicity by 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl and its recycling complex with polynitroxylated albumin, TEMPOL/PNA. *Brain Res.*, **2004**,*1012*:13-21.
552. Chiari A.; Li X. H.; Xu Z.; Pan H. L.; Eisenach J. C. Formation of 6-nitro-norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. *Neuroscience*, **2000**,*101*:189-196.
553. Barbacanne M. A.; Souchard J. P.; Darblade B.; Iliou J. P.; Nepveu F.; Pipy B.; Bayard F.; Arnal J. F. Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**,*29*:388-396.
554. Matsumoto S.; Mori N.; Tsuchihashi N.; Ogata T.; Lin Y.; Yokoyama H.; Ishida S. Enhancement of nitroxide-reducing activity in rats after chronic administration of vitamin E, vitamin C, and idebenone examined by an in vivo electron spin resonance technique. *Magn Reson. Med.*, **1998**,*40*:330-333.
555. Chen K.; Glockner J. F.; Morse P. D.; Swartz H. M. Effects of oxygen on the metabolism of nitroxide spin labels in cells. *Biochemistry*, **1989**,*28*:2496-2501.
556. Twomey P.; Taira J.; DeGraff W.; Mitchell J. B.; Russo A.; Krishna M. C.; Hankovszky O. H.; Frank L.; Hideg K. Direct evidence for in vivo nitroxide free radical production from a new antiarrhythmic drug by EPR spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**,*22*:909-916.
557. Zhang R.; Pinson A.; Samuni A. Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**,*24*:66-75.
558. Wierzbza T.H., Musiał P., Cherek M., Nowak J., and Wypych Z. Tissue distribution and decay of tempol after its single intravenous or intraperitoneal injection. *Curr.Topics.Biophys.*, **2000**, **24**, 231-240.
559. Musiał P, Wierzbza T.H, and Nowak J. Tkankowa penetracja tempola po podaniu doustnym. *Ann.Acad.Med.Gedan.* **2001**,*31*, 121-127.
560. Almeida L. E.; Borissevitch I. E.; Yushmanov V. E.; Tabak M. Different Micellar Packing and Hydrophobicity of the Membrane Probes TEMPO and TEMPOL Influence Their Partition Between Aqueous and Micellar Phases Rather than Location in the Micelle Interior. *J. Colloid Interface Sci.*, **1998**,*203*:456-463.
561. McConnell H. M.; Wright K. L.; McFarland B. G. The fraction of the lipid in a biological membrane that is in a fluid state: a spin label assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1972**,*47*:273-281.
562. Ueda A.; Nagase S.; Yokoyama H.; Tada M.; Noda H.; Ohya H.; Kamada H.; Hirayama A.; Koyama A. Importance of renal mitochondria in the reduction of TEMPOL, a nitroxide radical. *Mol. Cell Biochem.*, **2003**,*244*:119-124.

563. Barron J. T.; Sasse M. F. Superoxide production and oxygen consumption in endothelium-intact and -denuded artery stimulated by angiotensin II. *Mol. Cell Biochem.*, **2005**,*280*:235-239.
564. Bergamini C. M.; Gambetti S.; Dondi A.; Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr. Pharm. Des.*, **2004**,*10*:1611-1626.
565. Buttemeyer R.; Philipp A. W.; Mall J. W.; Ge B.; Scheller F. W.; Lisdat F. In vivo measurement of oxygen-derived free radicals during reperfusion injury. *Microsurgery*, **2002**,*22*:108-113.
566. Makino A.; Skelton M. M.; Zou A. P.; Roman R. J.; Cowley A. W., Jr. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension*, **2002**,*39*:667-672.
567. Brovkovych V.; Patton S.; Brovkovych S.; Kiechle F.; Huk I.; Malinski T. In situ measurement of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite during endotoxemia. *J. Physiol Pharmacol.*, **1997**,*48*:633-644.
568. Ji L. L.; Fu R. G.; Waldrop T. G.; Liu K. J.; Swartz H. M. Myocardial response to regional ischemia and reperfusion in vivo in rat heart. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, **1993**,*71*:811-817.
569. Damerou W.; Ibel J.; Thurich T.; Assadnazari H.; Zimmer G. Generation of free radicals in Langendorff and working hearts during normoxia, hypoxia, and reoxygenation. *Basic Res. Cardiol.*, **1993**,*88*:141-149.
570. Grill H. P.; Zweier J. L.; Kuppusamy P.; Weisfeldt M. L.; Flaherty J. T. Direct measurement of myocardial free radical generation in an in vivo model: effects of postischemic reperfusion and treatment with human recombinant superoxide dismutase. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1992**,*20*:1604-1611.
571. Zweier J. L.; Flaherty J. T.; Weisfeldt M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987**,*84*:1404-1407.
572. Herak J. N.; Herak J. J. Electron paramagnetic resonance study of thermal decomposition of molecules. I. Barbituric acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**,*94*:7646-7649.
573. Auclair C.; de Prost D.; Hakim J. Superoxide anion production by liver microsomes from phenobarbital treated rat. *Biochem. Pharmacol.*, **1978**,*27*:355-358.
574. Okutomi T.; Nomoto K.; Nakamura K.; Goto F. Autogenous production of hydroxyl radicals from thiopental. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, **1995**,*39*:338-342.
575. Brown G. C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**,*1411*:351-369.
576. Stumpe T.; Decking U. K.; Schrader J. Nitric oxide reduces energy supply by direct action on the respiratory chain in isolated cardiomyocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2001**,*280*:H2350-H2356.
577. Monti E.; Supino R.; Colleoni M.; Costa B.; Ravizza R.; Gariboldi M. B. Nitroxide TEMPOL impairs mitochondrial function and induces apoptosis in HL60 cells. *J. Cell Biochem.*, **2001**,*82*:271-276.
578. Glebska J.; Skolimowski J.; Kudzin Z.; Gwozdziński K.; Grzelak A.; Bartosz G. Pro-oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**,*35*:310-316.
579. Wilkin J. K. Poiseuille, periodicity, and perfusion: rhythmic oscillatory vasomotion in the skin. *J. Invest Dermatol.*, **1989**,*93*:113S-118S.
580. Wronski T.; Persson P. B.; Seeliger E.; Harnath A.; Flemming B. Coupling of left ventricular and aortic volume elasticity in the rabbit. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol*, **2000**,*279*:R539-R547.
581. Hyndman B. W. The role of rhythms in homeostasis. *Kybernetik.*, **1974**,*15*:227-236.
582. Avolio A.; Qasem A.; Park Y. J. Noninvasive estimation of baroreflex sensitivity using pressure pulse amplification. *IEEE Eng Med. Biol. Mag.*, **2001**,*20*:53-58.
583. O'Rourke M. F. Wave travel and reflection in the arterial system. *J. Hypertens. Suppl.*, **1999**,*17*:S45-S47.
584. Simon G. Experimental evidence for blood pressure-independent vascular effects of high sodium diet. *Am. J. Hypertens.*, **2003**,*16*:1074-1078.
585. Danchin N.; Benetos A.; Lopez-Sublet M.; Demicheli T.; Safar M.; Mourad J. J. Aortic pulse pressure is related to the presence and extent of coronary artery disease in men undergoing diagnostic coronary angiography: a multicenter study. *Am. J. Hypertens.*, **2004**,*17*:129-133.
586. Weber T.; Auer J.; Eisserer G.; Berent R.; Eber B.; O'Rourke M. F. Arterial stiffness and cardiovascular drugs. *Curr. Pharm. Des.*, **2003**,*9*:1049-1063.
587. Roach M. R.; Burton A. C. The effect of age on the elasticity of human iliac arteries. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1959**,*37*:557-570.
588. Wierzba T.H., Cherek M., Wszędybył-Winklewska M., Wypych Z. Effect of substituted piperidine nitroxides on functional characteristics of the isolated heart challenged with ischemia. *Med.Sport*. **2001**,*17*, S44-S48.
589. Snoeckx L. H.; van der Vusse G. J.; Coumans W. A.; Willemsen P. H.; Reneman R. S. Differences in ischaemia tolerance between hypertrophied hearts of adult and aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, **1993**,*27*:874-881.
590. Chung Y. Oxygen reperfusion is limited in the postischemic hypertrophic myocardium. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2006**,*290*:H2075-H2084.
591. Itter G.; Jung W.; Juretschke P.; Schoelkens B. A.; Linz W. A model of chronic heart failure in spontaneous hypertensive rats (SHR). *Lab Anim*, **2004**,*38*:138-148.

592. Kammermeier M.; Grobecker H. F. Cardiotoxicity of catecholamines after application of L-DOPA in Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Hypertens. Res.*, **1995**,*18 Suppl 1*:S165-S168.
593. Lassegue B.; Griendling K. K. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am. J. Hypertens.*, **2004**,*17*:852-860.
594. Zimmerman M. C.; Davissou R. L. Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2004**,*84*:125-149.
595. Wierzbicka T.H, Borkowski T., and Gawiński Ł. Do antioxidants play with heart rate variability? *Proc.Progr.Biomed.Sci.(Bertoli E., Usukura J., Tanaka M., red.)*, Gdańsk, **2004**, 1, 11-18:
596. Borkowski T and Wierzbicka T.H. Wpływ kwasu askorbinowego na zmienność rytmu serca (HRV) u szczura jako przykład możliwości regulacyjnego działania antyoksydantów. *Kardiochir.Torakochir.Pol.* **2004**,*1*, 191-198..
597. Zhang Y.; Jang R.; Mori T. A.; Croft K. D.; Schyvens C. G.; McKenzie K. U.; Whitworth J. A. The antioxidant Tempol reverses and partially prevents adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *J. Hypertens.*, **2003**,*21*:1513-1518.
598. Williams J. M.; Pollock J. S.; Pollock D. M. Arterial pressure response to the antioxidant tempol and ETB receptor blockade in rats on a high-salt diet. *Hypertension*, **2004**,*44*:770-775.
599. Xu H.; Bian X.; Watts S. W.; Hlavacova A. Activation of vascular BK channel by tempol in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension*, **2005**,*46*:1154-1162.
600. Liu J. L.; Murakami H.; Zucker I. H. Effects of NO on baroreflex control of heart rate and renal nerve activity in conscious rabbits. *Am. J. Physiol.*, **1996**,*270*:R1361-R1370.
601. Lu N.; Helwig B. G.; Fels R. J.; Parimi S.; Kenney M. J. Central Tempol alters basal sympathetic nerve discharge and attenuates sympathetic excitation to central ANG II. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **2004**,*287*:H2626-H2633.
602. Mayorov D. N.; Head G. A.; De Matteo R. Tempol attenuates excitatory actions of angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla during emotional stress. *Hypertension*, **2004**,*44*:101-106.
603. Jeneson J. A.; Westerhoff H. V.; Kushmerick M. J. A metabolic control analysis of kinetic controls in ATP free energy metabolism in contracting skeletal muscle. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **2000**,*279*:C813-C832.
604. Tonkonogi M.; Walsh B.; Svensson M.; Sahlin K. Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *J. Physiol.*, **2000**,*528 Pt 2*:379-388.
605. Urso M. L.; Clarkson P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, **2003**,*189*:41-54.
606. Husain K.; Hazelrigg S. R. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart. *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**,*1587*:75-82.
607. Kuru O.; Senturk U. K.; Demir N.; Yesilkaya A.; Erguler G.; Erkilic M. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur. J. Appl. Physiol*, **2002**,*87*:134-140.
608. Husain K. Exercise conditioning attenuates the hypertensive effects of nitric oxide synthase inhibitor in rat. *Mol. Cell Biochem.*, **2002**,*231*:129-137.
609. Hojna S.; Kadlecova M.; Dobesova Z.; Valouskova V.; Zicha J.; Kunes J. The participation of brain NO synthase in blood pressure control of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol. Cell Biochem.*, **2007**,*297*:21-29.
610. Kumar U.; Chen J.; Sapozhnikov V.; Canteros G.; White B. H.; Sidhu A. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hypertens.*, **2005**,*27*:17-31.
611. Wu C. C.; Hong H. J.; Chou T. C.; Ding Y. A.; Yen M. H. Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**,*228*:459-466.
612. Li Li.J. Free radicals and antioxidants in exercise and sports. W: *Exercise and Sport Science (Garret W E Jr., Kirkendall D.T. red.)*; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2000**: 299-317.
613. Murakami T.; Shimomura Y.; Fujitsuka N.; Nakai N.; Sugiyama S.; Ozawa T.; Sokabe M.; Horai S.; Tokuyama K.; Suzuki M. Enzymatic and genetic adaptation of soleus muscle mitochondria to physical training in rats. *Am. J. Physiol.*, **1994**,*267*:E388-E395.
614. Rasmussen U. F.; Krstrup P.; Bangsbo J.; Rasmussen H. N. The effect of high-intensity exhaustive exercise studied in isolated mitochondria from human skeletal muscle. *Pflugers Arch.*, **2001**,*443*:180-187.

