

The effect of oxidative stress on acetylcholine-induced relaxation in deendothelized arteries

Úloha oxidačného stresu v acetylcholínom vyvolanej vazorelaxácii pri deendotelizovaných artériách

Berényiová A, Kristek F, Dovinová I, Drobná M, Čáčányiová S

Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Berényiova A, Kristek F, Dovinova I, Drobna M, Cacaniová S. **The effect of oxidative stress on acetylcholine-induced relaxation in deendothelized arteries.** Cardiology Lett. 2014;23(6):397–404

Abstract. *Aim:* Nitric oxide (NO) participates in the local control of the cardiovascular system, causing dilation of smooth muscle cells in the vascular wall. NO production is realized via endothelial cells in response to vasorelaxants (such as acetylcholine). The endothelial layer was regarded as the primary source of NO; however, it was found that the smooth muscle cells of endothelium-denuded arteries expressed functional NO synthase and are capable of production. We hypothesized that the destruction of the anatomical integrity induced by mechanical denudation of endothelial layer induces an insensibility of vessels to the vasodilators as a consequence of oxidative stress. The aim of this study was to investigate whether the loss of acetylcholine-induced vasorelaxation in endothelium-denuded arteries could be induced by a decrease in a non-endothelial NO, as a consequence of oxidative stress.

Methods: Vasorelaxant responses were followed in arteries (thoracic aorta, pulmonary artery) isolated from male Wistar rats. The production of superoxide radicals was measured using a lucigenin chemiluminescence method in endothelium-preserved and endothelium-denuded arteries.

Results: While an acetylcholine-induced vasorelaxation was observed in all arteries with intact endothelium, this effect was inhibited in deendothelized rings. Acute application of tempol, a free-radical scavenger, refreshed the inhibited acetylcholine vasorelaxation in endothelium-denuded arteries. The following application of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ), a guanylate cyclase inhibitor, and/or N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), an inhibitor of NO-synthase, blocked the beneficial effect of tempol. Chemiluminescent assay showed that an injury to the endothelial layer increased the production of superoxide radicals which was decreased after tempol administration.

Conclusions: This study showed that the inhibition of vasorelaxation in deendothelized arteries could be a consequence of oxidative stress which eliminated the non-endothelial source of NO. The findings confirmed that the non-endothelial source of NO represented a reserve source of active NO and challenged the concept of the obligatory role of endothelial cells in vasorelaxation. Fig. 4, Ref. 41, Online full text (Free, Pdf) www.cardiology.sk

Key words: vasorelaxation – nitric oxide – endothelial denudation – oxidative stress – acetylcholine – superoxid dismutase – N^G-nitro-L-arginine methylester

Berényiová A, Kristek F, Dovinová I, Drobná M, Čáčányiová S. **Úloha oxidačného stresu v acetylcholínom vyvolanej vazorelaxácii pri deendotelizovaných artériách.** Cardiology Lett. 2014;23(6):397–404

Abstrakt. *Ciele:* Oxid dusnatý (NO) sa tvorí v endoteli ako odpoveď na vazorelaxačné látky (vrátane acetylcholínu) a vyvoláva relaxáciu hladkých svalových buniek cievnej steny. Expresia NO-syntázy, enzýmu pre syntézu NO, však bola potvrdená aj v hladkých svalových bunkách deendotelizovaných ciev. Podľa našej hypotézy deštrukcia anatomickej integrity cievy vyvolaná mechanickým odstránením jej endotelovej vrstvy prudko

znižuje citlivosť ciev na vazorelaxačné látky v dôsledku vzniknutého oxidačného stresu. Cieľom štúdie bolo zistiť, či strata acetylcholínom vyvolanej vazorelaxácie pozorovanej pri deendotelizovaných artériách môže byť sprostredkovaná elimináciou neendotelového zdroja NO v dôsledku spustenia oxidačného stresu.

Metódy: Relaxačné odpovede artérií (hrudná aorta, pľúcna artéria) izolovaných zo samcov potkanov (Wistar) boli sledované snímaním zmien izometrickej tenzie. Produkcia superoxidových radikálov bola stanovená chemiluminiscenčnou metódou s použitím lucigenínu.

Výsledky: Pri všetkých cievach so zachovalým endotelom acetylcholín vyvolal vazorelaxáciu, ktorá bola po mechanickej deendotelizácii inhibovaná. Predradené podávanie vychytávača voľných radikálov – tempolu – zväčšilo inhibovanú acetylcholínom indukovanú vazorelaxáciu deendotelizovaných cievnych preparátov. Následná aplikácia inhibítora guanylát cyklázy (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalínu-1; ODO), respektíve inhibítora NO-syntázy (N^G -nitro-L-arginín metylesteru; L-NAME), efekt tempolu zablokovala, vazorelaxačná odpoveď bola opäť zainhibovaná. Chemiluminiscenčné meranie ukázalo, že odstránenie endotelu pri oboch typoch artérií zvýšilo produkciu superoxidových radikálov. Aplikácia tempolu však dokázala zvýšenú produkciu radikálov zainhibovať.

Záver: Naše výsledky ukazujú, že inhibícia vazorelaxácie deendotelizovaných ciev môže byť sprostredkovaná oxidačným stresom, ktorý eliminuje neendotelové zdroje NO. Tieto nálezy potvrdili, že neendotelové zdroje NO predstavujú záložný zdroj fyziologicky aktívneho NO a spochybniť koncepciu nevyhnutnosti endotelových buniek pre vazorelaxačné odpovede. Obr. 4, Lit. 41, Online full text (Free, Pdf) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: vazorelaxácia – oxid dusnatý – deendotelizácia – oxidačný stres – acetylcholín – superoxid-dismutáza – N^G -nitro-L-arginín metylester

Do regulácie krvného tlaku a cievneho tonusu sa zapájajú nervové i humorálne mechanizmy pôsobiace centrálné i lokálne. Významné miesto zastáva lokálna regulácia cievneho tonusu, ktorej hlavnou súčasťou je uvoľňovanie vazorelaxačných a vazokonstriktorických látok cievnu stenou. Za fyziologických podmienok je táto bilancia posunutá v prospech vazodilatátorov. Hlavným mediátorom od endotelu závislej relaxácie je endotelový vazorelaxačný faktor, oxid dusnatý (NO). Väčšina informácií o úlohe NO v regulácii cievneho tonusu sa spája najmä s NO produkovaným endotelovými bunkami, ktorý predstavuje väčšinovú produkciu NO cievnu stenou. Primárnym cieľom NO je guanylát cykláza v hladkosvalových bunkách. Vrstva tunica media cievnej steny, tvorená predovšetkým hladkými svalovými bunkami, bola považovaná za pasívneho príjemcu NO produkovaného endotelom. Túto interpretáciu o parakrinnej úlohe NO v rámci cievnej steny postupne nahrádza hypotéza o autokrinnom účinku NO priamo v hladkosvalových bunkách. Buchwalow a spol. (1) použili viaceré metodiky (imunocytochemické značenie, elektrónová mikroskopia, Western blott a RT-PCR), ktorými dokázali prítomnosť endotelovej NO-syntázy (eNOS) aj v mediálnej svalovej vrstve ciev tak elastického (hrudná a brušná aorta), ako aj svalového (renálna artéria) typu. Taktiež sa potvrdila expresia neuronálnej izoformy NOS (nNOS) v hladkých svalových bunkách pri rôznych typoch artérií (1, 2). Všetky tieto štúdie dokazujú síce prítomnosť dvoch konštitutívnych izoform NOS v hladkých svalových bunkách, ale otázka, či NO produkovaný v mediálnej vrstve cievnej steny je fyziologicky relevantný, ostáva nezodpovedaná. Charpie a Webb (3) boli jednými z prvých, ktorí poskytli dôkaz, že hladkosvalovými myocytmi uvoľnený NO moduluje cievny tonus hrudnej aorty potkana. Ich pozorovanie, že kontraktilné

odpovede vyvolané acetylcholínom boli v deendotelizovanej aorte väčšie v prítomnosti inhibítora NOS potvrdili, že NO uvoľnený mediálnou vrstvou cievnej steny pôsobí ako autokrinný faktor limitujúci kontraktilnú aktivitu. Potenciálny význam NOS lokalizovanej v hladkých svalových bunkách potvrdili aj Schwarz a spol. (4), ktorí ukázali, že sa v hladkých svalových bunkách ciev pri zvýšenej hladine voľných iónov Ca^{2+} zvyšuje expresia NOS a jej aktivita môže mať významný vplyv na cievny tonus.

Uvedené histochemické a funkčné dôkazy expresie a aktivity NOS v hladkých svalových bunkách naznačujú možnú úlohu NO z neendotelových zdrojov vo vazorelaxačných reakciách ciev. V prírodných artériách, kde NO je primárnou vazorelaxačnou látkou, však poškodenie endotelovej vrstvy vedie k eliminácii relaxačnej odpovede. Už v roku 1980 Furchgott a Zawadzki (5) ukázali, že deendotelizácia hrudnej aorty vedie k strate citlivosti a relaxačnej odpovede na acetylcholín, čím naznačili nevyhnutnosť prítomnosti endotelovej výstelky a z nej uvoľňovaného NO na zachovanie vazorelaxačných vlastností cievnej steny. Pokusy, pri ktorých boli artérie vystavené mechanickej odstráneniu endotelu, však opomínali stratu anatomickej integrity materiálu. Poškodenie anatomickej celistvosti cievnej steny prostredníctvom deendotelizácie poruší myo-endotelovú komunikáciu cez gap-junction v hladkých svalových bunkách ciev (6). Navyše, patologický zásah do štruktúry cievnej steny iniciuje produkciu voľných kyslíkových radikálov. Mnohé štúdie potvrdili, že tvorba voľných radikálov je odpoveďou ciev na poškodenie a je sprevádzaná výraznou zmenou oxidačno-redukčnej rovnováhy v rámci cievnej steny a zvýšenou produkciou superoxidových radikálov (7 – 10). Známe je, že superoxidové ióny rýchlo a ľahko reagujú s molekulami

NO, čím výrazne redukuje jeho bioaktivitu a biodostupnosť (11, 12). V rámci poškodennej cievnej steny sú okrem iných buniek aj hladké svalové bunky a membránovo viazaná NADPH-oxidáza artériových myocytov schopné produkovať superoxidové radikály, a to tak intracelulárne, ako aj extracelulárne (13 – 15). Ďalšie výsledky dokazujú nielen zvýšenú produkciu voľných kyslíkových radikálov po odstránení endotelovej vrstvy, ale zároveň považujú vnútornú endotelovú výstelku za ochrannú bariéru proti oxidačnému stresu (16, 17). Antioxidačný obranný systém je zastúpený intracelulárnou superoxidodismutázou (SOD) 1, 2 a extracelulárnou SOD3. SOD3 je produkovaná predovšetkým hladkosvalovými bunkami ciev, svoju činnosť vykonáva v interstíciu, medzi endotelovými a hladkosvalovými bunkami. Jej prvotnou úlohou je ochrana NO difundujúceho z endotelu a jej lokalizácia je dôležitá pre endotel závislú vazorelaxáciu (18). Veľké množstvo SOD3 bolo dokázané imunohistochemickou analýzou aj vo vnútornej vrstve cievnej steny, v intíme (19, 20). Poškodenie intimy môže teda viesť nielen k oslabeniu tvorby NO, ale aj narušeniu produkcie SOD3 v rámci endotelu.

Na základe uvedených nálezov možno skonštatovať, že po deendotelizácii sa spustí oxidačný stres, ktorý môže eliminovať NO produkovaný z neendotelových zdrojov, akými sú hladkosvalové bunky cievnej steny. Navyše, superoxidové ióny môžu priamo navodiť vazokonstrikciu (21). Takže necitlivosť deendotelizovaných ciev na vazorelaxačné látky, napríklad acetylcholín, môže byť sprostredkovaná oxidačným stresom, ktorý bol vyvolaný deštrukciou intimy cievnej steny. V našej predchádzajúcej imunohistochemickej a fyziologickej štúdii (22) sme demonštrovali expresiu všetkých troch izoform NOS v hladkých svalových bunkách deendotelizovaných prírodných artérií potkana, v množstve postačujúcom na vyvolanie vazorelaxačnej odpovede. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať, či absencia acetylcholínom vyvolanej vazorelaxácie môže byť vyvolaná elimináciou tohto zdroja NO v dôsledku spustenia oxidačného stresu po deendotelizácii ciev.

Materiál a metódy

Experimentálne zvieratá

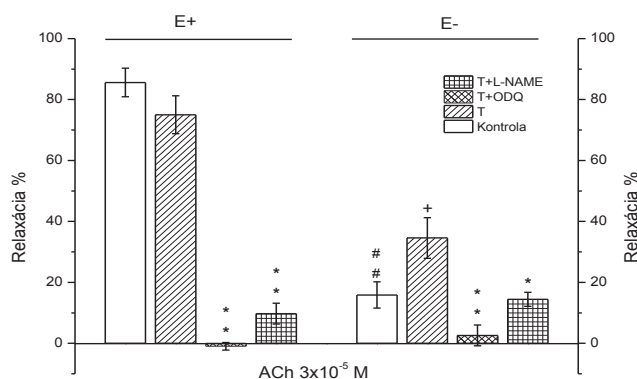
Experimenty na zvieratách sa uskutočnili v súlade s predpismi Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR a Etickej komisie Slovenskej akadémie vied. Do experimentov boli zahrnuté samce Wistar potkanov (200 – 250 g; n = 10). Zvieratá boli chované v podmienkach striedajúcich cyklus 12 hodín svetlo – 12 hodín tma, pri konštantnej teplote a vlhkosti, štandardné krmivo a voda im bolo poskytnuté ad libidum. Ústav normálnej a patologickej fyziológie zabezpečoval ich kompletnú veterinárnu kontrolu.

Funkčné in vitro štúdie

Potkany boli usmrtené dekapitáciou po krátkej CO₂ anestéze. Hrudná aorta a pľúcna artéria zvierat boli odobraté, očistené od okolitého tkaniva a nakrájané na prúžky (4 mm dĺžky). Cievne preparáty boli vertikálne zafixované na trojuholníky z nehrdzavejúcej ocele a ponorené do 20 ml orgánovej vaničky obsahujúcej Krebsov roztok (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂, 11 mM glukóza, 0,032 mM CaNa₂EDTA) a inkubované pri teplote 37 °C. Roztok bol prekysličený zmesou O₂ (95 %) a CO₂ (5 %). Horný trojuholník bol spojený s elektromechanickým snímačom (Experimetria, Maďarsko), zmeny izometrickej tenzie boli zaznamenané pomocou AD prevodníka a programom Dewetron software. Pri každom prstenci bolo aplikované predpätie 1 g. Následne sa preparáty ustalovali 60 – 90 minút až do dosiahnutia ustálenej tenzie. Na niektorých cievnych prúžkoch bola odstránená vnútorná endotelová vrstva jemným trením s vatou obaleným drôtkom. Funkčnosť endotelu sa mapovala pri všetkých preparátoch vyšetrením schopnosti podávaného acetylcholínu (10⁻⁵ M) vyvolať vazodilatáciu na fenylefrínom predkontrahovanej cieve (10⁻⁶ M). Po dosiahnutí vyrovnanej tenzie sa aplikovala dávka acetylcholínu vyvolávajúca maximálnu relaxáciu (3 x 10⁻⁵ M). Po vypláchnutí inkubačného média, 20 minút pred opakovaným podaním fenylefrínu a acetylcholínu bol predradene aplikovaný tempol (3 x 10⁻³ M) s/alebo bez inhibítora guanýlát cyklázy (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-α]quinoxalín-1, ODQ, 10⁻⁵ M), respektíve s/alebo bez inhibítora NOS (N^G-nitro-L-arginín metylester, L-NAME, 10⁻⁵ M pri pľúcnej artérii, 10⁻⁴ M pri hrudnej aorte). Relaxačná odpoveď sa vyjadrovala percentuálne, ako úbytok fenylefrínovej kontrakcie.

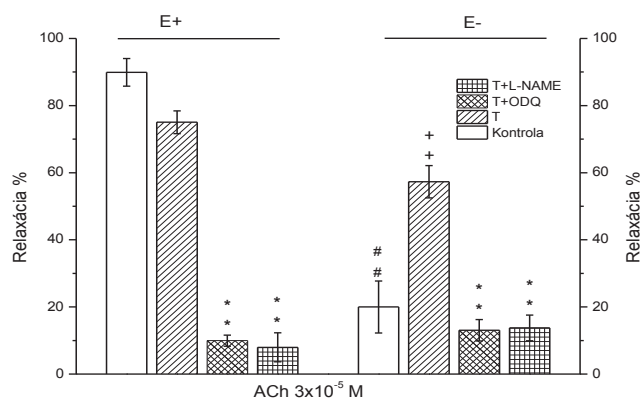
Kvantifikácia hladiny superoxidu chemiluminiscenčnou metódou s použitím lucigenínu

Tvorba superoxidov bola stanovená na rezoch hrudnej aorty a pľúcnej artérie pomocou chemiluminiscenčnej metódy s použitím lucigenínu. Chemiluminiscenciu produkuje reakcia lucigenínu so samotnými superoxidmi, ktoré dávajú silný signál. Na meranie vzoriek sa použil roztok lucigenínu (50 μM) v Krebsovom pufri, tak ako bolo uvedené v predchádzajúcej literatúre (23), s nasledovnými modifikáciami. Hrudná aorta a pľúcna artéria po deendotelizácii, ako aj kontrolné vzorky s endotelom boli narezané na prstence s hmotnosťou 15 mg, uskladnené pri 4 °C v PBS, na 15 – 20 minút. Roztok lucigenínu, ako aj samotné vzorky sa inkubovali pri 37 °C v tme, počas 15 minút. Pozadie lucigenínového roztoku sa meralo 3 minúty pred a 3 minúty po meraní príslušných vzoriek. Prstence aorty a pľúcnej artérie sa deendotelizovali 30 s v roztoku bez, respektíve s pridaním tempolu (3 x 10⁻³ M). Hladina superoxidu sa merala 5 minút v roztoku lucigenínu na luminometri Turner Designs



Obrázok 1 Vplyv aplikácie vychytávača voľných radikálov tempolu (3×10^{-3} M); inhibítora guanylát cyklázy (ODQ; 10^{-5} M) a inhibítora NOS (L-NAME; 10^{-4} M) na maximálnu relaxačnú odpoveď vyvolanú acetylcholínom (ACh) v hrudnej aorte so zachovanou (E+; $n = 10$) a poškodenou (E-; $n = 10$) endotelovou vrstvou. 20 minút pred kontrakciou vyvolanou fenylefrínom (10^{-6} M) sa predradene aplikoval tempol (T), tempol a ODQ (T+ODQ), respektíve tempol a L-NAME (T+L-NAME). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. T; * $p < 0,05$ vs. Kontrola (E-), ** $p < 0,01$ vs. Kontrola (E+)

Figure 1 The effect of free radical scavenger tempol (3×10^{-3} M); guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 10^{-5} M) and NOS inhibitor (L-NAME; 10^{-4} M) on maximal relaxant response induced by acetylcholine (ACh) in endothelium-preserved and endothelium-denuded thoracic aorta. Tempol (T), tempol and ODQ (T+ODQ), tempol and L-NAME (T+L-NAME) were administered 20 min before phenylephrine (10^{-6} M) – induced contraction. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. T; * $p < 0,05$ vs. Control (E-), ** $p < 0,01$ vs. Control (E+)



Obrázok 2 Vplyv aplikácie vychytávača voľných radikálov tempolu (3×10^{-3} M); inhibítora guanylát cyklázy (ODQ; 10^{-5} M) a inhibítora NOS (L-NAME; 10^{-4} M) na maximálnu relaxačnú odpoveď vyvolanú acetylcholínom (ACh) v pľúcnej artérii so zachovanou (E+; $n = 10$) a poškodenou (E-; $n = 10$) endotelovou vrstvou. 20 minút pred kontrakciou vyvolanou fenylefrínom (10^{-6} M) sa predradene aplikoval tempol (T), tempol a ODQ (T+ODQ), resp. tempol a L-NAME (T+L-NAME). ** $p < 0,01$ vs. T; ** $p < 0,01$ vs. Kontrola (E-), ** $p < 0,01$ vs. Kontrola (E+)

Figure 2 The effect of free radical scavenger tempol (3×10^{-3} M); guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 10^{-5} M) and NOS inhibitor (L-NAME; 10^{-4} M) on maximal relaxant response induced by acetylcholine (ACh) in endothelium-preserved and endothelium-denuded pulmonary artery. Tempol (T), tempol and ODQ (T+ODQ), tempol and L-NAME (T+L-NAME) were administered 20 min before phenylephrine (10^{-6} M) – induced contraction. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. T; * $p < 0,05$ vs. Control (E-), ** $p < 0,01$ vs. Control (E+)

TD-20/20 a zmeny v hladinách superoxidu boli vyjadrené v relatívnych luminiscenčných jednotkách (RLU).

Štatistická analýza

Hodnoty boli vyjadrované ako priemerná hodnota $\pm$ S.E.M. Štatistická významnosť medzi jednotlivými skupinami sa hodnotila jednofaktorovou analýzou variancie (ANOVA) a následne Boniferroniho testom a párovým Student's t-testom. Rozdiely medzi priemermi sa považovali za štatisticky významné na hladine významnosti $p < 0,05$.

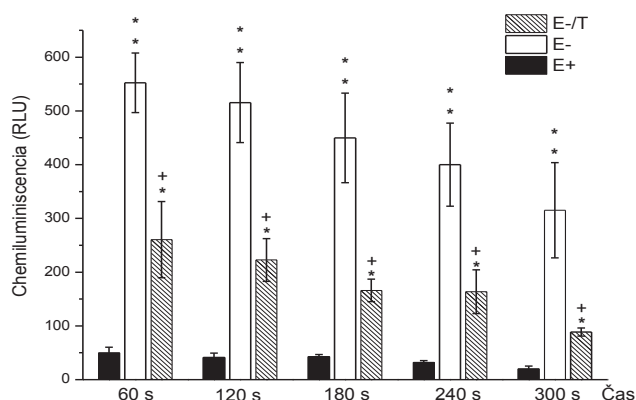
Výsledky

Funkčné in vitro štúdie

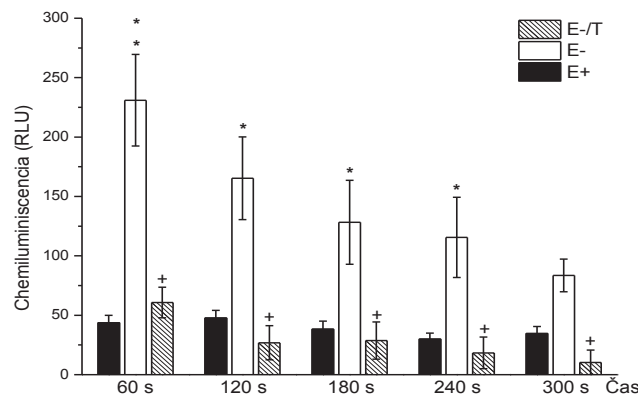
V prstencoch hrudnej aorty s nepoškodeným endotelom ($n = 10$) vyvolalo podanie acetylcholínu (3×10^{-5} M) relaxáciu, ktorej maximum dosiahlo $85 \pm 4,69$ % (obrázok 1, E+). Predradená aplikácia tempolu (3×10^{-3} M), vychytávača voľných radikálov, ktorý napodobňuje superoxididizmutázu, nemalo efekt na relaxačnú odpoveď vyvolanú acetylcholínom. Spoločná aplikácia tempolu s ODQ (10^{-5} M), inhibítorom gu-

anylát cyklázy, alebo s L-NAME (10^{-4} M), inhibítorom NOS, významne inhibovala acetylcholínom vyvolanú vazorelaxáciu ($p < 0,01$) (obrázok 1, E+). Pri deendotelizovaných cievnych preparátoch ($n = 10$) bola acetylcholínom vyvolaná relaxačná odpoveď v porovnaní s prstencami so zachovaným endotelom významne inhibovaná, maximálna relaxácia bola len $15,85 \pm 4,31$ % ($p < 0,01$) (obrázok 1, E-). Podávanie tempolu významne (aj keď len mierne) obnovilo acetylcholínom indukovanú vazorelaxáciu, ktorej maximum dosiahlo $34,58 \pm 6,65$ % ($p < 0,05$). Táto zväčšená relaxácia bola signifikantne blokována tak po podávaní ODQ (10^{-5} M) ($p < 0,01$), ako aj po aplikácii L-NAME (10^{-4} M) ($p < 0,05$) (obrázok 1, E-).

Podávanie tempolu nemalo žiadny efekt tak na bazálny tonus hrudnej aorty, ako ani na kontrakciu indukovanú fenylefrínom (cievy s endotelom: $3,34 \pm 0,46$ g vs. $3,61 \pm 0,36$ g po podávaní tempolu, $p > 0,05$; cievy bez endotelu: $2,75 \pm 0,3$ g vs. $2,77 \pm 0,55$ g po podávaní tempolu, $p > 0,05$). Taktiež sme testovali modulačný efekt (možný relaxačný efekt) samotného tempolu (3×10^{-3} M) na fenylefrínom prekontrahovaných artériách. Tempol aditívne zvýšil fenylefrínom vyvolanú kontrakciu o $28,2 \pm 4,06$ % ($p < 0,05$) pri preparátoch s intaktným endotelom a nemal žiadny efekt pri deendotelizovaných prúžkoch (tonus kontrakcie vyvolanej fenylefrínom bol nesignifikantne zvýšený $8,53 \pm 5,02$ % ($p > 0,05$)).



Obrázok 3 Zmena produkcie superoxidových radikálov v hrudnej aorte so zachovanou (E+; n = 10) a poškodenou (E-; n = 10) endotelovou vrstvou a v hrudnej aorte s poškodenou endotelovou vrstvou po pridaní vychytávača voľných radikálov tempolu (E-/T; n = 6). *p < 0,05; **p < 0,01 vs. E+; + p < 0,05 vs. E-
Figure 3 Changes in superoxide radical production in endothelium-preserved (E+; n=10) and endothelium-denuded (E-; n=10) thoracic aorta after administration of free radical scavenger tempol (E-/T; n=6). *p < 0.05; **p < 0.01 vs. E+; + p < 0.05 vs. E-



Obrázok 4 Zmena produkcie superoxidových radikálov v pľúcnej artérii so zachovanou (E+; n = 10) a poškodenou (E-; n = 10) endotelovou vrstvou a v pľúcnej artérii s poškodenou endotelovou vrstvou po pridaní vychytávača voľných radikálov tempolu (E-/T; n = 6). *p < 0,01 vs. E+; + p < 0,05 vs. E-
Figure 4 Changes in superoxide radical production in endothelium-preserved (E+; n=10) and endothelium-denuded (E-; n=10) pulmonary artery after administration of free radical scavenger tempol (E-/T; n=6). *p < 0.05; **p < 0.01 vs. E+; + p < 0.05 vs. E-

Pri prstencoch pľúcnej artérie s nepoškodeným endotelom (n = 10) vyvolalo podanie acetylcholínu (3×10^{-5} M) relaxáciu, ktorej maximum dosiahlo $89 \pm 4,12$ % (**obrázok 2, E+**). Predradenie tempolu (3×10^{-3} M) nemalo efekt na relaxačnú odpoveď vyvolanú acetylcholínom. Spoločná aplikácia tempolu s ODQ (10^{-5} M) alebo s L-NAME (10^{-4} M), významne inhibovala acetylcholínom vyvolanú vazorelaxáciu (p < 0,01) (**obrázok 2, E+**). Pri deendotelizovaných cievnych preparátoch (n = 10) bola v porovnaní s prstencami so zachovalým endotelom významne inhibovaná relaxačná odpoveď na podávaný acetylcholín, maximálna relaxácia bola len $19,99 \pm 7,76$ % (p < 0,01) (**obrázok 2, E-**). Podávanie tempolu signifikantne obnovilo acetylcholínom indukovanú vazorelaxáciu, ktorá dosiahla maximum $57,32 \pm 4,81$ % (p < 0,01). Táto zväčšená relaxácia bola signifikantne inhibovaná tak po podávaní ODQ (10^{-5} M), ako aj po aplikácii L-NAME (10^{-5} M) (p < 0,01) (**obrázok 2, E-**).

Podávanie tempolu nemalo žiadny efekt tak na bazálny tonus pľúcnej artérie, ako ani na kontrakciu indukovanú fenylefrínom (cievy s endotelom: $3,37 \pm 0,49$ g vs. $2,86 \pm 0,38$ g po podávaní tempolu, p > 0,05; cievky bez endotelu: $2,47 \pm 0,13$ g vs. $3,16 \pm 0,42$ g po podávaní tempolu, p > 0,05). Podávanie samotného tempolu (3×10^{-3} M) nemalo vplyv na fenylefrínom vyvolanú kontrakciu pri preparátoch s intaktným endotelom (cievny tonus bol nesignifikantne znížený po podávaní tempolu o $6,12 \pm 5,66$ % (n = 6; p > 0,05), ani pri preparátoch s poškodenou endotelovou vrstvou (cievny tonus bol nesignifikantne znížený po podávaní tempolu o $8,38 \pm 6,8$ % (n = 6; p > 0,05)).

Kvantifikácia hladiny superoxidu chemiluminiscenčnou metódou s použitím lucigenínu

Odstránenie endotelu zvýšilo tvorbu superoxidových radikálov za časovú jednotku pri prstencoch hrudnej aorty aj pľúcnej artérie. Silný a ireverzibilný nárast produkcie radikálov sa pozoroval v prípade hrudnej aorty, kde deendotelizované prúžky produkovali signifikantne vyšší počet radikálov ako kontrolné cievy (n = 10; p < 0,01) (**obrázok 3**). V prípade pľúcnej artérie bolo zvýšenie produkcie voľných radikálov menšie v porovnaní s hrudnou aortou. Po deendotelizácii pľúcnej artérie sa produkcia superoxidu významne zvýšila oproti kontrolným cievam (n = 10; p < 0,025; p < 0,01) (**obrázok 4**). Aplikácia tempolu štatisticky významne redukovala produkciu superoxidových radikálov v hrudnej aorte (n = 6; p < 0,05) (**obrázok 3**) aj v pľúcnej artérii (n = 6; p < 0,05) (**obrázok 4**).

Diskusia

Myšlienka, že endotelové bunky zohrávajú nevyhnutnú úlohu v relaxácii hladkých svalových buniek cievnej steny je založená na predpoklade, že NO produkovaný pomocou NO-syntáz difunduje z endotelových buniek do prilahlej vrstvy hladkej svaloviny, kde vyvoláva relaxáciu. V tejto štúdii sme však potvrdili, že aj pri deendotelizovaných cievach je acetylcholín schopný vyvolať vazorelaxáciu sprostredkovanú NO a cGMP, a to po odstránení oxidačného stresu. Ďalším

dôležitým nálezom tejto štúdie je dôkaz, že deendotelizácia – mechanické poškodenie vnútornej vrstvy steny prírodných ciev je sprevádzané zvýšenou produkciou superoxidových radikálov, ktorých prítomnosť sa významne redukovala po aplikácii vychytávača voľných radikálov.

Skutočnosť, že poškodenie cievnej steny prudko zmení oxidačno-redukčnú rovnováhu, vrátane produkcie voľných radikálov a tio-disulfid nevyváženosti, ukázali už Souza a spol. (19). Podobne, narušené oxidačno-redukčné procesy boli zaznamenané aj krátko po narušení integrity *a. iliaca* u kráľika, ktoré bolo vyvolané balónikovaním cievy (7). Superoxidové radikály majú krátku životnosť a sú nabité, preto neprenikajú cez bunkovú membránu vo veľkých množstvách. Avšak na základe „kindling-bonfire“ teórie, môžeme predpokladať, že v poškodených cievach sa v dôsledku oxidačného stresu spustí tvorba nielen primárnych, ale aj sekundárnych a terciárnych zdrojov voľných kyslíkových radikálov: tvorba jedného voľného radikálu môže viesť k produkcii iných radikálov v sérii viacerých oxido-redukčných reakcií (24, 25). Z toho dôvodu iníciačná zvýšená produkcia superoxidových radikálov môže vyvolať tvorbu iných radikálov, čím sa aktivujú mechanizmy na elimináciu NO z neendotelových zdrojov. Naš nález potvrdzujúci, že predradená aplikácia tempolu znovu obnovila vazorelaxačnú odpoveď v deendotelizovanej hrudnej aorte i pľúcnej artérii plne podporuje túto hypotézu. Zároveň sme ukázali, že podávanie tempolu významne znižuje produkciu superoxidových radikálov u deendotelizovaných ciev. Antioxidačné schopnosti tempolu sú založené na vychytávaní rôznych radikálov, akými sú radikály karboxylových kyselín, OH radikály, peroxylové radikály, radikály dusíkatých zlúčenín a tiolové radikály, pričom sám tempol s NO neinteraguje (26). Tempol je stabilný nitroxidový radikál s nízkou molekulovou hmotnosťou a schopnosťou penetrovať sa cez bunkovú membránu a vychytávať intra- aj extracelulárne škodlivé reaktívne prvky kyslíka (27). Navyše, keďže nami používaná koncentrácia tempolu nepreukázala vazorelaxačné účinky, predpokladáme, že sám tempol neprispel k acetylcholínom vyvolanej vazorelaxačnej odpovedi deendotelizovaných artérií. Výsledky štúdie ukazujú, že oxidačný stres vyvolaný deštrukciou integrity cievnej steny a spustený produkciou superoxidových radikálov zohráva jedinečnú úlohu pri narušení vazorelaxačnej odpovede na acetylcholín a vysvetľujú, prečo vedie poškodenie vnútornej endotelovej vrstvy k desenzibilizácii ciev na podávaný acetylcholín.

Expresiu NO-syntáz v neendotelových bunkách v rámci cievnej steny už potvrdili rôzne výskumné skupiny. Buchwalow a spol. (1) demonštrovali prítomnosť NOS proteínov v karotickej artérii prasaťa, ako aj v aorte potkana s poškodenou endotelovou vrstvou, pričom sa zároveň dokázala korelácia expresie NOS s expresiou arginázy a guanylátcyklázy v hladkých svalových bunkách. Podobne sa detekovala expresia endotelovej izoformy NOS v hladkých svalových bunkách v koronárnej a karotickej artérii prasaťa, ako aj v ľudskej

aorte a vretennej artérii (28, 29). V našej predchádzajúcej štúdií sme v morfológickej a imunohistochemickej analýze potvrdili absenciu endotelu a zároveň expresiu všetkých troch izoform NOS v mediálnej, hladkosvalovej vrstve hrudnej aorty, mezenterickej aj pľúcnej artérie potkana. (22). Navyše, v porovnaní s hrudnou aortou sa potvrdil silnejší benefičný účinok vychytávačov voľných radikálov, tempolu a N-acetylcysteínu, pri deendotelizovanej mezenterickej artérii. Podobný efekt sme potvrdili aj v tejto štúdií, keď aplikácia tempolu mala silnejší účinok na znovuoobnovenie vazorelaxačnej odpovede pri deendotelizovanej pľúcnej artérii než pri hrudnej aorte potkana. Všetky tieto heterogénne odpovede jednotlivých typov ciev sú v súlade s nálezmi Buchwalova a spol. (28), ktorí ukázali, že cievy elastického typu, akým je aj aorta, majú percentuálne menšiu svalovú hmotu ako cievy muskulárneho typu, čím možno vysvetliť menšiu intenzitu ochranné reakcie proti oxidačnému stresu pri deendotelizovanej hrudnej aorte v porovnaní s mezenterickou a pľúcnou artériou. Tieto výsledky zároveň potvrdzujú skutočnosť, že efektivita od endotelu závislej a nezávislej relaxácie je determinovaná aj typom krvného riečiska (30).

Vďaka uvedeným poznatkom možno prehodnotiť otázku výhradnej úlohy endotelových buniek v relaxácii hladkej svaloviny ciev. Existujú aj ďalšie nálezy, ktoré sú nekonzistentné s konceptom nevyhnutnej úlohy endotelových buniek pri relaxácii hladkých svalových buniek artérií. Všeobecne sa akceptuje, že NO ako voľný radikál difunduje z vrstvy endotelových buniek k hladkým svalovým bunkám. Avšak NO ako typický voľný radikál má toxické aj fyziologicky prospešné účinky; rovnováha medzi nimi je definovaná priestorovou distribúciou NO. Predpokladá sa, že tvorba NO je limitovaná časom a aby sa zabránilo jeho toxickým účinkom, po rýchlom náraste jeho koncentrácie nasleduje prudký pokles. Matematický model časovo-priestorového gradientu a koncentrácie NO v hladkých svalových bunkách ciev ukázal, že účinok NO bezprostredne závisí od intenzity NO produkcie/rozpadu a diametra cievy (31). Kým v mikrocievach môže relaxácia prebehnúť v krátkom časovom slede po vyprodukovaní NO v endotelových bunkách (31), difúzia NO by nebola dostatočne rýchla na vyvolanie relaxačnej odpovede v cievach so stredným až veľkým lúmenom. V takomto prípade, ako naznačujú aj naše výsledky, NO produkovaný mimo endotelu, napríklad hladkými svalovými bunkami, možno považovať za pomocný zdroj NO. Navyše, viaceré práce potvrdili, že pri určitých patologických podmienkach, zvýšená expresia a aktivita NOS v hladkých svalových bunkách môže slúžiť ako rezerva k funkčne dominantnej endotelovej NOS. Expresia neuronálnej NOS v hladkej svalovine cievnej steny bola dokázaná pri rôznych typoch ciev (1 – 3, 32). Táto izoforma NOS ovplyvňuje iné špecifické signálne dráhy v normotenzných aj hypertenzných podmienkach (33, 34). Biochemické a funkčné analýzy karotickej artérie spontánne hypertenzných potkanov demonštrovali biochemický

a funkčný dôkaz, že neuronálna izoforma NOS nachádzajúca sa v hladkých svalových bunkách sa aktivovala po stimulácii angiotenzínom II u hypertenzných, ale nie u normotenzných potkanov, čím boli kompenzované oslabené endotelové odpovede hypertenzných ciev (35). Klinické štúdie u ľudí zasa potvrdili, že zvýšená expresia endotelovej NOS na úrovni hladkých svalových buniek vnútornej hrudnej aorty poskytla histochemické vysvetlenie, prečo práve použitie štepov tejto artérie pri koronárnych by-passoch prinieslo lepšie výsledky v porovnaní s použitím iných prírodných artérií (29). Tieto štúdie podporujú hypotézu, že pri istých podmienkach expresia NOS a syntéza NO v hladkých svalových bunkách môže pôsobiť ako pomocný, respektíve záložný doplnkový mechanizmus k funkčne prevládajúcemu NO systému v endotelových bunkách, najmä v prípade jeho zlyhania.

Acetylcholín ako cholinergický agonista prejavuje svoju vazodilatornú úlohu aktiváciou muskarínových receptorov. Stimulácia tohto typu endotelových receptorov vyvolá uvoľňovanie vazodilatátorov, najmä NO. Opačnú, kontraktilnú reakciu, sledujeme pri nadviazaní acetylcholínu na muskarínový receptor lokalizovaný na membráne hladkosvalovej bunky cievnej steny. Kontrakcia je spustená interakciou s proteínom-G, následne sa zvyšuje intracelulárna hladina Ca^{2+} iónov (36). Na základe týchto poznatkov sa vynorila otázka, ako môže exogénny acetylcholín spustiť vazorelaxačnú odpoveď pri poškodenom endotele stimuláciou muskarínových receptorov hladkých svalových buniek. Štúdia Braydena a Bevana (37) ukázala, že aj deendotelizované cievy sú schopné reagovať na nízke dávky exogénneho acetylcholínu relaxačnou odpoveďou, čo predpokladá prítomnosť muskarínových receptorov priamo na povrchu hladkých svalových buniek a zároveň iniciujúcich relaxáciu. Brophy a spol. (32) zasa ukázali, že stimulácia hladkých svalových buniek agonistom zvyšujúcim intracelulárnu hladinu Ca^{2+} viedla zároveň k zvýšeniu cGMP. Toto zvýšenie hladiny cGMP bolo zainhibované po blokáde inhibítorom NOS. V rámci hladkosvalovej bunky vzostup intracelulárnych Ca^{2+} iónov aktivoval Ca^{2+} /kalmodulín-dependentnú NOS, čo sa spájalo so zvýšením obsahu cGMP v bunke. Zároveň sa zaznamenala súbežná aktivita NOS v hladkej svalovine deendotelizovaných ciev meraná premenou značeného L-arginínu na L-citrulín. Ukazuje sa, že vyššie intracelulárne hladiny cGMP priamo aktivujú cGMP-dependentnú proteinkinázu PKG (38). Jeden zo substrátov pre PKG je heat shock-related proteín HSP20. Fosforylácia tohto proteínu iniciuje aktiváciu cyklického nukleotidu, čo vedie k disociácii aktínu od elementov cytoskeletu. Priama disociácia cytoskeletových a kontraktilných elementov môže viesť až k vazorelaxácii (39, 40). Aj ďalšia práca ukázala, že vazorelaxačná efektívnosť NO môže závisieť od mobilizácie intracelulárneho Ca^{2+} v hladkých svalových bunkách (41). Autori ukázali na aorte myši, že po podaní acetylcholínu sa mobilizovala intracelulárna hladina Ca^{2+} , čo stimulovalo re-uptake Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula s následnou vazorelaxáciou. Tieto poznatky svedčia

o tom, že acetylcholínom iniciovaný rast alebo samotná mobilizácia intracelulárneho Ca^{2+} nevytvárajú predpoklad len pre spustenie kontraktilnej odpovede, ale môžu aktivovať aj prídavné mechanizmy, ktoré vedú k vazorelaxácii.

Aj keď presný mechanizmus a jednotlivé kroky signálnej dráhy stimulácie NOS v hladkých svalových bunkách zatiaľ do detailov objasnené neboli, na základe dosiahnutých poznatkov možno vysloviť určité závery. Hladkosvalová vrstva cievnej steny je schopná tvorby fyziologicky aktívneho NO, zodpovedného za vazodilatačnú odpoveď ciev. Lokálne uvoľňovaný NO v bunkách hladkej svaloviny tiež môže ovplyvniť tonus cievnej steny nezávisle od funkčnosti endotelových buniek. Dôkazy o dôležitosti ochrany pred oxidačným stresom v deendotelizovaných cievach vyvracajú predstavu o výhradnej úlohe endotelových buniek v cievnej relaxácii vyvolanej NO.

Záver

Výsledky našej štúdie ukázali, že: a) neendotelový NO predstavuje doplnkový fyziologicky aktívny zdroj NO; a b) necitlivosť deendotelizovaných ciev na vazodilatátory môže byť sprostredkovaná oxidačným stresom vyvolaným deštrukciou vnútornej vrstvy cievnej steny.

Podakovanie patrí L. Kosnáčovej za technickú asistenciu.

Práca bola podporovaná grantmi VEGA 2/0074/14, 2/0067/14 a MZ 2012/51-SAV-1.

Literatúra

1. Buchwalow IB, Podzuweit T, Samoilova VE, et al. An in situ evidence for autocrine function of NO in the vasculature. *Nitric Oxide* 2004;10:203-212.
2. Cheah LS, Gwee M, Das R, et al. Evidence for the existence of a constitutive nitric oxide-synthase in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol* 2002;29:725-727.
3. Charpie JR, Webb RC. Vascular myocyte-derived nitric oxide is an autocrine that limits vasoconstriction. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:763-768.
4. Schwarz PM, Kleinert H, Forstermann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2584-2590.
5. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
6. Ding H, Triggle CR. Novel endothelium-derived relaxing factors. Identification of factors and cellular targets. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44:441-452.
7. Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, et al. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res* 2000;47:436-445.

8. Erdogan H, Fadillioglu E, Emre MH. Protection from renal ischemia reperfusion injury by an endothelin-A receptor antagonist BQ-123 in relation to nitric oxide production. *Toxicology* 2006;228:219–228.
9. Ozel SK, Yuksel M, Haklar G, Durakbasa CU, Dagli TE, Aktan AO. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury (II). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;64:253–257.
10. Rieger JM, Shah AR, Gidday JM. Ischemia-reperfusion injury of retinal endothelium by cyclooxygenase and xanthine oxidase-derived superoxide. *Exp Eye Res* 2002;74:493–501.
11. Linas SL, Repine JE. Endothelial cells protect vascular smooth muscle cells from H₂O₂ attack. *Am J Physiol* 1997;272:F767–F773.
12. Walia M, Sormaz L, Samson SE, Lee RM, Grover AK. Effects of hydrogen peroxide on pig coronary artery endothelium. *Eur J Pharmacol* 2000;400:249–253.
13. Mendez JI, Nicholson WJ, Tailor WR. SOD isoforms and signaling in blood vessels evidence for the importance of ROS compartmentalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:887–888.
14. Chu Y, Iida S, Lund DD, et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res* 2003;92:461–468.
15. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2032–2036.
16. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001;5:88–97.
17. Zhao W, Swanson SA, Ye J, et al. Reactive oxygen species impair sympathetic vasoregulation in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 2006;48:637–643.
18. Nunes GL, Robinson K, Kalynych A, King SB, Sgoutas DS, Berk BC. Vitamins C and E inhibit O₂-production in the pig coronary artery. *Circulation* 1997;96:3593–3601.
19. Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, et al. Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radical Biol Med* 2000;28:1232–1242.
20. Zhang G, Zhang F, Muh R, et al. Autocrine/paracrine pattern of superoxide production through NAD(P)H oxidase in coronary arterial myocytes. *Am J Physiol* 2007;292:H483–H495.
21. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Sign* 2008;10:1045–1059.
22. Buchwalow IB, Cacanyiova S, Neumann J, Samoilova VE, Boecker W, Kristek F. The role of arterial smooth muscle in vasorelaxation. *Biochim Biophys Res Commun* 2008;377:504–507.
23. Guzik TG, Channon KM. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. In: *Hypertension: Methods and Protocols*, JP. Fennell, AH. Baker (eds). Series: *Methods in Molecular Medicine*, Vol 108. Springer/Humana Press, 2005;73–89.
24. Ribback S, Pavlovic D, Herbst D, et al. Effects of amitriptyline, fluoxetine, tranylcypromine and venlafaxine on rat vascular smooth muscle in vitro – the role of endothelium. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:119–125.
25. Harrison DG, Chen W, Dikalov S, Li L. Regulation of endothelial cell tetrahydrobiopterin: pathophysiological and therapeutic implications. In: *Cardiovascular Pharmacology: Endothelial Control*. P. Vanhoutte (ed). San Diego, Elsevier, 2010;107–132.
26. Simonsen U, Christensen FH, Buus NH. The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilation and blood pressure. *Pharmacol Ther* 2009;122:109–124.
27. Klemm DJ, Majka SM, Crossno JT, Psilas JC, Reusch JE, Garat CV. Reduction of reactive oxygen species prevents hypoxia-induced CREB depletion in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;58:181–191.
28. Buchwalow IB, Podzuweit T, Boecker W, et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *FASEB J* 2002;16:500–508.
29. Gaudino M, Toesca A, Maggiano N, Pragliola C, Possati G. Localization of nitric oxide synthase III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:1510–1515.
30. Moonen RM, Kessels CG, Zimmermann LJ, Villamor E. Mesenteric artery reactivity and small intestine morphology in a chicken model of hypoxia-induced fetal growth restriction. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:601–612.
31. Seraya IP, Nartsissov YR. Theoretical approach to description of time-dependent nitric oxide effects in the vasculature. *Mol Biol Rep* 2002;29:151–155.
32. Brophy CM, Knoepf L, Xin J, Pollock JS. Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H991–H997.
33. Cacanyiova S, Kristek F, Malekova M, Ondrias K. Effects of chronic neuronal nitric oxide-synthase inhibition on arterial function and structure in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:23–28.
34. Kristek F, Cacanyiova S, Gerova M. Hypotrophic effect of long-term neuronal NO-synthase inhibition on heart and conduit arteries of the Wistar rats. *J Physiol Pharmacol* 2009;60:21–27.
35. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 1998;83:1271–1278.
36. Duckles SP. Vascular muscarinic receptors: pharmacological characterization in the bovine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246:929–934.
37. Brayden JE, Bevan JA. Neurogenic muscarinic vasodilation in the cat. An example of endothelial cell – independent cholinergic relaxation. *Circ Res* 1985;56:205–211.
38. Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 1989;41:479–502.
39. Beall A, Bagwell D, Woodrum D, et al. The small heat shock-related protein, HSP20, is phosphorylated on serine 16 during cyclic nucleotide-dependent relaxation. *J Biol Chem* 1999;274:11344–11351.
40. Brophy CM, Lamb S, Graham A. The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein. *J Vasc Surg* 1999;29:326–333.
41. Van Hove CE, Van der Donckt C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol* 2009;158:920–930.