

Received: 2007.06.19
Accepted: 2007.09.17
Published: 2007.10.12

EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący. Znaczenie w fizjologii i chorobach naczyń krwionośnych

Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF):
Potential involvement in the physiology and pathology
of blood vessels

**Hanna Kozłowska, Marta Baranowska, Anna Gromotowicz,
Barbara Malinowska**

Zakład Fizjologii Doświadczalnej AM, Białystok

Streszczenie

Śródbłonek naczyniowy pełni istotną rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej poprzez syntezę i uwalnianie czynników regulujących napięcie ściany naczyń krwionośnych, takich jak: prostacyklina (PGI_2), tlenek azotu (NO) i niezidentyfikowany jeszcze do końca czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego – EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor). Natura EDHF budzi wiele kontrowersji, jednak ten dodatkowy, zależny od śródbłonka szlak hiperpolaryzacji, został potwierdzony w wielu naczyniach krwionośnych różnych gatunków zwierząt, a także człowieka. Mimo znacznych różnic gatunkowych i tkankowych, dominujący udział EDHF w relaksacji poszczególnych łożysk naczyniowych dotyczy głównie naczyń oporowych i mikrokrążenia. Najbardziej prawdopodobnymi kandydatami do miana EDHF są kwasy epoksy-eikozatrienowe, jony K^+ pochodzące z komórek śródbłonka i nadtlenek wodoru. Hiperpolaryzacja zależna od śródbłonka prawdopodobnie wiąże się także z pobudzeniem zależnych od stężenia jonów wapnia małych i średnich śródbłonkowych kanałów potasowych (SK_{Ca} i IK_{Ca}). Wskazuje się również, że odpowiedź hiperpolaryzacyjna rozprzestrzenia się dzięki istnieniu elektrycznej komunikacji w postaci połączeń szczelinowych „gap junction” między komórkami śródbłonka a miocytami. Odpowiedź relaksacyjna zachodząca z udziałem EDHF jest zależna od płci i wyraźnie zmniejsza się wraz z wiekiem, a także w różnych stanach patologicznych związanych z dysfunkcją śródbłonka, m.in. hipoksji, nadciśnieniu, miażdżycy, cukrzycy. Wydaje się, iż odpowiednie postępowanie terapeutyczne może przywrócić właściwe działanie EDHF. Pobudzenie śródbłonkowych kanałów potasowych czy oddziaływanie na połączenia szczelinowe typu „gap” mogą w przyszłości stanowić interesujący cel terapeutyczny.

Słowa kluczowe:

śródbłonek • hiperpolaryzacja • czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego – EDHF • tlenek azotu • prostacyklina • kwasy epoksy-eikozatrienowe • kanały potasowe • nadtlenek wodoru • połączenia szczelinowe – „gap junction”

Summary

Vascular endothelium plays an important role in maintaining vascular homeostasis by synthesizing and releasing some vasodilating factors, such as prostacyclin (PGI_2), nitric oxide (NO), and a yet unidentified endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Although the nature of

EDHF is still controversial, this additional endothelial pathway, endothelium-dependent hyperpolarization, has been demonstrated in many blood vessels of different species, including humans. Despite tissue- and species-specific site differences, endothelium-dependent hyperpolarization plays an important role in the regulation of resistance of vessels and microcirculation. The most probable candidates for EDHF include epoxyeicosatrienoic acids, endothelium-derived potassium ions (K^+), and hydrogen peroxide (H_2O_2). Endothelium-dependent hyperpolarization also probably involves the activation of two populations of endothelial potassium channels, i.e. the small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (SK_{Ca} and IK_{Ca}). Electrical communication between endothelial and smooth muscle cells through gap junctions has also been suggested to be involved in endothelium-dependent hyperpolarization. EDHF-mediated responses are clearly sex-dependent and altered in aging and various pathological conditions, such as hypoxia, hypertension, atherosclerosis, and diabetes, which are mainly related to endothelial dysfunction. Suitable therapeutic treatment can restore these impaired vascular responses. Activating endothelial potassium channels or improving myo-endothelial communication could become interesting therapeutic targets.

Key words: endothelium • hyperpolarization • endothelium-derived hyperpolarizing factor – EDHF • nitric oxide • prostacyclin • epoxyeicosatrienoic acids • potassium channels • hydrogen peroxide • “gap junction”

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11354.pdf

Word count: 3644

Tables: –

Figures: 4

References: 91

Adres autorki: dr Hanna Kozłowska, Zakład Fizjologii Doświadczalnej AM, ul. Mickiewicza 2a, 15-089 Białystok; e-mail: hkozl@amb.edu.pl

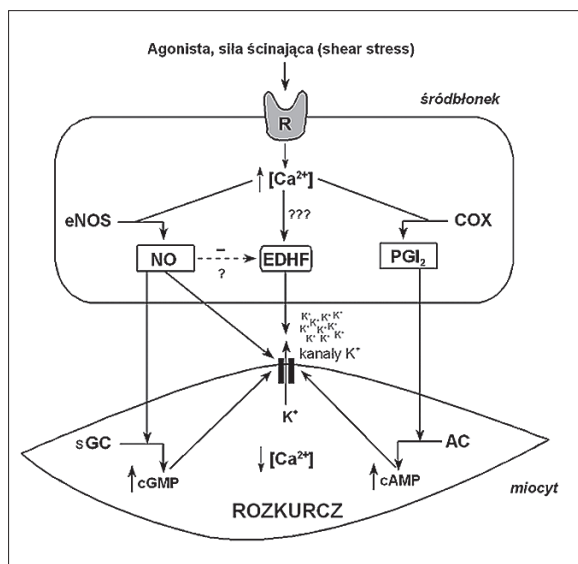
Wykaz skrótów: **AA** – kwas arachidonowy; **AC** – cyklaza adenylanowa; **Ach** – acetylocholina; **ATP** – trifosforan adenozyne; **BK_{Ca}** – kanały potasowe zależne od stężenia jonów wapnia o dużym przewodnictwie; **Ca²⁺** – jony wapnia; **cAMP** – cykliczny monofosforan adenozyne; **cGMP** – cykliczny monofosforan guanozyne; **ChTx** – charybdotoksyna; **CNP** – peptyd natriuretyczny C; **COX** – cyklooksigenaza; **Cu/Zn-SOD** – dysmutaza nadtlenkowa; **DHET** – kwas dihydroksyeikozatrienowy; **EDHF** – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący; **EETs** – kwasy epoksyekozatrienowe; **EHDD** – kwas epoksydeksadekadienowy; **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu; **GAP** – połączenia mio-endotelialne; **HETE** – kwas hydroksyeikozatrienowy; **H₂O₂** – nadtlenek wodoru; **IbTx** – iberiotoksyna; **IK_{Ca}** – kanały potasowe zależne od stężenia jonów wapnia o średnim przewodnictwie; **IP₃** – trójfosforan inozytolu; **K⁺** – jony potasu; **K_{ATP}** – kanały potasowe zależne od ATP; **K_{IR}** – kanały potasowe wewnątrzprostownicze; **K_v** – kanały potasowe zależne od napięcia; **L-NAME** – ester metylowy N ω -nitro-L-argininy; **NADPH** – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego; **NO** – tlenek azotu; **ODYA** – kwas oktadecynowy, inhibitor cytochromu P-450; **PGI₂** – prostacyklina; **PLA₂** – fosfolipaza A₂; **sGC** – cyklaza guanylowa; **SK_{Ca}** – kanały potasowe zależne od stężenia jonów wapnia o małym przewodnictwie.

WSTĘP

Odkrycie przez Furchgotta i Zawadzkiego [39] w 1980 r. zjawiska hiperpolaryzacji zależnej od śródbłonka zapoczątkowało obiecujące badania nad jego rolą w regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych. Wykazano, iż zmiana ta, czyli powstanie bardziej ujemnego potencjału wewnątrzkomórkowego na skutek wpływu dodatnich jonów z wnętrza komórki i relaksacja naczynia, jest następstwem uwolnienia z komórek śródbłonka jednej lub kilku substancji wazoaktywnych (hiperpolaryzujących), m.in.: tlenu azotu (NO) i prostacykliny (PGI₂) [39,83]. W ostatnich latach

stało się oczywiste, że nie są to jedyne substancje odpowiedzialne za rozkurcz naczyń. Tlenek azotu i prostacyklina hiperpolaryzują miocyty i hamują aktywność miogenną ściany naczyniowej zarówno pośrednio przez drugie przekaźniki (odpowiednio cGMP i cAMP), jak i bezpośrednio przez aktywację kanału potasowego K_{ATP} zależnego od stężenia ATP w komórce (ryc. 1).

Zauważono, że hiperpolaryzacja miocytów naczyń krwionośnych szczura i świnki morskiej stymulowana chemicznie (np. przez acetylocholinę, bradykininę), bądź mechanicznie (tzw. napięcie ścinające „shear stress”) utrzymywała się za-



Ryc. 1. Kompensacyjne działanie śródbłonkowych czynników hiperpolaryzacyjnych. Hiperpolaryzacja mięśni gładkich może zachodzić za pośrednictwem trzech różnych szlaków: tlenu azotu (NO), śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (EDHF) i prostacykliny (PGI₂). Hiperpolaryzacja zależna od NO odbywa się przez pobudzenie kanałów potasowych bezpośrednio lub pośrednio przez drugi przekaźnik cGMP, a zależna od PGI₂ wymaga pośrednictwa przekaźnika cAMP. EDHF aktywuje kanały potasowe. W warunkach osłabionej syntezy NO (np. dysfunkcje śródbłonna, hipercholesterolemia) EDHF może kompensować działanie NO

równy po zablokowaniu wytwarzania przez śródbłonek NO i PGI₂, jak i K_{ATP} w mięśniach [22,58,89]. Potwierdziło to istnienie dodatkowego, parakrynnego regulatora tonu naczyniowego NO- i PGI₂-niezależnego – **śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego** komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych – **EDHF** (endothelium-derived hyperpolarizing factor) [24,81,84].

EDHF jest prawdopodobnie syntetyzowaną w śródbłonce substancją, wrażliwą na blokery kanałów potasowych i/lub wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K⁺ i uwalnianą w wyniku stymulacji fizycznej czy też farmakologicznej. Może być także zmianą potencjału błonowego generowaną w komórkach śródbłonna. Dyfundując do miocytów prowadzi do hiperpolaryzacji ich błony komórkowej, a w konsekwencji do rozkurczu bez wzrostu, charakterystycznego dla klasycznych substancji rozszerzających naczynia, wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznych nukleotydów – cGMP bądź cAMP. W warunkach eksperymentalnych poprzez zależną od EDHF relaksację naczynia rozumiemy działanie w obecności blokady NO i PGI₂ [26,31].

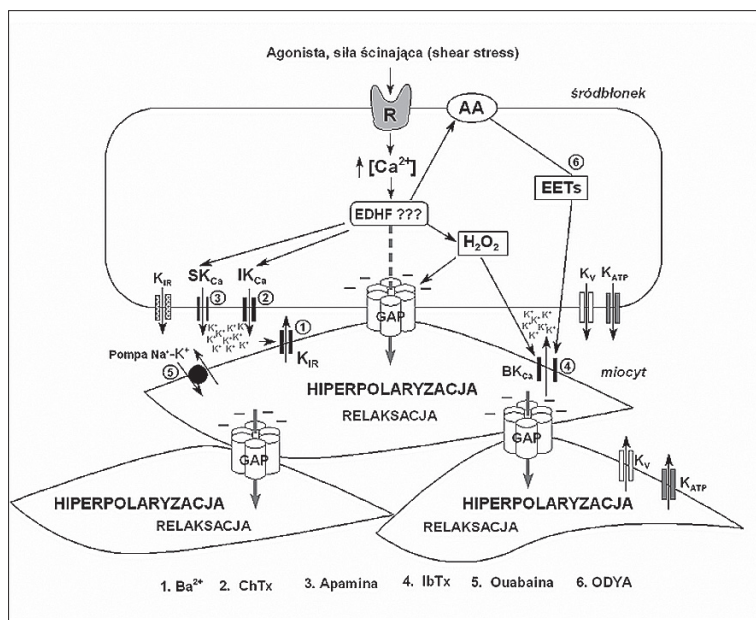
Historia EDHF sięga 1988 r., kiedy to Félétou i Vanhoutte [27] opisali po raz pierwszy, czynnik powodujący rozkurcz izolowanej tętnicy wieńcowej psa, uprzednio skurzonej pod wpływem fenylefryny. Mimo zastosowania L-NAME (ester metylowy N^o-nitro-L-argininy) i indometacyny (blokujących odpowiednio powstawanie tlenu azotu i prostacykliny), acetylocholina wciąż powodowała relaksację tych naczyń [27,83]. Obserwacje te skłoniły do wysunięcia hipotezy o istnieniu dodatkowego, niezależnego od NO i PGI₂, czynnika wytwarzanego przez komórki śródbłonna, któ-

ry powoduje hiperpolaryzację i rozkurcz naczyń krwionośnych [7,28,61]. Mimo iż mechanizm działania EDHF dotąd nie został do końca poznany, niewątpliwie jest istnienie dodatkowej drogi oddziaływania między komórkami śródbłonna a komórkami mięśni gładkich naczyń.

Obecność EDHF została potwierdzona w wielu łożyskach naczyniowych u różnych gatunków zwierząt i u ludzi. Mimo znacznych różnic gatunkowych i tkankowych, udział śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego dotyczy głównie rozkurczu naczyń oporowych i mikrokrążenia [26]. Istnieje prosta zależność funkcjonowania EDHF od średnicy naczyń. Jego znaczenie wzrasta, gdy średnica naczyń maleje (wyjątek stanowi krążenie wieńcowe i naczynia nerkowe, gdzie pełni główną rolę niezależnie od wielkości tętnicy) [82]. O ile w doświadczeniach z użyciem zwierzęcych naczyń o funkcji transportowej: aorta [48], tętnica piersiowa [87], blokada tlenu azotu i prostacykliny całkowicie nieosiągnęła wazorelaksację, to zależne od śródbłonna zdolności rozkurczowe naczyń o średnicy co najmniej 300 μm były związane z działaniem zarówno NO, jak i EDHF [34]. W tętnicach o średnicy mniejszej niż 300 μm znaczenie tlenu azotu jako wazodylatora maleje na rzecz EDHF [26,65]. Badania funkcjonalne, wskazujące na zależność wielkości średnicy naczyń a obecnością substancji rozkurczowych i punktów uchwytu ich działania zostały również potwierdzone badaniami elektrofizjologicznymi, w których udowodniono, że zależne od śródbłonna zmiany potencjału błonowego korelują ze średnicą naczyń i są znacząco większe w naczyniach o mniejszym przekroju [44,78].

HIPERPOLARYZACJA Z UDZIAŁEM EDHF A ROZKURCZ MIĘŚNI GŁADKICH ŚCIANY NACZYŃIA TĘTNICZEGO

Hiperpolaryzacja komórek śródbłonna pod wpływem chemicznych ligandów (m.in. acetylocholino, bradykininy), a także napięcia ścinającego przepływającej krwi, nasilają gradient elektryczny wejścia do komórki jonów Ca²⁺. W warunkach doświadczalnych sytuację taką można symulować za pomocą jonoforów Ca²⁺, np.: A 23187 – [47]. Inną możliwością jest uwolnienie Ca²⁺ z magazynów wewnątrzkomórkowych (farmakologiczna blokada Ca²⁺-ATP-azy sarkoplazmatycznej tapsigaryną czy kwasem cyklopiazonowym – [38]). Wszystkie powyższe metody prowadzą do globalnego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺, co koreluje z nasileniem syntezy i uwalniania parakrynnych czynników naczyniorozszerzających, w tym EDHF [7]. Wskazuje się, iż jony Ca²⁺ uwolnione z siateczki sarkoplazmatycznej inicjują wytwarzanie EDHF, podczas gdy ich przezbłonowy napływ przez nieswoiste kanały jest istotny dla odpowiedzi zależnej od EDHF [37,62,79]. Niewątpliwym potwierdzeniem istotności jonów Ca²⁺ w regulacji zależnych od EDHF procesów naczyniowych (w obecności blokerów syntazy tlenu azotu i prostacykliny) jest obserwacja osłabionej odpowiedzi na bradykininę w środowisku bezwapniowym bądź w obecności blokerów dokomórkowych kanałów wapniowych, m.in. jonów Ni²⁺ [79]. Nie stwierdzono ostatecznie, czy rozpręszanie się hiperpolaryzacji z komórek śródbłonna na miocyty ma charakter chemiczny, tj. odbywa się za pośrednictwem różnych przekaźników, czy też może polega na przenoszeniu ładunków elektrycznych przez niskooporowe złącza szczelinowe, tzw. „gap junction” [42,43].



Ryc. 2. Potencjalne mechanizmy działania śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (EDHF). Pobudzenie receptorów śródbłonkowych (neurohumoralne, farmakologiczne, napięcie ścinające „shear stress”) prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) w komórkach śródbłonka, w wyniku czego dochodzi do uwalniania czynnika hiperpolaryzującego – EDHF. Potencjalne mechanizmy działania tego czynnika mogą się opierać na bezpośrednim pobudzeniu śródbłonkowych kanałów potasowych (SK_{Ca} , IK_{Ca}), aktywacji w śródbłonku i miocytach kanałów potasowych (SK_{Ca} , IK_{Ca} , BK_{Ca} , K_{IR}) za pośrednictwem wtórnych przekaźników, takich jak kwasy epoksyeikozatrienowe (EETs) powstające z kwasu arachidonowego (AA), nadtlenuk wodoru (H_2O_2), jony K^+ . Hiperpolaryzacja z komórek śródbłonka przenosi się na sąsiednie komórki śródbłonka bądź na położone poniżej miocyty, prawdopodobnie za pośrednictwem połączeń mio-endotelialnych – „gap junction” (GAP), prowadząc do hiperpolaryzacji i rozkurczu mięśni gładkich. 1–6 miejsce działania i blokery kanałów potasowych zależnych od Ca^{2+}

POTENCJALNE MECHANIZMY DZIAŁANIA EDHF

Istnieje kilka teorii tłumaczących, czym jest i jak działa EDHF. Uznanie jednej z nich za nadrzędną nie jest możliwe, co wynika z tego, że u różnych gatunków, a nawet w różnych naczyniach, inny czynnik może odpowiadać za hiperpolaryzację [84]. Na przestrzeni kilku ostatnich lat, EDHF był określany najczęściej jako jony potasu, kwasy epoksyeikozatrienowe, nadtlenek wodoru, połączenia „gap junction” oraz rzadziej jako peptyd natyretyczny C, anandamid [1,7,32,42] (ryc. 2).

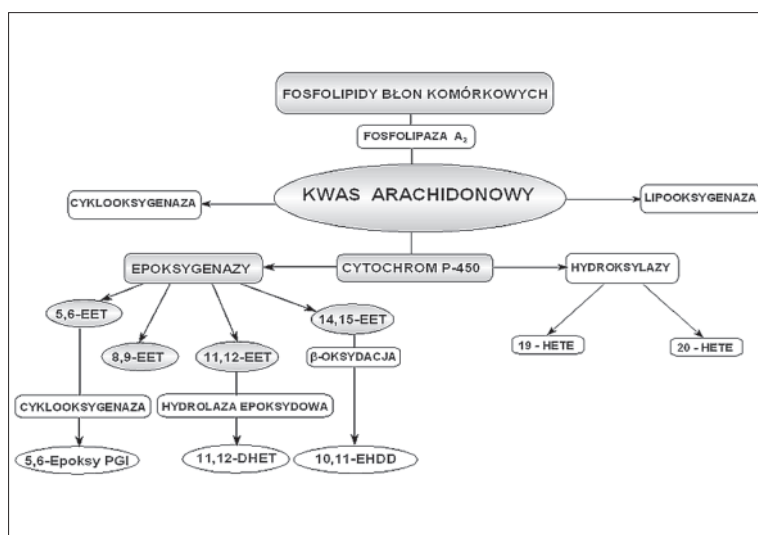
JONY K^+ JAKO EDHF

W doświadczeniach na izolowanych naczyniach zwierząt i człowieka wielu autorów [13,14,22,24] potwierdziło związek między mechanizmem działania czynnika hiperpolaryzującego EDHF i pobudzeniem (zarówno bezpośrednim jak i pośrednim) kanałów potasowych w śródbłonku i miocytach. Wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ powyżej 25 mM znosił zjawisko hiperpolaryzacji [12], natomiast zastosowanie związków powodujących hiperpolaryzację błony komórkowej (m.in. acetylocholiny, bradykininy) prowadziło do wpływu znakowanych radioaktywnie jonów ^{42}K [7].

W 1998 r. po raz pierwszy opublikowano, że jony K^+ mogą być EDHF [22]. W szczyrzej tętnicy wątrobowej dochodziło do wzrostu zewnątrzkomórkowych prądów potasowych po podaniu acetylocholiny czy bradykininy, co powodowało hiperpolaryzację zarówno śródbłonka, jak i komórek mięśni gładkich. Reakcja rozkurczowa naczyń krwionośnych tętnicy szyjnej świnki morskiej bądź szczyrzej tętnicy wątrobowej wywołana przez EDHF była całkowicie, bądź prawie całkowicie hamowana przez podane jednocześnie apaminę i charydotoksynę (blokujących odpowiednio kanały potasowe o małej (SK_{Ca}), średniej (IK_{Ca}) i dużej (BK_{Ca}) przewodności). Nie była natomiast zmniejszana przez iberiotoksynę (selektywnego blokera kanałów potasowych o dużej przewodności dla jonów wapnia

BK_{Ca}) [16,22]. Wskazywałoby to na udział w komponencie śródbłonkowej „odpowiedzi z EDHF” kanałów potasowych zależnych od wapnia o małej (SK_{Ca}) i średniej (IK_{Ca}) przewodności. Prawdopodobnie toksyny blokujące kanały potasowe zależne od wapnia K_{Ca} (apamina i charydotoksyna) działają na śródbłonek naczyniowy, gdyż ich podanie bezpośrednio do komórek śródbłonka zapobiegło zależnej od EDHF relaksacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych [21], a ich hamujące właściwości polegały na obniżeniu siły napędowej wejścia jonów wapniowych do komórki [80] (ryc. 2).

Dodatkowo, 1-etyl-2-benzimidazolinon (1-EBIO), aktywator IK_{Ca} i prawdopodobnie SK_{Ca} , ale nie BK_{Ca} powodował hiperpolaryzację śródbłonka, a odpowiedź ta była wrażliwa na charydotoksynę, a niewrażliwa na iberiotoksynę [15,23]. Następnym otwarciem tych kanałów jest wpływ jonów potasu i zwiększenie ich stężenia w przestrzeni pomiędzy komórkami śródbłonka a miocytami. Umiarkowany wzrost $[K^+]$ w tej przestrzeni (tj. <15 mM) może wywołać hiperpolaryzację i rozkurcz mięśni gładkich przez pobudzenie kanałów potasowych „wewnątrzprzostowniczych” – K_{IR} oraz aktywację Na^+/K^+ -ATP-azy obecnej w błonie miocytów [13] (ryc. 2). W badaniach na tętnicy wątrobowej i krezkowej szczura Edwards i wsp. [22] zauważyli, że hiperpolaryzacja mięśni gładkich może być częściowo zahamowana przez ouabainę (inhibitor Na^+/K^+ -ATP-azy) i niskie stężenia jonów Ba^{2+} (30 μ M) (bloker K_{IR}) lub zniesiona całkowicie przez podanie tych dwóch związków razem. Utrzymana hiperpolaryzacja śródbłonka, mimo zniesionej hiperpolaryzacji miocytów wskazuje, że blokery te działają tylko na poziomie mięśni gładkich [22]. Niewątpliwie zmiany w stężeniu zewnątrzkomórkowych jonów K^+ odgrywają istotną rolę w regulacji napięcia naczyniowego naczyń o małej średnicy, a więc tej części łóżyska naczyniowego, gdzie dominującą rolę rozkur-



Ryc. 3. Metabolizm kwasu arachidonowego. Kwas arachidonowy, uwalniany z błon komórkowych, pod wpływem epoksygenaz cytochromu P-450 zostaje zmetabolizowany do aktywnych produktów – kwasów epoksyekoizatrienowych (EET), które pretendują do miana czynnika hiperpolaryzującego – EDHF

czową odgrywa EDHF. Zastanawia jednakże to, czy źródłem jonów K^+ są rzeczywiście komórki śródbłonka, które zajmują relatywnie do komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych małą powierzchnię i czy niewielki wzrost stężenia jonów K^+ jest wystarczający do pobudzenia kanałów potasowych i zmian napięcia w mięśniówce naczyniowej? Istnieje również hipoteza potwierdzona licznymi modelami badawczymi, z użyciem mikroelektrod, volta-ge clamp i miografów o wysokim stopniu specjalizacji EDHF w zależności od łożysk naczyniowych użytych do doświadczeń [15]. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ powodowały zależną od EDHF odpowiedź w tętnicy wątrobowej szczura, ale nie w tętnicach podśluzówkowych i wieńcowych świnki morskiej czy ludzkich naczyń podskórnych [15].

Z pewnością jony K^+ są w niektórych łożyskach naczyniowych (m.in. w naczyniach krezkowych szczura, myszy i świnki morskiej) jednym z głównych lecz nie jedynym, kofaktorem reakcji zależnych od EDHF [18,19,20,22].

KWASY EPOKSYEKOIZATRIENOWE (EETs) JAKO EDHF

Kwas arachidonowy pochodzący z błon komórkowych jest przekształcany przez różne enzymy do wielu metabolitów, które wpływają na napięcie mięśni gładkich naczyń krwionośnych (tromboksan, prostaglandyny, prostacykliny). Kwasy epoksyekoizatrienowe (5,6-EETs, 8,9-EETs, 11,12-EETs, 14,15-EETs) powstają w wyniku przemiany kwasu arachidonowego pod wpływem epoksygenaz cytochromu P-450 stymulowanych wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego jonów Ca^{2+} [9,10,33] (ryc. 3).

Kwasy epoksyekoizatrienowe, zarówno endo-, jak i egzogenne rozkurczały mięśnie gładkie naczyń poprzez wpływ na śródbłonkowe kanały potasowe – IK_{Ca} i SK_{Ca} oraz mięśniowe BK_{Ca} [7,9,10,32] (ryc. 2).

Rolę kwasów EETs, jako EDHF potwierdzono głównie na izolowanych naczyniach wieńcowych świni, psa, bawołu, a także ludzkich tętnicach wieńcowych [7]. W naczyniach tych hiperpolaryzacja była hamowana przez inhibitory cytochromu P-450 (klotrimazol, proadifen, 17-ODYA

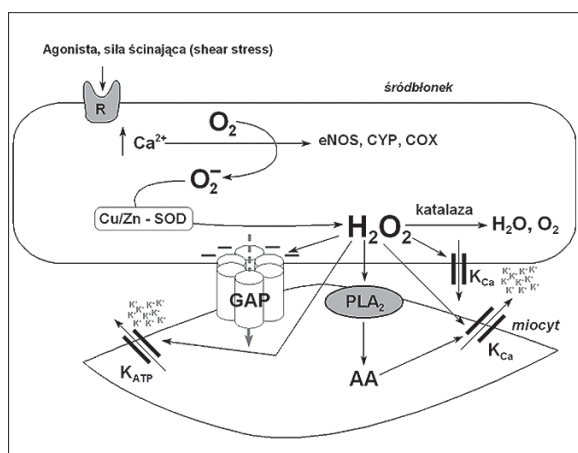
– kwas oktadecynowy), a zwiększana przez czynniki aktywujące cytochrom P-450 (3-metylocholanren lub beta-naftoflawon) [67]. Podobne obserwacje poczyniono w naczyniach ludzkich: tętnicy wieńcowej, piersiowej wewnętrznej oraz podskórnej [3,33].

Jednak brak wpływu inhibitora cytochromu P-450 -17-ODYA i egzogenne podanych EETs wykluczały potencjalny udział EETs w relaksacji izolowanej tętnicy szyjnej świnki morskiej [10]. Rola pochodnych kwasu arachidonowego była dodatkowo kwestionowana, ponieważ działały one przez kanały potasowe zależne od jonów wapnia (BK_{Ca}), blokowane przez iberiotoksynę, a nie przez kanały potasowe wrażliwe na apaminę i charybdotoksynę (SK_{Ca} i IK_{Ca}), czyli mechanizm charakterystyczny dla EDHF [58]. Co więcej, Fisslthaler i wsp. [29] wykazali brak wrażliwości tętnicy wieńcowej świni na jony Ba^{2+} i ouabainę (blokery kanałów K_{IR} i Na^+K^+ -ATP-azy) w wyniku stymulacji agonistą odpowiedzi zależnej od EDHF, a rozkurcz wywołany podaniem 11,12-EET w tętnicy wieńcowej wołu był identyczny w przypadku naczyń z zachowanym i usuniętym śródbłonkiem, co przeczy teorii kwasów epoksyekoizatrienowych, jako głównych autokrynych modulatorów funkcji komórek śródbłonka [69].

Jak wynika z wielu badań kwasy EETs nie są w stanie odpowiadać za całość hiperpolaryzacji. W niektórych naczyniach mogą być jedynie czynnikiem modulującym odpowiedź hiperpolaryzującą, poprzez zwiększanie napływu jonów wapnia do komórek, zwiększenie wrażliwości kanałów potasowych zależnych od stężenia wapnia (wrażliwych na iberiotoksynę), a także przez stymulację połączeń „gap junction” [7,10,84].

NADTLENEK WODORU JAKO EDHF

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest wytwarzany z anionorodników ponadtlenkowych pod wpływem dysmutazy nadtlenkowej w wielu komórkach organizmu, w tym w śródbłonku naczyniowym. Ich źródłem są: syntaza tlenu azotu (eNOS), cyklooksygenazy, lipooksygenazy, epoksygenazy cytochromu P-450 i oksydazy NADPH. Nasiloną syntezą H_2O_2 z udziałem eNOS zachodzi przy braku jej substratu



Ryc. 4. Nadtlenek wodoru jako potencjalny EDHF. W wyniku pobudzenia receptorów śródbłonkowych (neurohumoralnego, farmakologicznego, napięciem ścinającym „shear stress”) dochodzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w komórkach śródbłonna i aktywacji wielu enzymów – syntazy tlenu azotu (eNOS), cyklooksigenazy (COX), peroksydazy cytochromu P-450 (CYP). Aktywacja tych enzymów prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu (O_2^-), które zredukowane przez dysmutazę ponadtlenkową (Cu/Zn – SOD) są źródłem m.in. nadtlenu wodoru (H_2O_2). Uważa się, że H_2O_2 wywołuje odpowiedź hiperpolaryzacyjną za pośrednictwem różnych mechanizmów, m.in. połączeń szczelinowych „gap junction”, a także aktywuje bezpośrednio i pośrednio śródbłonkowe i miocytowe kanały potasowe (K_{Ca} i K_{ATP}) wpływając na uwalnianie kwasu arachidonowego (AA) poprzez pobudzenie fosfolipazy A_2 (PLA_2). Pod wpływem katalazy H_2O_2 rozkładany jest do H_2O i O_2

(L-argininy), bądź kofaktora BH4 (tetrahydrobiopteryna) [64], prowadząc do upośledzonego wytwarzania tlenu azotu. Powstały H_2O_2 pobudza kanały potasowe zależne od wapnia (K_{Ca}) i ATP (K_{ATP}) w komórkach śródbłonna i w komórkach mięśni gładkich naczyń co prowadzi do ich hiperpolaryzacji [51,58,75] (ryc. 4).

Nadtlenek wodoru uznano po raz pierwszy za EDHF w izolowanych tętnicach krezkowych myszy pozbawionych śródbłonkowej syntazy tlenu azotu [57]. W badaniach tych zauważono, że rozkurcz naczyń krwionośnych pod wpływem acetylocholino był zmniejszany przez katalazę (enzym rozkładający nadtlenek wodoru), co wskazuje na powiązanie ze śródbłonkową syntezą nadtlenu wodoru. Katalaza zmniejszała również hiperpolaryzację wywołaną podaniem bradykininy w tętnicy krezkowej szczura i naczyniach mózgowych świni [75].

Teorię o nadtlenu wodoru jako czynniku EDHF potwierdzono również w doświadczeniach na tętnicach krezkowych i wieńcowych człowieka. W naczyniach tych katalaza znacząco osłabiała, a podanie egzogennej nadtlenu wodoru przywracało hiperpolaryzację i rozkurcz zależny od EDHF po podaniu agonistów (m.in. acetylocholino (Ach), bradykininy) [56,75].

Uznanie EDHF za nadtlenek wodoru otworzyło nowe obszary badań nad czynnikami hiperpolaryzującymi w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Dalsze prace pozwolą wyjaśnić proces powstawania H_2O_2 w śródbłonna, mechanizm jego naczyniorozszerzającego działania, a tak-

że rolę, jaką odgrywa w fizjologii i patofizjologii układu krążenia [72,75].

POŁĄCZENIA SZCELINOWE „GAP JUNCTION” JAKO EDHF

„Gap junction” pod względem strukturalnym są małymi, niskooporowymi porami w błonach przylegających do siebie komórek, co umożliwia bezpośrednie, dwukierunkowe przekazywanie sygnałów między komórkami, jak też molekuł o budowie hydrofilnej (np.: cAMP, cGMP, IP_3 , czy też nieorganicznych jonów, w tym Ca^{2+}). Niskooporowe złącza przypominają kanały, dlatego też zostały nazwane „hemichannels” – pseudokanałami, zbudowanymi z podjednostek proteinowych – koneksyn, przy czym za najistotniejszą pod względem strukturalnym i funkcjonalnym i to zarówno w śródbłonna, jak i w komórkach mięśni gładkich, uważa się koneksynę 43 [80]. Pojedyncze „gap junction” mogą łączyć się w agregaty, tworząc rozbudowaną i gęstą sieć połączeń, widocznych pod mikroskopem elektronowym. Taka sieć znacznie ułatwia komunikację między komórkami, a tym samym przekazywanie różnych czynników [42,43] (ryc. 2).

„Gap junction” mogą występować pomiędzy komórkami homotypowymi: komórka śródbłonna – komórka śródbłonna, miocyt – miocyt, ale także pomiędzy komórkami heterotypowymi, np. komórka śródbłonna – miocyt, umożliwiając przekazywanie hiperpolaryzacji z jednej komórki na drugą. Istnienie tych swoistych zespoleń po części tłumaczy zjawisko powstania i rozprzestrzeniania się hiperpolaryzacji z endotelium na sąsiednie komórki śródbłonna, a także na położone niżej komórki mięśni gładkich, w odpowiedzi na działanie agonistów, np. Ach, bradykininy i substancji P [42] (ryc. 2). Wiele doświadczeń wskazuje na pośrednictwo połączeń mio-endotelialnych w zjawisku EDHF („EDHF phenomenon”) [42], wykluczając tym samym istnienie EDHF jako potencjalnie funkcjonalnej molekuly. Badania dowodzą, że liczba tych heterotypowych zespoleń (mio-endotelialnych) wzrasta, gdy średnica naczyń maleje, co oznacza, że „gap junction” odgrywają rolę głównie w mikrokrążeniu [7]. Powyższa zależność koreluje zatem z głównym miejscem występowania i działania EDHF. Emmerson i Segal [25] potwierdzili istnienie połączeń szczelinowych i główną rolę śródbłonna w inicjowaniu i transdukcji zmian hiperpolaryzacyjnych w tętniczkach odżywczych mięśni szkieletowych chomika po podaniu Ach. Reakcja była całkowicie zniesiona w przypadku zniszczenia śródbłonna, a zachowana przy uszkodzeniu warstwy mięśniowej. Dodatkowo istnienie funkcjonalnej komunikacji elektrycznej między śródbłonna i miocytami wykazano m.in. w badaniach z użyciem podśluzówkowych arterioli jelita cienkiego świnki morskiej. Ach w sposób wrażliwy na charybdotoksynę i apaminę indukowała wypływ jonów K^+ z komórki śródbłonkowej i mięśniowej, natomiast podanie Ach w obecności nieselektywnych blokerów połączeń „gap junction” (halotan, heptanol, kwas 18- α -glicyryzynowy) wywołało ucieczkę jonów K^+ z komórek śródbłonna przy braku jakichkolwiek zmian w przepływie jonów w komórkach mięśni gładkich [15,88].

„Gap junction” umożliwia rozprzestrzenianie się hiperpolaryzacji ze śródbłonna na mięśnie gładkie naczyń powodując zamykanie w błonie miocytów zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu L (VGCC-L) i tym samym zmniejszenie stężenia jonów wapnia w miocycie i relak-

sację mięśni gładkich. Badania strukturalne potwierdzają udział „gap junction” w integracji komunikacji śródbłonkowo-mięśniowej, pomimo bliskich kontaktów komórek endotelium i miocytów, charakter przekazywanej hiperpolaryzacji pozostaje nadal niewyjaśniony.

Badania Edwardsa i wsp. [23] porównujące odpowiedź zależną od EDHF w tętnicy szyjnej wewnętrznej świnki morskiej i szczurzej tętnicy krezkowej, wykazały, że o ile w naczyniach szczura połączenia „gap junction” odgrywają główną rolę komunikacyjną, a jony K^+ spełniają funkcję EDHF, to w naczyniach świnki morskiej połączenia szczylinowe są dominującym mechanizmem hiperpolaryzacji zależnej od śródbłonka. Istnieją, zatem dwie główne hipotezy dotyczące EDHF i „gap junction”. Jedna mówi o przekazaniu elektrycznych ładunków przez „gap junction”, druga natomiast o transporcie czynników chemicznych z komórek śródbłonka do miocytów [4,7,42].

W pewnych stanach fizjologicznych (np. ciąża) oraz patologicznych (nadciśnienie) zwiększa się ekspresja koneksyn, a więc i liczba połączeń mio-endotelialnych. Prawdopodobnie jest to mechanizm kompensujący zmniejszone działanie NO [26] (ryc. 1).

INNE TEORIE

W 1994 r. powstała hipoteza, iż to endogenne kannabinoide pełni funkcję śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego [70,71]. Antagonista receptora kannabinoidego CB_1 SR 141716 (rimonabant) osłabiał stymulowany podaniem karbacholu i jonoforu wapniowego („egzogenny EDHF”) rozkurcz izolowanej tętnicy krezkowej czy wieńcowej szczura w obecności inhibitorów syntazy tlenu azotu i cytochromu P-450 klotrimazolu. Antagonista ten hamował także rozkurczowe działanie anandamidu czy też wysokich stężeń potasu. Wyniki badań dwóch grup naukowych Chataigneau [10] i Zygmunta [91] wykazały niezależnie różnice w rodzaju kanałów zaangażowanych w hiperpolaryzację mięśni gładkich naczyń krezkowych szczura wywołaną podaniem anandamidu i EDHF. Co więcej, pojawiły się prace donoszące, iż to nie anandamid *per se*, a jego metabolity są odpowiedzialne za rozkurcz naczyń krwionośnych [68].

Rola śródbłonkowego **peptydu natriuretycznego C (CNP)** jako potencjalnego EDHF ograniczona jest do szczurzego łożyska krezkowego i wieńcowego, w których pod wpływem stymulacji acetylocholiną, uwolniony ze śródbłonka CNP prowadził do hiperpolaryzacji i rozkurczu naczyń za pośrednictwem niezależnego od cGMP pobudzenia kanałów K_{IR} i Na^+/K^+ ATP-azy [11,46]. Mechanizm działania hiperpolaryzacyjnego nowego pretendenta do miana EDHF angażował jednak pobudzenie kanału BK_{Ca} , a nie SK_{Ca} i IK_{Ca} , a dodatkowo jego działanie było całkowicie hamowane przez podanie kwasu 18 α -glicyryzynowego, który powodował jedynie nieznaczne osłabienie rozkurczu zależnego od EDHF [45]. CNP może pełnić zatem dodatkową rolę zabezpieczającą naczynia przed nadmiernym skurczem w przypadku zmniejszonego działania klasycznych czynników śródbłonkowych, tj. PGI_2 i NO. Może też modulować działanie „gap junction”, jednak z pewnością nie jest on uniwersalnym śródbłonkowym czynnikiem hiperpolaryzującym [1,73].

Inną cząsteczką powodującą hiperpolaryzację i rozkurcz komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, przez wpływ na duże kanały potasowe (BK_{Ca}), jest **tlenuk węgla (CO)** [5]. Powstaje on w śródbłonku i miocytach w wyniku rozkładu hemu pod wpływem oksygenaz hemowych (głównie HO-2). Jednakże w tętnicach wieńcowych wołu, gdzie EDHF odgrywa znaczącą rolę stwierdzono jedynie nieznaczną, w porównaniu z innymi naczyniami ekspresję HO-2 [90]. Ponadto, okazało się, że CO pobudza cyklazę guanylową. Powyższe fakty podważają rolę CO jako EDHF [80].

AKTYWNOŚĆ EDHF W FIZJOLOGII

Zależność aktywności czynnika EDHF od wieku badano m.in. w doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanej tętnicy krezkowej szczurów 3-, 6-, 12- i 24- miesięcznych. Stwierdzono, że kurczone noradrenaliną naczynia szczurów starszych ulegały w mniejszym stopniu rozkurczowi pod wpływem Ach w obecności indometacyny i L-NAME (wykluczających potencjalny udział PGI_2 i NO w rozkurczu) w porównaniu z młodszymi zwierzętami [40,41]. Podobne wyniki uzyskano porównując odpowiedź w badaniach tętnicy nerkowej szczurów 3- i 18-miesięcznych na podanie Ach i bradykininy [8,52,53]. Sugerowaną przyczyną słabszego działania hiperpolaryzacyjnego zależnego od EDHF jest zmniejszająca się z wiekiem aktywność oraz liczba połączeń typu „gap junction” [49].

Stwierdzono, że wielkość odpowiedzi hiperpolaryzacyjnej i udział w niej – EDHF (% rozkurczu naczyń w warunkach blokady NO i PGI_2) zależy również od płci. Żeńskie hormony płciowe, szczególnie estrogeny, zwiększają udział EDHF w relaksacji niektórych naczyń krwionośnych i potęgują jego działanie [54,85]. Zaobserwowano bowiem, że rozkurcz naczyń obwodowych, zachodzący za pośrednictwem EDHF, jest większy u kobiet niż u mężczyzn. Mechanizm wiążący estrogeny z EDHF polega prawdopodobnie na zwiększeniu liczby połączeń „gap junction”. Opisany jest także korzystny wpływ estrogenów na ekspresję kanałów potasowych zależnych od stężenia jonów wapnia – K_{Ca} [14,26,59]. Zaobserwowano również zwiększone uwalnianie czynników hiperpolaryzujących ze śródbłonka, w tym EDHF, podczas ciąży [26,59,66].

EDHF W WYBRANYCH STANACH PATOLOGICZNYCH DOTYCZĄCYCH SCHORZEŃ SERCOWO-NACZYNIOWYCH

W ostatnich latach wykazano, iż nie tylko upośledzone wytwarzanie tlenu azotu czy prostacyliny, ale też innych śródbłonkowych czynników wazodylatacyjnych, w tym EDHF, odgrywa ważną rolę w patogenezie zmian naczyniowych [83]. EDHF współdziałając z NO stanowi pewien margines bezpieczeństwa w sytuacjach patologicznych, zastępując NO, jeśli jego synteza i działanie jest upośledzone na skutek nadmiernej generacji aktywnych form tlenu, np. w miażdżycy, chorobie niedokrwiennej serca, po zawale [7] (ryc. 1).

Zaobserwowano, że obniżona prężność tlenu (**hipoksja**) w naczyniach krwionośnych, szczególnie w krążeniu mózgowym i wieńcowym zmniejsza syntezę i uwalnianie NO, co prowadzi do osłabienia odpowiedzi relaksacyjnej. To upośledzone działanie może być kompensowane przez zwiększoną aktywność EDHF, który stanowi swoisty margines bezpieczeństwa w stanach patologicznych [26,43].

Taki mechanizm kompensujący zauważono u szczurów rasy Dahl, będących na diecie bogatosodowej, u których z powodu upośledzonej zależnej od NO komponenty rozkurczowej naczyń rozwinęło się **nadciśnienie** [28]. W innym genetycznym modelu nadciśnienia – podwójnej delecji genu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu i genu cyklooksygenazy 1, zaobserwowano zależnie od płci zmiany tonu naczyniowego. Podczas gdy samice były normotensyjne, samce myszy wykazywały wysokie ciśnienie krwi [74]. Zachowanie prawidłowego przepływu krwi i oporu naczyniowego u samicy nie było upośledzone w wyniku zależnej od EDHF (wg autorów aktywacja K_{IR} i pompy sodowo-potasowej) kompensacji upośledzonej zdolności wazorelaksacyjnej (nieobecność śródbłonkowych związków relaksacyjnych – NO i PGL_2) (ryc. 1). U samców natomiast wskutek poważnego uszkodzenia śródbłonka nie obserwowano kompensacyjnego działania EDHF. Podobne wyniki uzyskano u pacjentów z nadciśnieniem, u których odpowiedź zależna od EDHF po podaniu bradykininy działała jako mechanizm kompensujący wobec osłabienia aktywności NO [77]. Również w przebiegu **miażdżycy** naczyń (tętnica nerkowa królika [6]) zauważono wzrost aktywności EDHF i znacznie słabsze działanie NO.

Inne badania wskazują, iż to upośledzone wytwarzanie EDHF, a nie NO może prowadzić do słabszej zależnej od śródbłonka relaksacji naczyń krwionośnych w warunkach nadciśnienia. W tętnicy krezkowej szczurów SHR, tj. z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem, obserwowano osłabienie odpowiedzi zależnej od EDHF (odpornej na zablokowanie syntazy tlenu azotu i prostacykliny) [35] z zachowaniem odpowiedzi z udziałem NO [41]. Jedną z teorii wyjaśniających upośledzone działanie EDHF u szczurów SHR może być wzrost grubości warstwy mięśniowej i/lub supresja kanałów wewnątrzprzewodniczących K_{IR} w nadciśnieniu [28,60].

Obecnie zwraca się coraz większą uwagę na upośledzoną rolę EDHF w przebiegu **cukrzycy**, gdzie dochodzi do zaburzeń funkcji śródbłonka, zwłaszcza w naczyniach mikrokrążenia i do powstania powikłań naczyniowych, takich jak mikroangiopatie, nefropatie, czy nawet neuropatie [17,26,83]. W cukrzycy typu 1 i 2, zarówno u ludzi [2], jak też u zwierząt doświadczalnych [36,55] zależna od EDHF relaksacja naczyń, głównie mikrokrążenia, jest upośledzona [26]. Taki mechanizm wykazano w wielu

różnych łożyskach naczyniowych: naczyniach oporowych pręcia człowieka [2] oraz szczurzych tętnicach: krezkowej, szyjnej i tętniczkach nerkowych [30]. Ponadto hiper-glikemia zaburza czynność kanałów potasowych, zarówno tych umiejscowionych w śródbłonku, jak i obecnych w miocytach [14,17,86].

W modelu doświadczalnie wywołanej cukrzycy u szczurów, którym podawano streptozotocynę, wykazano, osłabione działanie EDHF, wynikające z zaburzeń komunikacji mio-endoelitalnej przy braku zmian w uwalnianiu NO [63]. Podobnie w cukrzycy typu 2 odpowiedź z udziałem EDHF jest zahamowana, co jest konsekwencją zaburzenia funkcjonowania, dystrybucji i wrażliwości kanałów potasowych (K_v , K_{IR} , K_{ATP}), [50,55], natomiast nie zauważono zmian w relaksacji naczyń przez NO [26], a nawet zaobserwowano jej nasilenie [55,63,76]. Odmienne wyniki badań uzyskano natomiast u myszy z genetycznie wrodzoną cukrzycą typu 2 (myszy db^{-}/db^{-}) [64], u których stwierdzono upośledzoną aktywność wazodylatacyjną zależną od tlenu azotu i kompensacyjne zależne od EDHF nasilenie rozkurczu naczyń krezkowych myszy.

PODSUMOWANIE

EDHF wzbudza coraz większe zainteresowanie. Jednak doświadczenia prowadzone na różnych naczyniach krwionośnych, pochodzących od różnych gatunków nie dostarczyły jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czym jest EDHF? Nadal bowiem żadnego z domniemyanych czynników hiperpolaryzujących: jonów K^+ , kwasów epoksy-eikozatrienowych, nadtlenku wodoru czy połączeń „gap junction” nie można określić jako „uniwersalnego” EDHF. Wykazano, że czynniki te uczestniczą w odpowiedzi związanej z EDHF, modulują przenoszącą się ze śródbłonka na miocyty hiperpolaryzację, ale nie wiadomo, który z tych czynników działa jako EDHF *per se* [84].

Odpowiedź hiperpolaryzująca zależna od EDHF ulega pewnym zmianom w stanach patologicznych. Wielu badaczy widzi w tym czynniku punkt uchwytu nowoczesnych leków stosowanych w schorzeniach układu krążenia i cukrzycy. Zwiększenie ekspresji kanałów potasowych oraz ich pobudzenie, a także zwiększenie ekspresji połączeń szczelinowych „gap junction” wydają się najpoważniejszymi celami terapeutycznymi [26].

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahluwalia A., Hobbs A.J.: Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2005; 26: 162–167
- [2] Angulo J., Cuevas P., Fernández A., Gabancho S., Allono A., Martin-Morales A., Moncada I., Videla S., Sáenz de Tejada I.: Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO or EDHF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 312: 1202–1208
- [3] Archer S.L., Gragasin F.S., Wu X., Wang S., McMurtry S., Kim D.H., Platonov M., Koshal A., Hashimoto K., Campbell W.B., Falck J.R., Michelakis E.D.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK_{Ca} channels. *Circulation*, 2003; 107: 769–776
- [4] Bény J.L., Chabaud F.: Kinins and endothelium-dependent hyperpolarization in porcine coronary arteries. W: *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*. Red.: Vanhoutte P.M. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1996: 41–49
- [5] Bolognesi M., Sacerdoti D., Piva A., Di Pascoli M., Zampieri F., Quarta S., Motterlini R., Angeli P., Merkel C., Gatta A.: Carbon monoxide-mediated activation of large-conductance calcium-activated potassium channels contributes to mesenteric vasodilatation in cirrhotic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2007; 321: 187–194
- [6] Brandes R.P., Behra A., Leberer C., Böger R.H., Bode-Böger S.M., Phivthong-Ngam L., Mugge A.: N^G -nitro-L-arginine- and indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the rabbit renal artery: effect of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 1997; 135: 49–55
- [7] Busse R., Edwards G., Félétou M., Fleming I., Vanhoutte P.M., Weston A.H.: EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2002; 23: 374–380

- [8] Bussemaker E., Popp R., Binder J., Busse R., Fleming I.: Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery. *Kidney Int.*, 2003; 63: 1749–1755
- [9] Campbell W.B., Gebremedhin D., Pratt P.F., Harder D.R.: Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.*, 1996; 78: 415–423
- [10] Chataigneau T., Félétou M., Duhault J., Vanhoutte P.M.: Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, 1998; 123: 574–580
- [11] Chauhan S.D., Nilsson H., Ahluwalia A., Hobbs A.J.: Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 1426–1431
- [12] Chen G., Suzuki H.: Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.*, 1989; 410: 91–106
- [13] Chrissobolis S., Ziovas J., Chu Y., Faraci F.M., Sobey C.G.: Role of inwardly rectifying K⁺ channels in K⁺-induced cerebral vasodilatation *in vivo*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000; 279: H2704–H2712
- [14] Coleman H.A., Tare M., Parkington H.C.: Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004; 31: 641–649
- [15] Coleman H.A., Tare M., Parkington H.C.: K⁺ currents underlying the action of endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig, rat and human blood vessels. *J. Physiol.*, 2001; 531: 359–373
- [16] Corriu C., Félétou M., Canet E., Vanhoutte P.M.: Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, 1996; 119: 959–964
- [17] De Vriese A.S., Verbeuren T.J., Van de Voorde J., Lameire N.H., Vanhoutte P.M.: Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 130: 963–974
- [18] Ding H., Kubes P., Triggle C.: Potassium- and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 129: 1194–1200
- [19] Ding H., Triggle C.R.: Novel endothelium-derived relaxing factors. Identification of factors and cellular targets. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2000; 44: 441–452
- [20] Dong H., Jiang Y., Cole W.C., Triggle C.R.: Comparison of the pharmacological properties of EDHF-mediated vasorelaxation in guinea-pig cerebral and mesenteric resistance vessels. *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 1983–1991
- [21] Doughty J.M., Plane F., Langton P.D.: Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: H1107–H1112
- [22] Edwards G., Dora K.A., Gardener M.J., Garland C.J., Weston A.H.: K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 1998; 396: 269–272
- [23] Edwards G., Félétou M., Gardener M.J., Thollon C., Vanhoutte P.M., Weston A.H.: Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 1999; 128: 1788–1794
- [24] Edwards G., Weston A.H.: Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations. *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 535–541
- [25] Emerson G.G., Segal S.S.: Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ. Res.*, 2000; 87: 474–479
- [26] Félétou M., Vanhoutte P.M.: EDHF: new therapeutic target? *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 565–580
- [27] Félétou M., Vanhoutte P.M.: Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 1988; 93: 515–524
- [28] Félétou M., Vanhoutte P.M.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 1215–1225
- [29] Fisslthaler B., Popp R., Kiss L., Potente M., Harder D.R., Fleming I., Busse R.: Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, 1999; 401: 493–497
- [30] Fitzgerald S.M., Kemp-Harper B.K., Tare M., Parkington H.C.: Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2005; 32: 482–487
- [31] Fleming I.: Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2000; 10: 166–170
- [32] Fleming I.: Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 525–533
- [33] Fleming I., Michaelis U.R., Bredenkotter D., Fisslthaler B., Dehghani F., Brandes R.P., Busse R.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ. Res.*, 2001; 88: 44–51
- [34] Freitas M.R., Schott C., Corriu C., Sassard J., Stoclet J.C., Andriantsitohaina R.: Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 2003; 21: 1505–1512
- [35] Fujii K., Tominaga M., Ohmori S., Kobayashi K., Koga T., Takata Y., Fujishima M.: Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, 1992; 70: 660–669
- [36] Fukao M., Hattori Y., Kanno M., Sakuma I., Kitabatake A.: Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 1997; 121: 1383–1391
- [37] Fukao M., Hattori Y., Kanno M., Sakuma I., Kitabatake A.: Sources of Ca²⁺ in relation to generation of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, 1997; 120: 1328–1334
- [38] Fukao M., Hattori Y., Kanno M., Sakuma I., Kitabatake A.: Thapsigargin- and cyclopiazonic acid-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, 1995; 115: 987–992
- [39] Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373–376
- [40] Goto K., Fujii K., Kansui Y., Iida M.: Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004; 31: 650–655
- [41] Goto K., Rummery N.M., Grayson T.H., Hill C.E.: Attenuation of conducted vasodilatation in rat mesenteric arteries during hypertension: role of inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol.*, 2004; 561: 215–231
- [42] Griffith T.M.: Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br. J. Pharmacol.*, 2004; 141: 881–903
- [43] Griffith T.M., Chaytor A.T., Edwards D.H.: The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 551–564
- [44] Hilgers R.H., Todd J.Jr., Webb R.C.: Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006; 291: H216–H222
- [45] Hill C.E., Hickey H., Sandow S.L.: Role of gap junctions in acetylcholine-induced vasodilation of proximal and distal arteries of the rat mesentery. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 2000; 81: 122–127
- [46] Hobbs A., Foster P., Prescott C., Scotland R., Ahluwalia A.: Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. *Circulation*, 2004; 110: 1231–1235
- [47] Illiano S., Nagao T., Vanhoutte P.M.: Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, 1992; 107: 387–392
- [48] Kamei M., Yoneda Y., Suzuki H.: Endothelial factors involved in the bradykinin-induced relaxation of the guinea-pig aorta. *J. Smooth Muscle Res.*, 2000; 36: 127–135
- [49] Kansui Y., Fujii K., Nakamura K., Goto K., Oniki H., Abe I., Shibata Y., Iida M.: Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004; 287: H216–H224
- [50] Katakam P.V., Ujhelyi M.R., Miller A.W.: EDHF-mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1999; 34: 461–467
- [51] Katusic Z.S.: Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996; 20: 443–448
- [52] Long D.A., Mu W., Price K.L., Johnson R.J.: Blood vessels and the aging kidney. *Nephron Exp. Nephrol.*, 2005; 101: e95–e99

- [53] Long D.A., Newaz M.A., Prabhakar S.S., Price K.L., Truong L.D., Feng L., Mu W., Oyekun A.O., Johnson R.J.: Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging. *Kidney Int.*, 2005; 68: 2154–2163
- [54] Luksha L., Kublickiene K.: Implications for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in women's cardiovascular health. *Curr. Women's Health Rev.*, 2005; 1: 67–78
- [55] Makino A., Ohuchi K., Kamata K.: Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.*, 2000; 130: 549–556
- [56] Matoba T., Shimokawa H., Kubota H., Morikawa K., Fujiki T., Kunihiro I., Mukai Y., Hirakawa Y., Takeshita A.: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 290: 909–913
- [57] Matoba T., Shimokawa H., Nakashima M., Hirakawa Y., Mukai Y., Hirano K., Kanaide H., Takeshita A.: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 1521–1530
- [58] McGuire J.J., Ding H., Triggle C.R.: Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2001; 79: 443–470
- [59] Mendelsohn M.E.: Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am. J. Cardiol.*, 2002; 90: 3F–6F
- [60] Mori Y., Ohyanagi M., Koida S., Ueda A., Ishiko K., Iwasaki T.: Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, 2006; 29: 187–195
- [61] Nagao T., Illiano S., Vanhoutte P.M.: Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am. J. Physiol.*, 1992; 263: H1090–H1094
- [62] Nilius B., Droogmans G.: Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.*, 2001; 81: 1415–1459
- [63] Pannirselvam M., Anderson T.J., Triggle C.R.: Endothelial cell dysfunction in type I and II diabetes: The cellular basis for dysfunction. *Drug Dev. Res.*, 2003; 58: 28–41
- [64] Pannirselvam M., Verma S., Anderson T.J., Triggle C.R.: Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db^{+/+}) mice: role of decreased tetrahydropterin bioavailability. *Br. J. Pharmacol.*, 2002; 136: 255–263
- [65] Parkington H.C., Chow J.A., Evans R.G., Coleman H.A., Tare M.: Role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations *in vivo*. *J. Physiol.*, 2002; 542: 929–937
- [66] Pascoal I.F., Umans J.G.: Effect of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels. *Hypertension*, 1996; 28: 183–187
- [67] Pinto A., Abraham N.G., Mullane K.M.: Arachidonic acid-induced endothelial-dependent relaxations of canine coronary arteries: contribution of a cytochrome P-450 dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1987; 240: 856–863
- [68] Pratt P.F., Hillard C.J., Edgemond W.S., Campbell W.B.: N-arachidonyl ethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1998; 274: H375–H381
- [69] Pratt P.F., Li P., Hillard C.J., Kurian J., Campbell W.B.: Endothelium-independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 280: H1113–H1121
- [70] Randall M.D., Alexander S.P., Bennett T., Boyd E.A., Fry J.R., Gardiner S.M., Kemp P.A., McCulloch A.I., Kendall D.A.: An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 229: 114–120
- [71] Randall M.D., Kendall D.A.: Involvement of a cannabinoid in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated coronary vasorelaxation. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997; 335: 205–209
- [72] Roks A.J.: Improvement of endothelium-derived hyperpolarizing factor function by renin-angiotensin system inhibition: paving the way towards prevention of age-related endothelial dysfunction. *J. Hypertens.*, 2002; 20: 363–365
- [73] Sandow S.L., Tare M.: C-type natriuretic peptide: a new endothelium-derived hyperpolarizing factor? *Trends Pharmacol. Sci.*, 2007; 28: 61–67
- [74] Scotland R.S., Madhani M., Chauhan S., Moncada S., Andresen J., Nilsson H., Hobbs A.J., Ahluwalia A.: Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure *in vivo*. *Circulation*, 2005; 111: 796–803
- [75] Shimokawa H., Matoba T.: Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 543–549
- [76] Sobey C.G.: Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001; 21: 28–38
- [77] Taddei S., Versari D., Cipriano A., Ghiadoni L., Galetta F., Franzoni F., Magagna A., Virdis A., Salvetti A.: Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2006; 48: 508–515
- [78] Tomioka H., Hattori Y., Fukao M., Sato A., Liu M., Sakuma I., Kitabatake A., Kanno M.: Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J. Vasc. Res.*, 1999; 36: 311–320
- [79] Tomioka H., Hattori Y., Fukao M., Watanabe H., Akaishi Y., Sato A., Kim T.Q., Sakuma I., Kitabatake A., Kanno M.: Role of endothelial Ni²⁺-sensitive Ca²⁺ entry pathway in regulation of EDHF in porcine coronary artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 280: H730–H737
- [80] Triggle C.R., Ding H., Anderson T.J., Pannirselvam M.: The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004; 263: 21–27
- [81] Triggle C.R., Dong H., Waldron G.J., Cole W.C.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): species and tissue heterogeneity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1999; 26: 176–179
- [82] Urakami-Harasawa L., Shimokawa H., Nakashima M., Egashira K., Takeshita A.: Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J. Clin. Invest.*, 1997; 100: 2793–2799
- [83] Vanhoutte P.M.: Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol. Res.*, 2004; 49: 503–508
- [84] Vanhoutte P.M., Félétou M.: Conclusion: existence of multiple EDHF(s)? W: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Red. Vanhoutte P.M.: Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1996: 303–307*
- [85] Villar I.C., Francis S., Webb A., Hobbs A.J., Ahluwalia A.: Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.*, 2006; 70: 840–853
- [86] Wigg S.J., Tare M., Tonta M.A., O'Brien R.C., Meredith I.T., Parkington H.C.: Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 281: 232–240
- [87] Woodman O.L.: Pharmacological approaches to preserving and restoring coronary endothelial function. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2001; 2: 1765–1775
- [88] Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H.: Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J. Physiol.*, 1999; 514: 505–513
- [89] Yamanaka A., Ishikawa T., Goto K.: Characterization of endothelium-dependent relaxation independent of NO and prostaglandins in guinea-pig coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998; 285: 480–489
- [90] Zakhary R., Gaine S.P., Dinerman J.L., Ruat M., Flavahan N.A., Snyder S.H.: Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 795–798
- [91] Zygmunt P.M., Sorgard M., Petersson J., Johansson R., Högestätt E.D.: Differential actions of anandamide, potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig basilar artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2000; 361: 535–542