

Received: 2003.10.10

Accepted: 2004.03.02

Published: 2004.03.31

Stres oksydacyjny w nadciśnieniu tętniczym

Oxidative stress in hypertension

Grażyna Wójcicka, Jerzy Bełtowski, Anna Jamroz

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie

Reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób układu krążenia w tym również w nadciśnieniu tętniczym. W łożysku naczyniowym RFT są wytwarzane przez komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich oraz fibroblasty. Spośród wielu szlaków enzymatycznych, które mogą generować RFT największą rolę w krążeniu przypisuje się układowi oksydazy NAD(P)H, oksydazy ksantynowej oraz syntazy tlenu azotu. Wzrastające wytwarzanie RFT, a zwłaszcza anionorodnika ponadtlenkowego, przyczynia się do skrócenia okresu półtrwania NO oraz dysfunkcji śródbłonna, wyrażającymi się m.in. zaburzoną relaksacją naczynia. W wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym powstaje nadtlenoazotyn mogący modyfikować białka i lipidy, tworząc takie związki jak nitrotyrozyna, nitrozotiole i isoprostany, które również mogą modulować tonus naczyniowy. W wielu badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że podawanie egzogennych antyoksydantów może korzystnie wpływać na osłabiony zależny od śródbłonna rozkurcz naczyniowy oraz redukować podwyższone ciśnienie tętnicze krwi.

Słowa kluczowe:

stres oksydacyjny • reaktywne formy tlenu • oksydaza NAD(P)H, nadciśnienie tętnicze • antyoksydanty

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are involved in the pathogenesis of many cardiovascular diseases such as hypertension. In the circulation, ROS are generated by all vascular cells, i.e. endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. Among the many enzymatic systems that are capable of producing ROS, NAD(P)H oxidase xantine oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase have been extensively studied in vascular cells. Enhanced ROS production (especially superoxide anion) causes diminished NO bioavailability and leads to endothelial dysfunction, which occurs for example in impaired vasorelaxation. Superoxide reacts with NO to form peroxynitrite, which can modify proteins and lipids to create nitrotyrosine, and nitrosothiols, isoprostanes, which are also able to modulate vascular tone. Several experimental bservations have shown that a free radical scavenger may improve impaired endothelium-dependent vasodilation and reduce elevated blood pressure in hypertension.

Key words:

oxidative stress • reactive oxygen species • NAD(P)H oxidase • hypertension • antioxidants

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5357.pdf

Word count:

4768

Tables:

–

Figures:

1

References:

119

Adres autorów:

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej, ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin, e-mail: patfiz@asklepios.am.lublin.pl

Wykaz skrótów:

RFT – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **O₂⁻** – anionorodnik ponadtlenkowy (superoxide anion); **H₂O₂** – nadtlenek wodoru (hydrogen peroxide); **ONOO⁻** – nadtlenoazotyn (peroxynitrite); **NO** – tlenek azotu (nitric oxide); **NOS** – syntaza tlenu azotu (nitric oxide synthase); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet derived growth factor); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **AngII** – angiotensyna II (angiotensin II); **NA** – noradrenalina (noradrenaline); **AD** – adrenalina (epinephrine); **SHR** – szczury ze spontanicznym nadciśnieniem (spontaneously hypertensive rats); **SHRSP** – szczury ze spontanicznym nadciśnieniem ze skłonnością do udaru (spontaneously hypertensive stroke-prone rats); **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy (flavin adenine dinucleotide); **FMN** – mononukleotyd flawinowy (flavin mononucleotide); **NADPH** – zredukowana postać fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); **BH4** – tetrahydrobiopteryna (tetrahydrobiopterin); **L-NAME** – ester metylowy N-nitro-argininy (N ω -nitro-L-arginine methyl ester); **DPJ** – difenylojodonian (diphenyle iodonium); **WKY** – Wistar Kyoto; **F2-IsoPs** – F2-izoprostany (F2-isoprostanes); **DEM** – dietylomaleinian (diethyl maleate); **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dysmutase); **GPx** – peroksydaza glutationowa (glutathione peroxidase); **oxLDL** – utlenione lipoproteiny o małej gęstości (oxidised low-density lipoprotein)

WSTĘP

Nadciśnienie tętnicze jest jednym z najczęściej występujących czynników ryzyka chorób układu krążenia. Podwyższone ciśnienie tętnicze krwi prowadzi do miażdżycy tętnic, choroby niedokrwiennej serca, przerostu lewej komory i niewydolności mięśnia sercowego oraz udaru mózgu.

U patogenetycznych podstaw nadciśnienia tętniczego leżą nabyte lub wrodzone zaburzenia mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłową regulację ciśnienia tętniczego krwi, takie jak: mechanizmy kontrolujące pracę mięśnia sercowego (rytm serca, objętość wyrzutowa), napięcie ścian naczyń krwionośnych (opór obwodowy) oraz czynność nerek (regulacja wolemii). Jednakże przyczyna nadciśnienia tętniczego w większości przypadków pozostaje nieznana (nadciśnienie samoistne). Przeprowadzone w ostatnich latach prace eksperymentalne zwróciły uwagę na udział reaktywnych form tlenu (RFT) w patogenezie tej choroby.

Założeniem niniejszej pracy jest przedstawienie, w świetle danych z piśmiennictwa, reaktywnych form tlenu jako istotnych czynników zaburzających regulację ciśnienia tętniczego oraz uczestniczących w rozwoju nadciśnienia tętniczego.

STRES OKSYDACYJNY

Stres oksydacyjny jest stanem charakteryzującym się nadmierną aktywnością RFT, w wyniku zachwiania równowagi pomiędzy wzmoczone wytwarzanie RFT a ich usuwanie przez ustrojowe systemy antyoksydacyjne. Wśród RFT w ustroju istotne znaczenie mają anionorodnik ponadtlenkowy (O₂⁻) oraz produkty jego konwersji, tj. nadtlenek wodoru (H₂O₂), nadtlenoazotyn (ONOO⁻) [5]. Reakcje, w których powstają RFT mogą przebiegać spontanicznie lub są katalizowane przez enzymy komórkowe. W warunkach fizjologicznych głównym źródłem RFT jest mitochondrialny łańcuch oddechowy. W stanach niedokrwienia, a przede wszystkim następującej po nich reperuzji, tworzenie RFT jest związane z aktywacją oksydazy ksantynowej. Ważnym komórkowym źródłem RFT jest układ błonowej oksydazy NADPH oraz szlaki

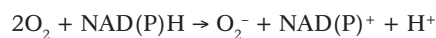
metaboliczne katalizowane przez lipo- i cyklooksygenazę, syntazę tlenu azotu. Generowanie RFT towarzyszy ponadto autooksydacji hemoglobiny, związków tiolowych, amin katecholowych. Funkcję obronną w organizmie przed toksycznym działaniem tlenu pełnią dwa systemy antyoksydacyjne: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Ich zadaniem jest zahamowanie wytwarzania RFT, zatrzymanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych oraz niedopuszczenie do oksydacyjnych uszkodzeń struktur komórkowych przez „zmiatanie” już utworzonych RFT. Główne enzymy wchodzące w skład układu antyoksydacyjnego to katalaza, która rozkłada nadtlenek wodoru do wody i tlenu, dysmutaza ponadtlenkowa, katalizująca reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu, peroksydaza glutationowa, która w obecności glutationu katalizuje rozkład nadtlenu wodoru do wody oraz reduktaza glutationowa – enzym regenerujący cząsteczki glutationu.

ŹRÓDŁA RFT W UKŁADZIE KRĄŻENIA

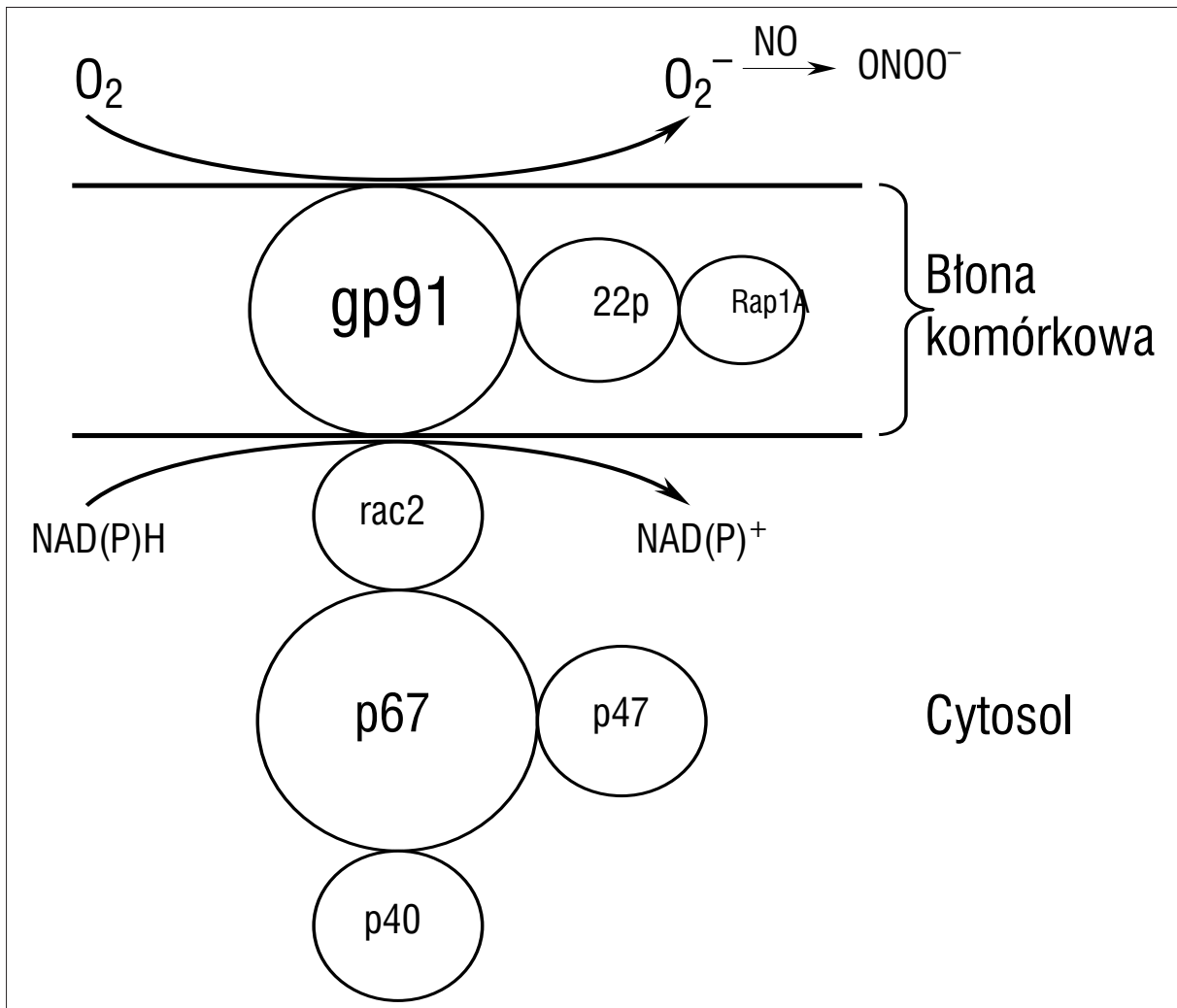
Komórki generujące RFT w układzie krążenia to przede wszystkim komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich naczyń, fibroblasty oraz krwinki białe krwi [9]. Główne procesy, w których generowane są RFT to szlak metaboliczny oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej, syntazy tlenu azotu (NOS), lipooksydazy i mitochondrialnej oksydazy [30].

Oksydaza NADPH

Oksydaza NADPH jest głównym źródłem O₂⁻ w komórkach strukturalnych naczyń, miokardium i leukocytach. Katalizuje ona formowanie O₂⁻ przez jednoelektronową redukcję tlenu z użyciem NADPH lub NADH jako donora elektronów [28]:



Po raz pierwszy oksydazę NADPH stwierdzono w profesjonalnych fagocytach, późniejsze badania wykazały, że jest ona także obecna w innych komórkach, m.in. w komórkach śródbłonna [39], w komórkach mięśni gładkich naczyń [52] oraz fibroblastach przydanki naczyniowej [68,69]. Naczy-



Ryc. 1. Oksydaza NAD(P)H fagocytów (opis w tekście)

niowa oksydaza NADPH, aczkolwiek podobna do tej stwierdzanej w profesjonalnych fagocytach, różni się jednak strukturalnie i funkcjonalnie. Neutrofilowa oksydaza składa się z 5 komponentów: p40phox (phox-phagocyte oxidase), p47phox, p67phox, p22phox i gp91phox. W spoczynkowych fagocytach trzy z nich (p40, p47, p67 phox) znajdują się w cytosolu tworząc kompleks. Pozostałe dwa komponenty (p22phox i gp91 phox) są umiejscowione w błonie pęcherzyków sekrecyjnych, tworząc cytochrom b558. Oddzielenie tych dwóch grup komponentów warunkuje nieaktywność enzymów w komórce w spoczynku. Po zadziałaniu bodźca jednostka p47phox ulega fosforylacji i cały kompleks wędruje do błony, gdzie łączy się z cytochromem b558 tworząc aktywną oksydazę, zdolną do transferu elektronów z substratu (NADPH) na tlen. Do prawidłowego funkcjonowania enzymu niezbędne są również niskocząsteczkowe białka – rac2 (w cytosolu) i rap1A (w błonach komórkowych) (ryc. 1).

mRNA gp 91, p22, p47, p67 phox wykazano w komórkach śródbłonna i przydanki naczyniowej [7, 39]. W mięśniach gładkich naczyń zidentyfikowano mRNA p22 i p47phox, natomiast nie stwierdzano tu komponenty p67 i gp91phox [3, 72, 104]. W fibroblastach naczyń budowa

oksydazy NADPH nie jest ostatecznie ustalona. Niektórzy znaleźli w tych komórkach wszystkie elementy charakterystyczne dla enzymu zawartego w neutrofilach [69], inni tylko wybrane komponenty [55]. Nieco odmienne jest również działanie tego enzymu w komórkach naczyń. W komórkach śródbłonna i fibroblastach oksydaza wykorzystując wewnątrzkomórkowy NADH lub NADPH przenosi elektrony przez błonę na zewnątrzkomórkowy tlen [54,65,119]. Natomiast w miocytach O_2^- i H_2O_2 powstają głównie wewnątrzkomórkowo [27,114]. Sercowo-naczyniowa oksydaza NADPH generuje wolniej i mniejsze ilości anionorodnika nadtlenkowego w porównaniu z neutrofilową. W przeciwieństwie do natychmiastowego wydzielenia O_2^- przez neutrofile, wytwarzanie tego rodnika przez komórki śródbłonna, miocyty i fibroblasty naczyniowe występuje dopiero po kilku minutach lub godzinach od pobudzenia [66,68]. Inną różnicą jest to, że enzymy zawarte w tych komórkach wykazują nieznaczną konstytutywną aktywność, niespotykaną w fagocytach [69].

Znanych jest wiele czynników aktywujących oksydazę NADPH, a wśród nich angiotensyna II, trombina, PDGF, TNF- α [28,99] oraz czynniki hemodynamiczne, takie jak

siły ścinające (shear stress). Do inhibitorów enzymów należą natomiast takie substancje, jak wtórne produkty peroksydacji lipidów np.: aldehydy (4-hydroksynonenal), tlenek azotu, nitroztiole oraz grupy sulfhydrylowe (SH) [18,22,87]. W nadciśnieniu tętniczym istotnym stymulatorem wytwarzania O_2^- jest angiotensyna II (Ang II), peptyd krążący we krwi oraz wytwarzany lokalnie w ścianie naczyń. Uważana jest za hormon regulujący ciśnienie krwi, wydzielanie aldosteronu i resorpcję sodu. Obecnie wiadomo, że miejscowo powstająca Ang II pobudza uwalnianie czynników wzrostowych, cytokin, chemokin, cząstek adhezyjnych oraz RFT, które uczestniczą we wzroście komórek, apoptozie, włóknieniu oraz rozplemie [82].

Wykazano, że angiotensyna II zwiększa aktywność oksydazy NADPH i generację O_2^- we wszystkich typach komórek naczyniowych. Griendling i wsp. [27] w badaniach *in vitro* obserwowali wzrost aktywności oksydazy NADPH oraz zwiększone uwalnianie O_2^- przez komórki mięśni gładkich naczyń pod wpływem angiotensyny. Pagano i wsp. [69] donoszą, że angiotensyna stymuluje wytwarzanie O_2^- i aktywność oksydazy NADPH w izolowanych z przydanki naczyniowej fibroblastach. Podobne działanie angiotensyny obserwowano również w kulturze komórek endotelialnych [116]. Landmessa i wsp. [44] udowodnili, że angiotensyna jest zdolna pobudzać wytwarzanie O_2^- przez komórki śródbłonna, oraz że zjawisko to zależne jest od wzrostu ekspresji cytoplazmatycznej komponenty oksydazy NADPH, tj. p47phox. Inkubując kultury komórek endotelialnych aorty pochodzących od myszy pozbawionych p47phox i myszy kontrolnych wykazali wzrost generacji O_2^- pod wpływem angiotensyny tylko u myszy kontrolnych. Ponadto podając angiotensynę w pompie osmotycznej zwierzętom obu tych grup, stwierdzili u zwierząt z niedoborem p47phox znacznie mniejszy wzrost ciśnienia tętniczego niż u zwierząt kontrolnych. Inna grupa badaczy zaobserwowała wzrost ekspresji komponenty p67phox i wytwarzania O_2^- indukowany podaniem angiotensyny w inkubowanych ludzkich komórkach endotelialnych [81]. W fibroblastach izolowanych z przydanki Ang II zwiększa przede wszystkim ekspresję p67phox [68] natomiast w mięśniach gładkich naczyń komponenty p22phox [23].

Udział Ang II w stymulowaniu wytwarzania RFT w układzie naczyniowym został udowodniony nie tylko w badaniach *in vitro* na izolowanych komórkach naczyń. Rajagoplan i wsp. [76] w badaniach *in vivo* wykazali, że nadciśnieniu, jakie wywołuje podanie zwierzętom doświadczalnym angiotensyny towarzyszy wzrost aktywności oksydazy NADPH i generacji O_2^- w izolowanych od nich fragmentach aorty, a także upóźlenie zależnej od endotelium relaksacji naczyń i odpowiedzi na egzo- i endogeny NO. Zmiany te się normalizują pod wpływem inhibitora receptora AT1 Ang II (lozartanu) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (enzymu inaktywującego O_2^-). Natomiast ani oksypurinol (inhibitor oroksydazy ksantynowej) ani indometacyna (nieswoisty inhibitor cyklooksigenazy) czy też antymycyna A (inhibitor III kompleksu mitochondrialnego transportu elektronów) nie wpływają w sposób istotny na wytwarzanie O_2^- w tym modelu nadciśnienia. Co więcej, autorzy ci stwierdzili, że za wytwarzanie O_2^- w naczyniach pod wpływem angiotensyny odpowiedzialne są

przede wszystkim komórki mięśni gładkich naczyń, gdyż usunięcie śródbłonna nie zmienia go [76].

Di Wang i wsp. [16] sugerują, że przydanka naczyniowa jest ważnym źródłem RFT w układzie krążenia stymulowanym przez Ang II i aktywnie uczestniczy w rozwoju nadciśnienia tętniczego, wpływając na regulację napięcia mięśni gładkich naczyń. Autorzy ci obserwowali we fragmentach aorty izolowanej od szczurów z nadciśnieniem indukowanym angiotensyną, wzrost wytwarzania O_2^- (najbardziej wyrażony w przydancie) oraz spontaniczny tonus, który nie był obecny w naczyniu izolowanym od zwierząt normotensyjnych. Dodanie SOD oraz DPJ (diphenyle iodonium), inhibitora oksydazy NADPH, do buforu inkubacyjnego zmniejszało zarówno generację O_2^- , jak i spontaniczny tonus aorty. Natomiast L-NAME (inhibitor NOS) czy usunięcie śródbłonna z badanych fragmentów naczyniowych, nie miało znamiennego wpływu na wytwarzanie O_2^- i spontaniczny tonus naczyniowy. Dodatkowo zaobserwowano, że SOD nie hamuje tonusu w segmentach aorty pozbawionych śródbłonna. Przemawiałoby to za tym, że obserwowany spontaniczny tonus był związany z inaktywacją NO przez nadmiernie uwalniany O_2^- .

Oprócz angiotensyny silnym aktywatorem oksydazy NADPH jest również tzw. siła ścinająca (shear stress). De Keulenaer i wsp. [15] poddając ludzkie komórki śródbłonna stałej sile (5 dyn/cm²) obserwowali przejściowy wzrost aktywności oksydazy NADPH oraz wzrost aktywności SOD, natomiast oscylujący nacisk (± 5 dyn/cm², 1Hz) wywołuje wzrost aktywności oksydazy NADPH bez wzrostu aktywności SOD.

Wzrost aktywności oksydazy NADPH stwierdzono w wielu modelach doświadczalnych. Oprócz wspomnianego już wcześniej nadciśnienia indukowanego podaniem angiotensyny, wzrost ekspresji mRNA komponentów tego enzymu (p22phox) w homogenatach aorty obserwowano u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem (spontaneously hypertensive rats – SHR). Co ciekawe, długotrwałe blokowanie AT1 (irbesartanem) normalizowało ekspresję p22phox i aktywność oksydazy sugerując udział angiotensyny w tym modelu [115]. Suzuki i wsp. [96] wykazali wzrost generacji O_2^- w tętniczkach i żyłkach u tych hipertensyjnych szczurów. Nakazano i wsp. [63] stwierdzili, że wprowadzenie do ściany naczyniowej SOD zmiatającej O_2^- normalizuje ciśnienie tętnicze u SHR. Podobnie apocynina, swoisty inhibitor komponenty oksydazy NADPH zmniejsza podwyższoną generację O_2^- w ścianie aorty u szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (SHR).

W nadciśnieniu indukowanym u szczura przez wstrzyknięcie deoksykortykosteronu występuje zwiększone wytwarzanie O_2^- oraz podwyższona aktywność oksydazy NADPH [67].

W przeciwieństwie do badań eksperymentalnych na zwierzętach, gdzie udział oksydazy NADPH jest dobrze udokumentowany, istnieje niewiele doniesień mówiących o udziale tego enzymu w patologii klinicznej nadciśnienia. Berry i wsp. [10] donoszą, że angiotensyna zwiększa wytwarzanie O_2^- w ludzkich naczyniach tętniczych, a efekt ten jest całkowicie blokowany przez losartan (agonistę AT1).

Analizując rolę oksydazy NADPH w nadciśnieniu tętniczym, należy również rozważyć znaczenie leukocytarnej oksydazy NADPH. Pontremoli i wsp. [73] wykazali zwiększone wytwarzanie O_2^- i H_2O_2 przez granulocyty obojętnochołonne izolowane od pacjentów z nadciśnieniem samoistnym w porównaniu z osobami normotensyjnymi. Podobne wyniki uzyskała grupa Kristala [42] wykazując ponadto zmniejszoną przeżywalność tych komórek.

Oksydaza ksantynowa

Kolejnym ważnym źródłem RFT w układzie krążenia jest szlak metaboliczny oksydazy ksantynowej. Odgrywa on istotną rolę w hipercholesterolemii [66], zapaleniu oraz w niedokrwieniu [43]. Nie można pominąć również jego udziału w nadciśnieniu tętniczym. Oksypurinol, inhibitor oksydazy ksantynowej, obniża ciśnienie krwi u szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem (SHR) [63]. AHPP (4-amino-6-hydroksypyrazolo [3, 4-d] pirymidyna), swoisty inhibitor oksydazy ksantynowej potencjalizuje indukowaną NO wazorelaksację *ex vivo* oraz *in vivo* u SHR redukując znacznie nadciśnienie tętnicze [56]. Suzuki i wsp. [96] dodając do diety szczurów z genetycznym nadciśnieniem (SHR) wolfram wiążący kofaktor oksydazy ksantynowej uzyskali normalizację podwyższonego ciśnienia u tych zwierząt oraz obniżenie napięcia naczyniowego w mikrokrążeniu mierzonego przyżyciowo. Wykazali ponadto znacznie wyższą aktywność oksydazy ksantynowej w tętnicach krezkowych tych szczurów niż u normotensyjnych szczurów Wistar Kyoto (WKY). Warto zaznaczyć, że oksydaza ksantynowa jest umiejscowiona zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i na powierzchni komórek endotelialnych, gdzie poprzez uwalnianie O_2^- reguluje aktywność NO [1].

Syntaza tlenu azotu

Interesujący jest udział syntazy tlenu azotu (NOS) w regulacji równowagi pomiędzy aktywnością NO a RFT. Enzym ten jest dioksygenazą wprowadzającą dwa atomy tlenu do cząsteczki L-argininy, która z udziałem NADPH jako donora elektronów oraz w obecności nukleotydów flawinowych (FMN, FAD), hemu i tetrahydrobiopteryny (BH4) jest metabolizowana do NO i cytruliny. FMN zawiera domenę reduktazy a grupa hemowa – domenę oksigenazy. Wiązanie tlenu do grupy hemowej tworzy przejściowy kompleks, który w postaci zredukowanej utlenia L-argininę do NO i cytruliny. Jednakże kompleks ten może dysocjować tworząc O_2^- . Prawdopodobnie BH4 jest najważniejszą cząsteczką kontrolującą równowagę pomiędzy generowaniem O_2^- lub NO przez NOS. Tetrahydrobiopteryna w zależności od dawki hamuje generację O_2^- . Skutkiem niedoboru BH4 jest wzrost wytwarzania O_2^- a spadek syntezy NO [94,95]. Vasquez-Vivar i wsp. [105] wykazali także, że BH4 bezpośrednio zmniejsza O_2^- . Istnieją jednak doniesienia mówiące, że BH4 może indukować gwałtowną oksydację NO do ONOO⁻ w wyniku autooksydacji oraz wzrostu wytwarzania O_2^- , a SOD całkowicie blokuje indukowaną przez ten związek oksydację NO [53]. Generacja O_2^- przez NOS jest hamowana przez inhibitor NOS, tj. L-NAME [74].

Udział RFT generowanych przez NOS potwierdzono na modelach eksperymentalnych nadciśnienia. U szczurów

z genetycznym nadciśnieniem (SHRSP) podanie L-NAME oraz BH4 zmniejsza generację O_2^- . Ponadto u zwierząt tego szczepu stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA dla eNOS w porównaniu ze szczurami WKY [41], co wskazywałoby, że źródłem O_2^- u tych zwierząt jest endotelium i zawarta w nim eNOS, a nadmierne wytwarzanie O_2^- jest odpowiedzialne za skrócenie okresu półtrwania NO obserwowanego w modelu genetycznego nadciśnienia. Contento i wsp. [13] wykazali, że u szczurów SHR we wczesnym okresie, jeszcze przed pojawieniem się nadciśnienia występuje zależna od NOS generacja O_2^- . W tym okresie izolowane fragmenty aorty charakteryzują się zmniejszoną syntezą NO w porównaniu z obserwowaną w szczepie kontrolnym (WKY), a dodanie BH4 zmniejsza generację O_2^- . Ponadto obserwowana w tym okresie osłabiona relaksacja izolowanego naczynia znacząco wzrasta po podaniu SOD. Zatem dysfunkcja NOS może być przyczyną zwiększonej generacji O_2^- u SHR w okresie przedhipertensyjnym i przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia i jego naczyniowych konsekwencji.

Zwiększoną ekspresję eNOS łącznie ze zwiększoną generacją O_2^- obserwowano także u szczurów, u których nadciśnienie wywoływano przez podwiązanie aorty. Interesujące jest, że sam wzrost generacji RFT, poprzedzający znamienny wzrost ekspresji eNOS (wczesna faza) nie wpływał na zależną od endotelium relaksację naczyń. Dopiero w późniejszej fazie doświadczenia, kiedy wzrostowi wytwarzania O_2^- w aorcie towarzyszył wzrost ekspresji mRNA dla eNOS oraz wyraźny wzrost poziomu nitrotyrozyny (wskaźnik tworzenia nadtlenoazotynu) rozwinęła się dysfunkcja śródbłonna [11]. Zatem tylko łączny wzrost generacji O_2^- i NO oraz wynikające z tego zwiększone formowanie ONOO⁻, prowadziło do uszkodzenia śródbłonna.

ONOO⁻ w regulacji napięcia naczyniowego

Komórki śródbłonna pełnią ważną funkcję regulacyjną w układzie naczyniowym przez sekrecję substancji kontrolujących napięcie ściany naczyniowej, takich jak NO [19]. Równowaga pomiędzy NO a RFT warunkuje skurcz naczyń, proliferację mięśni gładkich naczyń oraz aktywność prozakrzepową, prozapalną i prooksydacyjną [29, 58].

Wolne rodniki tlenowe w układzie krążenia są odpowiedzialne nie tylko za skrócenie okresu półtrwania NO oraz osłabioną zależną od śródbłonna wazodylatację obserwowaną w nadciśnieniu [12,24,29,70,97,98], ale również reagując z NO tworzą wtórne związki wykazujące aktywność biologiczną. Do najistotniejszych z nich należą ONOO⁻ oraz produkty jego reakcji z białkami i lipidami takie jak: S-nitrozotiole, nitrotyrozyna, F2-izoprostany (F2-IsoPs) [6, 75].

Białkowe i niebiałkowe grupy sulfhydrylowe, w reakcji z ONOO⁻ tworzą S-nitrozotiole. S-nitrozotiole są bardziej stabilne od samego NO, a także są zdolne do jego ponownego uwalniania, pełnią zatem funkcję ochronną i stabilizującą NO. Wykazano, że białka zawierające grupy tiolowe poddane nitrozylacji działają wazodylatacyjnie a w inkubowanych komórkach (podobnie jak sam ONOO⁻) zwiększają syntezę cGMP [93,101]. Wu i wsp. [112] stwierdzili, że ekspozycja izolowanej tętnicy płucnej wołu (pozbawio-

nej śródbłonna) na ONOO⁻ w buforze zawierającym GSH powoduje zwiększoną generację NO i rozkurcz naczyń. Natomiast dodanie DEM (dietylmaleinian), tj. czynnika obniżającego poziom tkankowego GSH, redukuje zarówno relaksację jak i generację NO indukowaną nadtlenoazoty-nem. Podobny wpływ wywiera ONOO⁻ na izolowaną tętnicę wieńcową psa. W doświadczeniu tym dodatkowo wykazano wzmocnienie relaksacji przez SOD a zmniejszenie po dodaniu hemoglobiny wiążącej NO [51].

W regulacji napięcia naczyniowego odgrywa również rolę indukowana przez nadtlenoazoty-nitracja tyrozyny. Po pierwsze, nitracja tyrozyny hamuje aktywność syntazy prostacykliny, związku działającego synergistycznie z NO w układzie krążenia [117,118]. Po drugie, nitracja hamuje fosforylację tyrozyny zawartej w białkach komórek endotelialnych oraz przyczynia się do ich łatwiejszej degradacji [26]. Wzrost nitrotyrozyny obserwowano w eksperymentalnym nadciśnieniu. Lokalizując 3-nitrotyrozinę z zastosowaniem badania immunohistochemicznego stwierdzono zwiększoną jej koncentrację w endotelium i przydancie aorty izolowanej od myszy, którym indukowano nadciśnienie podaniem angiotensyny II [110].

Związkiem endogennym mogącym także ulegać nitracji pod wpływem ONOO⁻ jest kwas moczowy – ważny antyoksydant osoczowy. Jak wykazali Skinner i wsp. [91] produkt reakcji kwasu moczowego i ONOO⁻ może uwalniać NO i powodować wazorelaksację w izolowanej aorticie szczura.

Nadtlenoazoty-n poprzez nieenzymatyczną peroksydację kwasu arachidonowego prowadzi do powstania F2-izoprostanów (F2-IsoPs) [31, 78]. Te powstałe niezależnie od cyklooksygenazy prostanoidy wykazują silne biologiczne działanie: wywołują skurcz naczyń, zmniejszają filtrację kłębuszkową, zwiększają cewkową resorpcję sodu, stymulują wytwarzanie endoteliny przez komórki śródbłonna, pobudzają proliferację mięśni gładkich naczyń i agregację płytek krwi [59]. Wzrost poziomu F2-IsoPs obserwowano po podaniu Ang II, NA oraz w nadciśnieniu nerkopochodnym [1, 47,77,78].

W wyniku nieenzymatycznego utleniania lipidów przez RFT oprócz F2-IsoPs powstaje wiele innych związków wywierających wpływ na tonus naczyniowy np.: utlenione lipoproteiny o małej gęstości (oxLDL). Zostało potwierdzone, że oxLDL dodane do izolowanego naczynia hamują zależną od endotelium relaksację [100]. W nadciśnieniu występuje wzrost ekspresji lektynopodobnego receptora oxLDL (LOX-1) na komórkach śródbłonna [61]. Za wzrost ekspresji odpowiedzialne są m.in. takie czynniki jak oxLDL, Ang II, siły ścinające [49,50].

Udział amin katecholowych w rozwoju stresu oksydacyjnego

W nadciśnieniu tętniczym występuje zarówno nadmierna aktywność układu współczulnego, jak i wzmożona reaktywność naczyń na działanie amin katecholowych. Udział układu współczulnego w rozwoju stresu oksydacyjnego w nadciśnieniu tętniczym nie jest jednoznaczny.

Podanie zwierzętom doświadczalnym noradrenaliny (NA) w dawce powodującej wzrost ciśnienia tętniczego porów-

nywalny ze wzrostem uzyskanym przez infuzję angiotensyny, w przeciwieństwie do tej ostatniej nie powoduje wzrostu generacji O₂⁻ przez izolowane od tych zwierząt fragmenty aorty oraz nie wpływa na zależną od śródbłonna relaksację naczyń [76]. Podanie SOD obniża ciśnienie tętnicze w nadciśnieniu indukowanym Ang II lecz nie NA [40,45]. Dodanie do płynu inkubacyjnego noradrenaliny lub adrenaliny (AD) nie stymuluje umieszczonych w nim fragmentów aorty do wytwarzania O₂⁻ (w przeciwieństwie do Ang II), a dodanie SOD nie zmniejsza skurczu naczynia indukowanego NA i AD [40].

Natomiast u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, noradrenalina powoduje silniejszą wazokonstrykcję niż u osób normotensyjnych, a zmiatacze RFT (witamina C) zmniejszają indukowany noradrenalina skurcz naczyń tylko u pacjentów chorujących na nadciśnienie tętnicze. U tych chorych podanie L-NAME nie wzmaga działania wstrzykiwanej noradrenaliny, jak to się dzieje u pacjentów normotensyjnych. Jednoczesne podanie L-NAME i witaminy C wywołuje odpowiedź naczyniową na noradrenalina podobną u pacjentów hiper- i normotensyjnych. Przy blokowaniu syntezy endogennego NO z jednoczesną jego egzogenną suplementacją donorem NO (nitroprusydkiem sodu) oraz z dodatkowym podaniem witaminy C, osłabione działanie egzogennego NO obserwuje się tylko u pacjentów z nadciśnieniem. Dane te wskazują, że nadmierna odpowiedź naczyń na noradrenalina u pacjentów jest zależna od osłabionej aktywności NO w wyniku indukowanego przez noradrenalina wytwarzania RFT [46].

Ciekawe obserwacje opisali Aizawa i wsp. [2] mierząc poziom 8-epi-PGF2 α (marker stresu oksydacyjnego) w osoczu szczurów, którym podano odpowiednio noradrenalina lub angiotensynę II w dawkach wywołujących i niewywołujących nadciśnienie. Noradrenalina tylko w dawkach presyjnych powodowała istotny wzrost stężenia 8-epi-PGF2 α , w przeciwieństwie do angiotensyny, która działała tak już w dawkach niezwiększających ciśnienia. Co więcej, wzrost 8-epi-PGF2 α indukowany przez presyjne dawki noradrenaliny całkowicie był blokowany przez różne leki hipotensyjne (tj. prazosynę – bloker receptorów adrenergicznych α , hydralazyna – nieswoisty wazodylator, losartan – swoisty agonista receptorów AT1). W przypadku angiotensyny tylko losartan całkowicie zniósł wzrost wytwarzania 8-epi-PGF2 α . Wydaje się zatem, że noradrenalina zwiększa wytwarzania 8-epi-PGF2 α pośrednio, w mechanizmie zmian hemodynamicznych, w przeciwieństwie do angiotensyny II, która indukuje stres oksydacyjny *per se* niezależnie od czynników presyjnych. Ponieważ w izolowanych fragmentach aorty pobranych od szczurów, w których nadciśnienie wywołano podaniem NA nie obserwuje się zwiększonej generacji O₂⁻ oraz wzrost ciśnienia śródściennego nie zwiększa wytwarzania RFT w dużych tętnicach, głównym ich źródłem wydają się małe tętniczki, których komórki mięśni gładkich, jak udowodniono, wykazują zwiększoną ekspresję komponentów oksydazy NADPH, a wzrost ciśnienia śródściennego indukuje w nich generację RFT [64,76]. Zatem jest możliwe, że mięśniówka gładka małych naczyń jest odpowiedzialna za pojawienie się stresu oksydacyjnego w krążeniu w odpowiedzi na wzrost ciśnienia krwi. Hipotezę tę potwierdzają badania *in vitro*,

z których wynika, że skutkiem rozciągania mięśni gładkich naczyń jest wzrost wytwarzania O_2^- [34,35].

POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY W NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM

Enzymatyczne i neenzymatyczne drobnocząsteczkowe antyoksydanty pełnią funkcję obronną w organizmie przed toksycznym działaniem RFT. W nadciśnieniu tętniczym stwierdza się zaburzoną obronę antyoksydacyjną pod postacią zmniejszenia liczby niskocząsteczkowych antyoksydantów oraz zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych. U pacjentów z leczonym jak i nieleczonym nadciśnieniem tętniczym obserwowano obniżony poziom witaminy C oraz związków zawierających grupy tiolowe [57,103]. W komórkach mięśni gładkich izolowanych z aorty szczurów z genetycznym nadciśnieniem (SHR) stwierdzono obniżoną zawartość GSH [111]. Stężenie witaminy E w nadciśnieniu zachowuje się bardzo zmiennie. Niektórzy autorzy stwierdzali jej spadek w surowicy krwi chorych na nadciśnienie tętnicze [83], inni nie odnotowywali istotnych różnic w porównaniu z osobami z prawidłowym ciśnieniem tętniczym [103]. Wzrost ciśnienia tętniczego jest często skojarzony ze zmianą aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Wzrost aktywności peroksydazy glutationowej oraz obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej obserwowano u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym [83]. Wu i Juurlink [111] odnotowali spadek aktywności GPx i wzrost aktywności oksygenazy hemowej (HO-1) w mięśniach gładkich aorty u SHR. Jednak celowe osłabienie obrony antyoksydacyjnej np.: obniżenie GSH przez podanie inhibitora syntazy glutationu, wywołuje nadciśnienie u zwierząt doświadczalnych oraz wzrost nitrotyrozyny w osoczu, aorticie, sercu i wątrobie, a także zmniejszenie wydalania metabolitów tlenu azotu przez nerki. Podanie łączne tym zwierzętom witaminy C i E wycofuje powyższe zmiany [107, 108].

Perspektywy zastosowania antyoksydantów w nadciśnieniu tętniczym

Witamina C jest bardzo ważnym, rozpuszczalnym w wodzie antyoksydantem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym. Dzięki silnym właściwościom redukującym, jest zdolna nie tylko do reakcji z wolnymi rodnikami tlenowymi, osłaniając w ten sposób struktury komórkowe i oszczędzając inne antyoksydanty, ale również reagując z formami utlenionymi antyutleniaczy przywraca im właściwości obronne np.: witamina C jest koantyoksydantem α -tokoferolu w LDL [38].

Kliniczne badania udowodniły, że kwas askorbinowy w dużej dawce, może odwracać dysfunkcję śródbłonna w miażdżycy i schorzeniach, które predysponują do miażdżycy, takich jak: nadciśnienie, cukrzyca, hipercholesterolemia [37,46,48,98,102]. Witamina C podawana dotętniczo lub przez dłuższy czas doustnie, osłabia nadmierną wazokonstrykcyjność indukowaną przez np. noradrenalinę, lub zwiększa efektywność wazodylatorów np. acetylocholinę. Zjawisko to obserwuje się zarówno w naczyniach wieńcowych jak i obwodowych. Podawanie askorbinianu nie zmienia natomiast odpowiedzi naczyń na nitroprusydek sodu [98] czy nitroglicerynę [92], tj. stymulatory działające niezależnie od śródbłonna.

Jest wiele mechanizmów, które decydują o korzystnym działaniu witaminy C na śródbłonek. Po pierwsze, zmiata anionorodnik ponadtlenkowy [36]. Po drugie, kwas askorbinowy uwalnia NO z S-nitrozotioili [86]. Po trzecie, wykazano, że witamina C stymuluje w komórkach endotelialnych wzrost syntezy cytruliny, produktu ubocznego syntezy NO, oraz cGMP, markera bioaktywności NO, co dzieje się prawdopodobnie w wyniku zwiększenia przez nią powinowactwa BH4 do NOS [33]. Ponadto kwas askorbinowy hamuje oksydacyjną modyfikację LDL wywołowaną przez komórki śródbłonna [21] oraz osłania komórki naczyń przed cytotoksycznym działaniem oxLDL [90].

W przeciwieństwie do kwasu askorbinowego, przeciwutleniacza fazy wodnej, działanie tokoferolu, antyoksydanta fazy lipidowej nie jest jednoznaczne. Istnieją doniesienia, że podawanie witaminy E zwiększa oporność LDL na oksydację *ex vivo* [17,79] oraz zmniejsza hamujący wpływ układu generującego RFT hipoksantyna/oksydaza ksantynowa na indukowaną acetylocholiną wazodylację w izolowanej aorticie szczura [25]. Dieta uboga w witaminę E przyczynia się do wzrostu w surowicy krwi markerów peroksydacji lipidów, takich jak substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) oraz 8-iso PGF 2α oraz osłabienia wazorelaksacji pod wpływem agonistów śródbłonkowych [14,80]. W badaniach klinicznych podawanie tokoferolu przez kilka miesięcy pacjentom z hipercholesterolemią i chorobą wieńcową, zwiększyło wazodylację i przepływ naczyniowy *in vivo* po acetylocholinie [60] oraz obniżyło poziom przeciwciał przeciwko oxLDL [60]. Badania innych zespołów nie potwierdziły korzystnego wpływu witaminy E na ilość TBARS i 8-iso PGF 2α i stymulowaną acetylocholiną wazodylację [20,88]. W modelu doświadczalnym, w którym nadciśnienie wywoływano przez przewlekłe hamowanie NOS podawanie witaminy E zapobiegało występowaniu zmian czynnościowych i strukturalnych w nerkach nie wpływało natomiast na zależną od endotelium wazorelaksację oraz wartość ciśnienia tętniczego [4].

Podawanie egzogennych enzymów antyoksydacyjnych korzystnie wpływa na wartość ciśnienia tętniczego oraz zmiany morfologiczne w układzie naczyniowym. Laursen i wsp. [45] wykazali, że podanie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) obniża podwyższone przez Ang II ciśnienie tętnicze u szczurów. Potwierdza to, że Ang II działa presyjnie (przynajmniej częściowo) przez degradację NO w wyniku wzmożonego wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego. Grupa Nakamury [62] w badaniach na izolowanej aorticie myszy obserwowała zależną od dawki wazodylację indukowaną przez modyfikowaną postać SOD dodawaną do płynu inkubacyjnego. Dodatkowo dodanie L-NAME osłabiało ten efekt, wskazując że O_2^- odgrywa ważną rolę w regulacji napięcia naczyniowego przez inaktywację NO. Podobne działanie wykazuje tempol (4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl piperidinyloksyl), substancja naśladująca działanie SOD. Związek ten obniża ciśnienie tętnicze u SHR, a podanie L-NAME osłabia jego wpływ na naczynia, ponadto tempol redukuje wydalanie F2-IsoPs przez nerki [84,85]. Park i wsp. [71] wykazali, że w ciężkim nadciśnieniu indukowanym u SHRSP karmionych dietą bogatosodową, tempol oprócz prewencji progresji nadciśnienia, wpływa korzystnie na przebudowę naczyń, zmniejsza naczyniowe stężenie O_2^-

oraz zwiększa całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS). Również w nadciśnieniu rozwijającym się po nefrektomii, tempol obniża ciśnienie tętnicze [32].

Inne antyoksydanty, takie jak lazaroid, dimetylotiouracyl czy koenzym Q także – jak wykazano w badaniach klinicznych i doświadczalnych – mogą zredukować ciśnienie tętnicze [89,106,107].

Wpływ klasycznych leków hipotensyjnych na potencjał antyoksydacyjny

Należy wspomnieć, że niektóre leki stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego wykazują działanie antyoksydacyjne i poprawiają czynność śródbłonna. Właściwości takie wykazuje lacydypina, dihydropirydynowy agonista kanałów wapniowych. Lek ten stosowany u pacjentów przez 12 tygodni poprawia wazodylatację w odpowiedzi na acetylocholinę i bradykininę oraz redukuje wskaźniki stresu oksydacyjnego, takie jak: osoczowe i zawarte w LDL hydronadtlenki lipidowe, wrażliwość LDL na oksydacyjną modyfikację [97]. Lizynopryl, inhibitor enzymu konwertującego (ACE-I), poprawia osłabioną w nadciśnieniu relaksację naczyniową w odpowiedzi na bradykininę, także w mechanizmie niezależnym od hamo-

wania rozkładu kinin [98]. Właściwości przeciwutleniające ACE-I wykazano także *in vitro* [8].

Lozaratan, antagonist receptoru AT1 angiotensyny, hamuje w nadciśnieniu tętniczym zwiększone wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego oraz normalizuje rozkurcz naczyniowy [76], a także hamuje indukowaną przez RFT migrację mięśni gładkich [113]. Podobnie spironolakton (antagonista aldosteronu, hormonu, którego uwalnianie pobudzone jest przez Ang II), zmniejsza stres oksydacyjny blokując aktywność oksydazy NADPH i obniża poziom produktów peroksydacji lipidów w osoczu [109]. Blokery receptorów beta-adrenergicznych wykazują niewielkie działanie antyoksydacyjne. Udowodniono je tylko dla nielicznych przedstawicieli tej grupy np.: karwedilolu [9].

W opisanym w niniejszej pracy wyniku badań doświadczalnych wynika, iż stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patogenezie nadciśnienia. Reaktywne formy tlenu nie tylko skracają okres półtrwania NO, ale także – reagując z lipidami i białkami – prowadzą do powstania wtórnych produktów wywołujących zmiany czynnościowe i strukturalne w naczyniu, których następstwem jest przyspieszony rozwój procesu miażdżycowego. W świetle powyższego, ingerencja w obronę antyoksydacyjną ustroju w terapii nadciśnienia tętniczego jest w pełni uzasadniona.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adachi T., Fukushima T., Usami Y., Hirano K.: Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem. J.*, 1995; 289: 523-527
- [2] Aizawa T., Ishizaka N., Usui S., Ohashi N., Ohno M., Nagai R.: Angiotensin II and catecholamines increase plasma levels of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) with different pressor dependencies in rats. *Hypertension*, 2001; 39: 149-154
- [3] Archer S.L., Reeve H.L., Michelakis E., Puttagunta L., Waite R., Nelson D.P., Dinanuer M.C., Weir E.K.: O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 7944-7949
- [4] Attia D.M., Verhagen A.M., Stroes E.S., van Faassen E.E., Grone H.J., De Kimpe S.J., Koomans H.A., Braam B., Joles J.A.: Vitamin E alleviates renal injury, but not hypertension, during chronic nitric oxide synthase inhibition in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001; 12: 2585-2593
- [5] Babior B.M., Andreoli T.E.: Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 2000, 109, 33-44
- [6] Balazy M., Kaminski P.M., Mao K., Tan J., Wolin M.S.: S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 32009-32015
- [7] Bayraktutan U., Draper N., Lang D., Shah A.M.: Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, 1998; 38: 256-262
- [8] Benzie I.F., Tomlinson B.: Antioxidant power of angiotensin-converting enzyme inhibitors *in vitro*. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1998; 45: 168-169
- [9] Berry C., Brosnan M.J., Fennell J., Hamilton C.A., Dominiczak A.F.: Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2001; 10: 247-255
- [10] 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
- [11] Bouloumie A., Bauersachs J., Linz W., Scholkens B.A., Wiemer G., Fleming I., Busse R.: Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*, 1997; 30: 934-941
- [12] Cardillo C., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A., Cannon R.O. III, Panza J.A.: Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation*, 1998; 97: 851-856
- [13] Cosentino F., Patton S., d'Uscio L.V., Werner E.R., Werner-Felmayer G., Moreau P., Malinski T., Luscher T.F.: Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101: 1550-1557
- [14] Davidge S.T., Ojimba J., McLaughlin M.K.: Vascular function in the vitamin E-deprived rat: an interaction between nitric oxide and superoxide anions. *Hypertension*, 1998; 31: 830-835
- [15] De Keulenaer G.W., Chappell D.C., Ishizaka N., Nerem R.M., Alexander R.W., Griendling K.K.: Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ. Res.*, 1998; 82: 1094-1101
- [16] 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
- [17] Dieber-Rotheneder M., Puhl H., Waeg G., Striegel G., Esterbauer H.: Effect of oral supplementation with D-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J. Lipid Res.*, 1991; 32: 1525-1532
- [18] Ding J., Knaus U.G., Lian J.P., Bokoch G.M., Badwey J.A.: The re-naturable 69- and 63-kDa protein kinases that undergo rapid activation in chemoattractant-stimulated guinea pig neutrophils are p21-activated kinases. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 24869-24875
- [19] Dzau V.J.: Theodore Cooper Lecture. Tissue angiotensin and pathology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*, 2001; 37: 1047-1052
- [20] Elliott T.G., Barth J.D., Mancini G.B.: Effects of vitamin E on endothelial function in men after myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 1995; 76: 1188-1190
- [21] Frei B., Stocker R., England L., Ames B.N.: Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1990; 264: 155-163
- [22] Fujii H., Ichimori K., Hoshiai K., Nakazawa H.: Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 32773-32778

- [23] Fukui T., Ishizaka N., Rajagopalan S., Laursen J.B., Capers Q. IV, Taylor W.R., Harrison D.G., de Leon H., Wilcox J.N., Griendling K.K.: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res.*, 1997; 80: 45-51
- [24] Ghiadoni L., Taddei S., Virdis A., Sudano I., Di Legge V., Meola M., Di Venanzio L., Salvetti A.: Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 1998; 32: 25-32
- [25] Gotoh N., Niki E.: Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1115: 201-207
- [26] Gow A.J., Duran D., Malcolms S.: Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.*, 1996; 385: 63-66
- [27] Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., Alexander R.W.: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 1994; 74: 1141-1148
- [28] Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M.: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 2000; 86: 494-501
- [29] 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
- [30] Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M.: Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.*, 2000; 86: E85-E90
- [31] Haas J.A., Krier J.D., Bolterman R.J., Juncos L.A., Romero J.C.: Low-dose angiotensin II increases free isoprostane levels in plasma. *Hypertension*, 1999; 34: 983-986
- [32] Hasdan G., Bencherit S., Rashid G., Green J., Bernheim J., Rathaus M.: Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide. *Kidney Int.*, 2002; 61: 586-590
- [33] Heller R., Munscher-Paulig F., Grabner R., Till U.: L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 8254-8260
- [34] Hishikawa K., Luscher T.F.: Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 1997; 96: 3610-3616
- [35] Hishikawa K., Oemar B.S., Yang Z., Luscher T.F.: Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ. Res.*, 1997; 81: 797-803
- [36] Jackson T.S., Xu A., Vita J.A., Keaney J.F. Jr: Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ. Res.*, 1998; 83: 916-922
- [37] Jeserich M., Schindler T., Olschewski M., Unmussig M., Just H., Solzbach U.: Vitamin C improves endothelial function of epicardial coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia or essential hypertension-assessed by cold pressor testing. *Eur. Heart J.*, 1999; 20: 1676-1680
- [38] Jialal I., Grundy S.M.: Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. *J. Clin. Invest.*, 1991; 87: 597-601
- [39] Jones S.A., O'Donnell V.B., Wood J.D., Broughton J.P., Hughes E.J., Jones O.T.: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1996; 271: H1626-H1634
- [40] Kawazoe T., Kosaka H., Yoneyama H., Hata Y.: Acute production of vascular superoxide by angiotensin II but not by catecholamines. *J. Hypertens.*, 2000; 18: 179-185
- [41] Kerr S., Brosnan M.J., McIntyre M., Reid J.L., Dominiczak A.F., Hamilton C.A.: Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension*, 1999; 33: 1353-1358
- [42] Kristal B., Shurtz-Swirski R., Chezar J., Manaster J., Levy R., Shapiro G., Weissman I., Shasha S.M., Sela S.: Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 1998; 11: 921-928
- [43] Kurose I., Wolf R., Cerwinka W., Granger D.N.: Microvascular responses to ischemia/reperfusion in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 1999; 34: 212-216
- [44] Landmesser U., Cai H., Dikalov S., McCann L., Hwang J., Jo H., Holland S.M., Harrison D.G.: Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*, 2002; 40: 511-515
- [45] 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
- [46] Lembo G., Vecchione C., Izzo R., Fratta L., Fontana D., Marino G., Pilato G., Trimarco B.: Noradrenergic vascular hyper-responsiveness in human hypertension is dependent on oxygen free radical impairment of nitric oxide activity. *Circulation*, 2000; 102: 552-557
- [47] Lerman L.O., Nath K.A., Rodriguez-Portel M., Krier J.D., Schwartz R.S., Napoli C., Romero J.C.: Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension*, 2001; 37: 541-546
- [48] Levine G.N., Frei B., Koulouris S.N., Gerhard M.D., Keaney J.F. Jr, Vita J.A.: Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 1996; 93: 1107-1113
- [49] Li D., Liu L., Chen H., Sawamura T., Ranganathan S., Mehta J.L.: LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 2003; 107: 612-617
- [50] Li D.Y., Zhang Y.C., Philips M.I., Sawamura T., Mehta J.L.: Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ. Res.*, 1999; 84: 1043-1049
- [51] Liu S., Beckman J.S., Ku D.D.: Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994; 268: 1114-1121
- [52] Marumo T., Schini-Kerth V.B., Fisslthaler B., Busse R.: Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation*, 1997; 96: 2361-2367
- [53] Mayer B., Klatt P., Werner E.R., Schmidt K.: Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 655-659
- [54] Meier B., Cross A.R., Hancock J.T., Kaup F.J., Jones O.T.: Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem. J.*, 1991; 275: 241-245
- [55] Meier B., Jesaitis A.J., Emmendorffer A., Roesler J., Quinn M.T.: The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. *Biochem. J.*, 1993; 289: 481-486
- [56] Miyamoto Y., Akaike T., Yoshida M., Goto S., Horie H., Maeda H.: Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1996; 211: 366-373
- [57] Moran J.P., Cohen L., Greene M.J., Xu G., Feldman E.B., Hames C.G., Feldman D.S.: plasma ascorbic acid concentrations relate inversely to blood pressure in human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993; 57: 213-217
- [58] Moro M.A., Darley-Usmar V.M., Goodwin D.A., Read N.G., Zamora-Pino R., Feelisch M., Radomski M.W., Moncada S.: Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 6702-6706
- [59] Morrow J.D., Roberts L.J.: The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid. Res.*, 1997; 36: 1-21
- [60] Motoyama T., Kawano H., Kugiyama K., Hirashima O., Ohgushi M., Tsunoda R., Moriyama Y., Miyao Y., Yoshimura M., Ogawa H., Yasue H.: Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998; 32: 1672-1679
- [61] Nagase M., Hirose S., Fujita T.: Unique repetitive sequence and unexpected regulation of expression of rat endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1). *Biochem. J.*, 1998; 330: 1417-1422
- [62] Nakamura T., Igarashi R., Kurashina T., Saito Y., Hoshino J., Sumino H., Sakamoto H., Nagai R.: Lecithinized superoxide dismutase induces vasodilation; evidence of direct contribution of superoxide anions to modulating vascular tone. *Life Sci.*, 1999; 64: PL65-PL70
- [63] Nakazono K., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Sato T., Inoue M.: Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 10045-10048
- [64] 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
- [65] O'Donnell V.B., Azzi A.: High rates of extracellular superoxide generation by cultured human fibroblasts: involvement of a lipid-metabolizing enzyme. *Biochem. J.*, 1996; 318: 805-812

- [66] Ohara Y., Peterson T.E., Harrison D.G.: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, 1993; 91: 2546-2551
- [67] Otsuka S., Sugano M., Makino N., Sawada S., Hata T., Niho Y.: Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1998; 32: 467-472
- [68] Pagano P.J., Chanock S.J., Siwik D.A., Colucci W.S., Clark J.K.: Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*, 1998; 32: 331-337
- [69] Pagano P.J., Clark J.K., Cifuentes-Pagano M.E., Clark S.M., Callis G.M., Quinn M.T.: Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 14483-14488
- [70] Panza J.A., Casino P.R., Kilcoyne C.M., Quyyumi A.A.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 1993; 87: 1468-1474
- [71] Park J.B., Touyz R.M., Chen X., Schiffrin E.L.: Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.*, 2002; 15: 78-84
- [72] Patterson C., Ruef J., Madamanchi N.R., Barry-Lane P., Hu Z., Horaist C., Ballinger C.A., Brasier A.R., Bode C., Runge M.S.: Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47 (phox) may participate in forming this oxidase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 19814-19822
- [73] Pontremoli S., Melloni E., Salamino F., Patrone M., Michetti M., Horecker B.L.: Activation of neutrophil calpain following its translocation to the plasma membrane induced by phorbol ester or fMet-Leu-Phe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 160: 737-743
- [74] Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H., Rosen G.M.: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 24173-24176
- [75] Pryor W.A., Squadrito G.L.: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: L699-L722
- [76] Rajagopalan S., Kurz S., Munzel T., Tarpey M., Freeman B.A., Griending K.K., Harrison D.G.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.*, 1996; 97: 1916-1923
- [77] Reckelhoff J.F., Zhang H., Srivastava K., Roberts L.J. II, Morrow J.D., Romero J.C.: Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats. *Hypertension*, 2000; 35: 476-479
- [78] Romero J.C., Reckelhoff J.F.: Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*, 1999; 34: 943-949
- [79] Rotheneder M., Puhl H., Waeg G., Striegl G., Esterbauer H.: Effect of oral supplementation with D-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J. Lipid Res.*, 1991; 32: 1325-1332
- [80] Rubino A., Loesch A., Goss-Sampson M.A., Milla P., Burnstock G.: Effects of vitamin E deficiency on vasomotor activity and ultrastructural organisation of rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 1995; 115: 415-420
- [81] Rueckschloss U., Quinn M.T., Holtz J., Morawietz H.: Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002; 22: 1845-1851
- [82] Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Ruperez M., Esteban V., Suzuki Y., Mezzano S., Plaza J.J., Egido J.: Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*, 2001; 38: 1382-1387
- [83] Russo C., Olivieri O., Girelli D., Faccini G., Zenari M.L., Lombardi S., Corrocher R.: Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J. Hypertens*, 1998; 16: 1267-1271
- [84] 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
- [85] Schnackenberg C.G., Wilcox C.S.: Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension*, 1999; 33: 424-428
- [86] Scorza G., Pietraforte D., Minetti M.: Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997; 22: 633-642
- [87] Siems W.G., Capuozzo E., Verginelli D., Salerno C., Crifo C., Grune T.: Inhibition of NADPH oxidase-mediated superoxide radical formation in PMA-stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal-binding to -SH and -NH2 groups. *Free Radic. Res.*, 1997; 27: 353-358
- [88] Simons L.A., von Konigsmark M., Simons J., Stocker R., Celermajer D.S.: Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. *Atherosclerosis*, 1999; 143: 193-199
- [89] Singh R.B., Niaz M.A., Rastogi S.S., Shukla P.K., Thakur A.S.: Effect of hydrosoluble coenzyme Q10 on blood pressures and insulin resistance in hypertensive patients with coronary artery disease. *J. Hum. Hypertens.*, 1999; 13: 203-208
- [90] Siow R.C., Sato H., Leake D.S., Pearson J.D., Bannai S., Mann G.E.: Vitamin C protects human arterial smooth muscle cells against atherogenic lipoproteins: effects of antioxidant vitamins C and E on oxidized LDL-induced adaptive increases in cystine transport and glutathione. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 1662-1670
- [91] Skinner K.A., White C.R., Patel R., Tan S., Barnes S., Kirk M., Darley-Usmar V., Parks D.A.: Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 24491-24497
- [92] Solzbach U., Hornig B., Jeserich M., Just H.: Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation*, 1995; 96: 1513-1519
- [93] Stamler J.S., Simon D.I., Jaraki O., Osborne J.A., Francis S., Mullins M., Singel D., Loscalzo J.: S-nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 8087-8091
- [94] Stroes E., Hijmering M., van Zandvoort M., Wever R., Rabelink T.J., van Faassen E.E.: Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.*, 1998; 438: 161-164
- [95] Stroes E., Kastelein J., Cosentino F., Erkelens W., Wever R., Koomans H., Luscher T., Rabelink T.: Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 41-46
- [96] Suzuki H., Swee A., Zweifach B.W., Schmid-Schonbein G.W.: *In vivo* evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*, 1995; 25: 1083-1089
- [97] Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L., Magagna A., Pasini A.F., Garbin U., Cominacini L., Salvetti A.: Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. *J. Hypertens.*, 2001; 19: 1379-1386
- [98] Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L., Salvetti A.: The role of endothelium in human hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 1998; 7: 203-209
- [99] Takemoto M., Egashira K., Usui M., Numaguchi K., Tomita H., Tsutsui H., Shimokawa H., Sueishi K., Takeshita A.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.*, 1996; 97: 1916-1923
- [100] Tanner F.C., Noll G., Boulanger C.M., Luscher T.F.: Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*, 1991; 83: 2012-2020
- [101] Tarpey M.M., Beckman J.S., Ischiropoulos H., Gore J.Z., Brock T.A.: Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett.*, 1995; 364: 314-318
- [102] Ting H.H., Timimi F.K., Boles K.S., Creager S.J., Ganz P., Creager M.A.: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 1996; 97: 22-28
- [103] Tse W.Y., Maxwell S.R., Thomason H., Blann A., Thorpe G.H., Waite M., Holder R.: Antioxidant status in controlled and uncontrolled hypertension and its relationship to endothelial damage. *J. Hum. Hypertens.*, 1994; 8: 843-849
- [104] Ushio-Fukai M., Zafari A.M., Fukui T., Ishizaka N., Griending K.K.: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 23517-23521

- [105] Vasquez-Vivar J., Kalyanarman B., Martasek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo H., Pritchard K.A.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 9220-9225
- [106] 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
- [107] Vaziri N.D., Oveisi F., Ding Y.: Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int.*, 1998; 53: 1748-1754
- [108] Vaziri N.D., Wang X.Q., Oveisi F., Rad B.: Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*, 2000; 36: 142-146
- [109] Virdis A., Neves M.F., Amiri F., Viel E., Touyz R.M., Schiffrin E.L.: Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*, 2002; 40: 504-510
- [110] Wang H.D., Johns D.G., Xu S., Cohen R.A.: Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002; 282: H1697-H1702
- [111] Wu L., Juurlink B.H.: The impaired glutathione system and its up-regulation by sulforaphane in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 2001; 19: 1819-1825
- [112] Wu M., Pritchard K.A. Jr, Kaminski P.M., Fayngersh R.P., Hintze T.H., Wolin M.S.: Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am. J. Physiol.*, 1994; 266: H2108-H2115
- [113] Yasunari K., Maeda K., Nakamura M., Yoshikawa J.: Pressure promotes angiotensin II-mediated migration of human coronary smooth muscle cells through increase in oxidative stress. *Hypertension*, 2002; 39: 433-437
- [114] Zafari A.M., Ushio-Fukai M., Akers M., Yin Q., Shah A., Harrison D.G., Taylor W.R., Griendling K.K.: Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*, 1998; 32: 488-495
- [115] 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
- [116] Zhang H., Schmeisser A., Garlich C.D., Plotze K., Damme U., Muge A., Daniel W.G.: Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc. Res.*, 1999; 44: 215-222
- [117] Zou M., Martin C., Ullrich V.: Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.*, 1997; 378: 707-713
- [118] Zou M.H., Ullrich V.: Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett.*, 1996; 382: 101-104
- [119] Zulueta J.J., Yu F.S., Hertig I.A., Thannickal V.J., Hassoun P.M.: Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1995; 12: 41-49