

# Tlenek azotu jako przyczyna i potencjalne miejsce ingerencji terapeutycznej w hiporeaktywności naczyń we wczesnym okresie posocznicy

Elżbieta Grzešek<sup>1</sup>, Grzegorz Grzešek<sup>2,3</sup>, Marek Koziński<sup>3</sup>,  
 Wioleta Stolarek<sup>3</sup>, Mariusz Zieliński<sup>2</sup>, Jacek Kubica<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Collegium Medicum w Bydgoszczy,  
 Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum w Bydgoszczy,  
 Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum w Bydgoszczy,  
 Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

## Streszczenie

*Kliniczny zespół rozwijający się w konsekwencji uogólnionej reakcji zapalnej w następstwie zakażenia określa się mianem posocznicy. W ciężkiej postaci posocznicy dochodzi do niewydolności wielonarządowej.*

*Podstawowy mechanizm redukcji odpowiedzi mięśniówki gładkiej naczyń przez lipopolisacharydy wiąże się z aktywacją odpowiedzi zapalnej z uwalnianiem cytokin i chemokin o działaniu prozapalnym, jak interleukina (IL) 1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$ . Kolejnym etapem jest uwalnianie następnych mediatorów reakcji zapalnej, takich jak prostaglandyny, leukotrieny, białka ostrej fazy czy aktywacja indukowalnej syntazy tlenku azotu, a także wolnych rodników tlenowych. Nasilenie produkcji tlenku azotu jest w początkowym okresie posocznicy podstawowym mechanizmem powstawania hiporeaktywności naczyń i wtórnie objawów wstrząsu. W związku z tym pojawia się pytanie, czy efekt działania tlenku azotu jest istotny klinicznie, a wobec tego, czy hamowanie syntezy tlenku azotu we wczesnym okresie posocznicy może poprawiać rokowanie. Wyniki prowadzonych badań wykazały jednak, że produkcja tlenku azotu, zwłaszcza w pierwszym okresie posocznicy, wydaje się zjawiskiem istotnym nie tylko ze względu na skutki hemodynamiczne, ale również z powodu aktywacji procesu zapalnego. Zważywszy na wieloczynnikową etiologię posocznicy i wtórnej hiporeaktywności mięśniówki gładkiej, terapia związana z hamowaniem syntezy tlenku azotu nie ma zastosowania klinicznego, tym bardziej że zwykle leczenie rozpoczyna się znacznie później niż interwencję terapeutyczną w doświadczalnych modelach wstrząsu septycznego. (Folia Cardiologica Excerpta 2011; 6, 1: 36–43)*

**Słowa kluczowe: tlenek azotu, posocznica, cytokiny, lipopolisacharydy**

## Wstęp

Lipopolisacharydy bakteryjne należą do najsilniejszych pirogenów egzogennych, a więc substancji wyzwalających gorączkę. Lipopolisacharydy nie penetrują przez nieuszkodzoną barierę krew–mózg, dlatego do ich pełnego działania niezbędne jest uwalnianie wielu związków endogennych określanych mianem pirogenów endogennych. Kliniczny zespół rozwijający się w konsekwencji uogólnionej reakcji zapalnej w następstwie zakażenia określa się mianem posocznicy. W ciężkiej postaci posocznicy dochodzi do niewydolności wielonarządowej. Odpowiedź organizmu na zakażenie zależy nie tylko od obecności we krwi drobnoustrojów, lecz rozwija się także w wyniku oddziaływania elementów ścian komórkowych bakterii, takich jak lipopolisacharydy, kwas lipotejchojowy, peptydoglikany, lipoproteidy bakteryjne, a także uwalniane przez drobnoustroje egzotoksyny.

Podstawowy mechanizm redukcji odpowiedzi mięśniówki gładkiej naczyń przez lipopolisacharydy wiąże się z aktywacją odpowiedzi zapalnej z uwalnianiem cytokin i chemokin o działaniu prozapalnym, jak interleukina (IL) 1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* ). Kolejnym etapem jest uwalnianie następnym mediatorów reakcji zapalnej, takich jak prostaglandyny, leukotrieny, białka ostrej fazy czy aktywacja indukowalnej syntazy tlenu azotu (NOS-2, *nitric oxide synthase-2*), a także wolnych rodników tlenowych. Jednocześnie aktywowane są szlaki metaboliczne o działaniu przeciwzapalnym obejmujące uwalnianie na przykład IL-4, IL-10 i IL-13. Proces zapalny nie jest jednak, jak uprzednio przypuszczano, dominującym procesem rozwijającym się w odpowiedzi na infekcję [1–3]. Inicjuje on wiele procesów związanych z rozwojem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, zaburzeniem endogennej fibrynolizy, w wyniku czego równowaga niezbędna do zachowania hemostazy przesuwa się w stronę procesów wykrzepiania, czego dalszym następstwem jest zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) prowadzący do niewydolności wielonarządowej w wyniku wykrzepiania w obrębie mikrokrążenia [4–9].

Klasyczne podziały kliniczne wstrząsu septycznego wyodrębniły dwa okresy. W pierwszym, określanym mianem wstrząsu gorącego, miał występować zwiększony rzut serca i jednocześnie zmniejszony opór obwodowy. W drugim okresie, określanym jako wstrząs zimny, miał wzrastać opór obwodowy, czemu miała towarzyszyć zmniejszenie

rzutu serca. Badania hemodynamiczne wykazały jednak, że zarówno zmniejszony opór naczyniowy, jak i podwyższona pojemność minutowa serca są obecne we wczesnym i w późnym okresie wstrząsu septycznego. Warunkiem utrzymania prawidłowej perfuzji tkankowej jest natomiast właściwe wypełnienie łożyska naczyniowego. Hipotensja obserwowana w posocznicy jest więc wypadkową zmniejszenia kurczliwości serca i hipowolemii. Hipowolemia częściowo jest zjawiskiem względnym, będącym następstwem zmniejszenia napięcia mięśniówki gładkiej tętnic i przez to powiększenia pojemności łożyska naczyniowego, a częściowo wynika ze zwiększenia przepuszczalności naczyń prowadzącej do bezwzględnej hipowolemii [10–12].

Obowiązujące aktualnie zasady postępowania terapeutycznego w leczeniu posocznicy można podzielić na przyczynowe i objawowe, przy czym obie wdraża się i prowadzi równocześnie.

## Leczenie przyczynowe

Leczenie przyczynowe obejmuje szybkie usunięcie ogniska zakażenia, rozpoczęcie terapii przeciwdrobnoustrojowej, poprzedzone pobraniem materiałów do badania mikrobiologicznego, a także leczenie przeciwzapalne. Leczenie początkowo wdraża się empirycznie na podstawie danych klinicznych uwzględniających najbardziej prawdopodobne czynniki etiologiczne oraz zdolność do penetracji środków leczniczych do źródła zakażenia. Po otrzymaniu wyników badania mikrobiologicznego może być konieczna modyfikacja leczenia zgodnie z uzyskanym profilem wrażliwości drobnoustroju na leki. Taki schemat leczenia sprawia, że o jego powodzeniu decyduje nie tylko szybkie rozpoczęcie diagnostyki i leczenia, lecz także właściwy dobór empirycznej terapii [12–16].

Hamowanie reakcji zapalnej jest istotnym elementem leczenia przyczynowego [17]. Efektem wtórnym jest normalizacja zaburzonej równowagi między procesami wykrzepiania i fibrynolizy wewnątrznaczyniowej [18, 19]. Terapię z wykorzystaniem środków o działaniu przeciwzapalnym zapoczątkowały badania dotyczące hamowania syntezy prostanoidów w posocznicy. Badania nad stosowaniem ibuprofenu w posocznicy wykazały, że redukowane są gorączka, deficyt tlenowy, wtórnie tachykardia, lecz takie leczenie nie wpływało na częstość występowania zespołów ostrej niewydolności oddechowej, a także na śmiertelność [20]. Po wyjaśnieniu mechanizmów aktywacji procesu zapalnego w posocznicy rozpoczęto próby leczenia z użyciem ludzkiego rekombinowanego, aktywowanego białka C

(rhAPC, *recombinant human activated protein C*) [6, 21–23]. Pierwsze badania kliniczne pozwoliły na sprecyzowanie kierunków działania rhAPC w posocznicy: hamowanie krzepnięcia krwi przez działanie proteolityczne na czynnik V i VIII, aktywacja śródbłonna naczyniowego i ograniczenie w ten sposób wytwarzania cytokin i trombiny oraz hamowanie apoptozy [24–28]. Ponadto wykazano, że leczenie z użyciem rhAPC znacząco zmniejsza śmiertelność [28, 29].

### Leczenie objawowe

Leczenie objawowe jest równie istotne dla rokowania jak leczenie przyczynowe. Podstawowe cele to między innymi utrzymanie właściwego ciśnienia tętniczego przez odpowiednie nawodnienie. Aby postępowanie było bezpieczne i jednocześnie efektywne, konieczne jest monitorowanie ośrodkowego ciśnienia żylnego. Hiporeaktywność mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych zwalczą się, podając obkurczające ją leki. Lekami pierwszego rzutu są noradrenalina i dopamina. Utrzymywanie się hipotensji mimo właściwego nawodnienia i stosowania amin katecholowych jest wskazaniem do podawania wazopresyny [12, 15, 16, 30, 31]. Poza leczeniem zaburzeń funkcji układu sercowo-naczyniowego mogą być niezbędne wentylacja mechaniczna w przypadku rozwoju niewydolności oddechowej, leczenie nerkozastępcze, leczenie zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej, kortykoterapia [30].

Jak wspomniano, referencyjną metodą postępowania w przypadku hipotonii po właściwym nawodnieniu jest stosowanie amin presyjnych. Niestety, takie działanie nie zawsze musi przynosić spodziewany efekt. Wielkość odpowiedzi tkanki na stymulację receptora jest proporcjonalna do stężenia agonisty. Z tego względu najprostszą metodą poprawy kurczliwości mięśniówki gładkiej jest stosowanie leku w zwiększających się dawkach. Niestety, po przekroczeniu dawek granicznych mogą się pojawić groźne działania niepożądane, jak na przykład zaburzenia rytmu [32–34]. Korzystny efekt obserwuje się po podaniu dwóch amin presyjnych: noradrenaliny i dopaminy [32, 33], a także po dołączeniu agonisty kolejnego receptora, którego pobudzenie wyzwala skurcz mięśniówki gładkiej — wazopresyny. Lek dodawano do stosowanej terapii początkowo w małych dawkach, a po potwierdzeniu bezpieczeństwa — w dużych dawkach docelowych [35, 36].

Stymulacja receptorowa okazuje się jednak mało skuteczna, gdy w wyniku rozwoju działania lipopolisacharydów na mięśniówkę tętnic dojdzie do upośledzenia funkcjonowania łańcucha zdarzeń po-

zareceptorowych lub nieprawidłowego działania mechanizmów powstawania skurczu w obrębie mięśniówki gładkiej. Kolejne badania były więc ukierunkowane nie na stymulację receptorową, lecz na rolę mediatorów uwalnianych w obecności lipopolisacharydów, prowadzących do zmniejszonej reaktywności naczyń na stymulację.

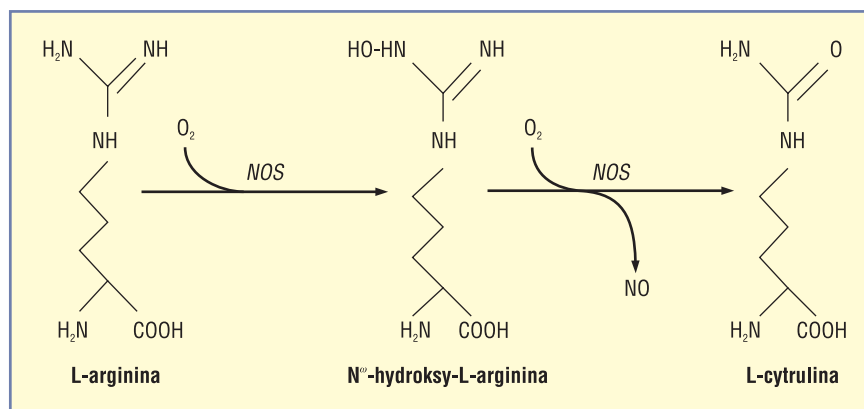
### Prostanoidy

Prostanoidy obok tlenu azotu należą do głównych uwalnianych przez śródbłonek związków prowadzących do rozkurczu mięśniówki gładkiej tętnic, a także do zmniejszenia reaktywności mięśniówki na stymulację. W badaniach Bernarda i wsp. [20] prowadzonych metodą podwójnie ślepej, randomizowanej próby, dotyczących roli indometacyny, będącej inhibitorem syntezy prostanoidów, w porównaniu z placebo w grupie 455 pacjentów z posoczną stwierdzono mniejszą częstość występowania takich jej objawów, jak gorączka i tachykardia, wtórnie mniejszy był również deficyt tlenu. W grupie 224 osób otrzymujących ibuprofen śmiertelność wynosiła 37% (w grupie kontrolnej liczącej 231 osób — 40%). W obydwu grupach obserwowano znamienne wzrost stężenia prostanoidów, który nie różnił się statystycznie w oznaczeniach wykonanych do 44. godziny choroby, później to stężenie było znacząco mniejsze w grupie leczonej ibuprofenem. Istotne różnice w badaniach biochemicznych nie wpłynęły znacząco na przebieg i rokowanie w badanej grupie. Nie wykazano też znamiennego oddziaływania leczenia indometacyną na hiporeaktywność naczyń. Średnie ciśnienie tętnicze w grupie osób otrzymujących ibuprofen wynosiło  $80 \pm 17$  mm Hg i nie różniło się znamienne od ciśnienia w grupie kontrolnej ( $79 \pm 16$  mm Hg). Wstrząs septyczny wystąpił u 146 osób leczonych indometacyną (42%) i u 147 osób (45%) w grupie kontrolnej. Bernard i wsp. [20] wykazali, że część objawów klinicznych, w których prostanoidy odgrywają rolę pirogeny endogenne, może być znacząco zredukowana przez hamowanie syntezy prostanoidów, jednak hiporeaktywność naczyń w przebiegu posocznicy wydaje się procesem bardziej złożonym, a prostanoidy nie są istotnym czynnikiem prowadzącym do zmniejszenia reaktywności mięśniówki gładkiej naczyń.

Drugim z mediatorów biorącym udział w powstawaniu hiporeaktywności mięśniówki gładkiej tętnic na stymulację jest tlenek azotu [37].

### Tlenek azotu

Tlenek azotu (NO) obecnie uważa się za jedną z najaktywniejszych substancji rozkurczających



**Rycina 1.** Ogólny schemat syntezy tlenku azotu (NO)

mięśniówkę gładką, wytwarzaną przez śródbłonek naczyniowy [38]. Początkowo, przed pełną identyfikacją chemiczną [39], określano go mianem EDRF (*endothelium derived relaxing factor*). Obecnie pojęcie EDRF obejmuje związki uwalniane przez śródbłonek, działające rozkurczająco na mięśniówkę gładką naczyń. Tlenek azotu zalicza się do tej grupy związków. Powstaje on w wielu różnych tkankach pod wpływem działania enzymu syntazy tlenku azotu (NOS, *nitric oxide synthase*) [40, 41] (ryc. 1).

Syntaza tlenku azotu jest enzymem katalizującym reakcję syntezy tlenku azotu na dwóch różnych etapach. Pierwszy z nich stanowi oksydacja L-argininy do N<sup>ω</sup>-hydroksy-L-argininy, następnie substrat pod wpływem NOS i tlenu ulega rozkładowi do L-cytruliny, czemu towarzyszy wydzielanie NO z komórek śródbłonka naczyń. Dotychczas wyodrębniono trzy podstawowe typy NOS, obecnie oznaczane jako NOS-1, NOS-2 i NOS-3. W stosowanej jeszcze niedawno nomenklaturze określano je odpowiednio: NOS-1 — nNOS (neuronalna NOS) lub NOS-I, NOS-2 — iNOS (indukowalna NOS) lub NOS-II oraz NOS-3 — eNOS (śródbłonkowa NOS) lub NOS-III. Syntaza typu 1 jest zlokalizowana przede wszystkim w obrębie centralnego i obwodowego układu nerwowego, mięśniach szkieletowych, wyspach trzustkowych, endometrium oraz płamce gęstej nefronu. Do podstawowych zadań fizjologicznych NOS-1 należą modulowanie przewodnictwa nerwowego i regulacja funkcji nefronu czy regulowanie perystaltyki jelit. Tlenek azotu produkowany przez NOS-1 może też pełnić funkcję neurotransmitera, szczególnie w układzie wegetatywnym określanym jako *non-adrenergic, non-cholinergic* (NANC). Syntaza typu 2 jest zlokalizowana głównie w makrofagach, komórkach mięśnia prądkowanego serca, wątrobie, mięśniówce gładkiej czy

śródbłonku naczyń, przy czym jest syntetyzowana jako element odpowiedzi na infekcję, proces zapalny czy posocznicę, pod wpływem prozapalnych cytokin (głównie IL-1, interferonu- $\gamma$  czy TNF- $\alpha$ ). Zaktywowany enzym jest czynny przez kilka godzin, syntetyzując znaczące ilości NO [42]. Tlenek azotu produkowany przez NOS-3 odgrywa rolę przede wszystkim jako regulator napięcia mięśniowego w lokalnym układzie śródbłonek naczyniowy-mięśniówka naczynia. Jest też czynnikiem hamującym adhezję i agregację płytek krwi oraz angiogenezę. Podkreśla się rolę NOS-3 jako elementu zapoczątkowującego aktywację NOS-2 pod wpływem lipopolisacharydów. W pracach doświadczalnych nad hiporeaktywnością naczyń, w których tętnice poddano działaniu lipopolisacharydów, sugerowano udział syntazy zlokalizowanej w śródbłonku naczyniowym jako pierwszego ogniwa w rozwoju hiporeaktywności naczyń w posocznicy [43]. W badaniach przeprowadzonych na izolowanych tkankach zwierzęcych poddanych krótkotrwałemu działaniu lipopolisacharydów (5 godzin) wykazano znamienne statystycznie hamowanie ekspresji NOS-2 w przypadku uprzedniej blokady aktywności NOS-3. Takie wyniki sugerują, że NO syntetyzowany przez NOS-3 może być mediatorem stanu zapalnego w posocznicy [44]. Wyniki potwierdzają rezultaty kolejnych doświadczeń, w których wykazano, że brak NOS-3 uniemożliwia pełną ekspresję NOS-2 w obecności lipopolisacharydów, co sugeruje, że w patogenezie posocznicy w pierwszej kolejności następuje aktywacja NOS-3, a następnie uwalniany tlenek azotu stanowi prozapalnie działający bodziec dla ekspresji NOS-2 [45].

Nasilenie produkcji NO jest w początkowym okresie posocznicy podstawowym mechanizmem powstawania hiporeaktywności naczyń i wtórnie



objawów wstrząsu [46, 47]. Mechanizmy prowadzące do hipotensji są jednak szersze i obejmują uwalnianie cytokin, a także generowanie wolnych tlenowych rodników pod wpływem lipopolisacharydów, IL-1, TNF- $\alpha$ . Aktywacji ulegają również NOS-2 i NOS-3 [48]. Muzaffar i wsp. [48] podkreślają również zależność występowania obserwowanej hipotensji od obecności śródbłonka naczyniowego. Autorzy różnicują syntezę tlenu azotu na uzależnioną od bezpośredniej obecności lipopolisacharydów (głównie drogą NOS-2) oraz uzależnioną wtórnie od ich obecności (głównie drogą NOS-3, aktywowaną bezpośrednio poprzez cytokiny). Powyższy obraz aktywacji NOS jest widoczny w pierwszych godzinach działania cytokin. W późniejszym okresie dominuje aktywacja NOS-2, natomiast aktywność NOS-3 jest wyraźnie mniejsza [49]. Tlenek azotu jest więc istotnym czynnikiem warunkującym hiporeaktywność. Jego źródłem są pod względem anatomicznym nie tylko śródbłonek i mięśniówka gładka tętnicy, lecz także błona zewnętrzna [50]. Wobec stałej stymulacji śródbłonka naczyniowego przez lipopolisacharydy dochodzi do zjawiska odwrotnego, uwalnianie NO związanego z syntazą śródbłonkową (NOS-3) ulega dalszemu hamowaniu [51, 52]. Wybiórcze ograniczanie syntezy tlenu azotu produkowanego przez NOS-3 jest charakterystyczne nie tylko dla posocznicy, lecz także dla różnych stanów, w których obserwuje się dysfunkcję śródbłonka naczyniowego, na przykład w przebiegu miażdżycy, cukrzycy czy przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [51, 53–55].

Mechanizm oddziaływania NO wiąże się z aktywacją cyklicznej guanylowej i wzmoczoną produkcją cGMP (cyklicznego guanozynomonofosforanu), który następnie ingeruje w skurcz mięśniówki gładkiej, modyfikując funkcję enzymów i kanałów jonowych. Modulowanie odpowiedzi mięśniówki gładkiej na stymulację przez NO przebiega z udziałem rozpuszczalnej w cytozolu cyklicznej guanylowej, określanej często mianem komórkowego receptora dla tlenu azotu. Powstający cGMP aktywuje kinazę białkową typu G, która fosforyluje białka odpowiedzialne za wyzwalanie skurczu oraz przewodzenie informacji w obrębie komórki [56].

Udowodniono zwiększenie produkcji NO pod wpływem lipopolisacharydów, szczególnie we wczesnym okresie posocznicy [57–60]. Pojawia się natomiast pytanie, czy tlenek azotu jest podstawowym mediatorem, a więc czy efekt działania będzie istotny. Ponadto można się zastanawiać nad rolą hamowania syntezy tlenu azotu w posocznicy. Zastosowanie inhibitora tlenu azotu w kontrolnej grupie zwierząt doświadczalnych prowadziło do wzro-

stu ciśnienia zarówno systemowego, jak i w krążeniu płucnym, natomiast u zwierząt z posoczną efektem ten jest słabiej wyrażony, lecz pozostaje statystycznie. Upośledzona odpowiedź śródbłonka naczyniowego na acetylocholinę w przedłużającej się ekspozycji na lipopolisacharydy potwierdza jego dysfunkcję w tych warunkach. Wobec tego można powiedzieć, że odpowiedź w postaci poprawy funkcji mięśniówki gładkiej po podaniu inhibitorów syntazy tlenu azotu będzie uzależniona od stopnia dysfunkcji śródbłonka naczyniowego [61, 62]. Wyniki badań wpływu inhibitora syntazy tlenu azotu L-NAME (*N* (*G*)-nitro-*L*-arginine methyl ester) na wzrost oporu naczyniowego w grupie owiec z posoczną wykazały, że podczas gdy w grupie kontrolnej opór naczyniowy statystycznie wzrastał po podaniu noradrenaliny, w grupie zwierząt z posoczną zastosowanie noradrenaliny nie wyzwało statystycznie zwiększenia tego oporu. W takich warunkach podanie L-NAME prowadziło do statystycznie poprawy kurczliwości mięśniówki gładkiej wyrażonej statystycznie wzrostem oporu naczyniowego w obecności L-NAME. W grupie kontrolnej zastosowanie noradrenaliny w obecności L-NAME nie powodowało statystycznie dalszego wzrostu oporu naczyniowego [63]. Przeprowadzono także badania z użyciem błękitu metylenowego będącego inhibitorem cyklicznej guanylowej, a więc hamującego szlak metaboliczny działania tlenu azotu. W badaniach obserwowano zwiększenie oporu naczyniowego i płucnego, przy czym wzrost oporu w krążeniu małym był statystycznie głównie w początkowym okresie wlewu. Nie stwierdzono jednocześnie istotnych objawów niepożądanych. W małych badaniach doświadczalnych i klinicznych potwierdzono skuteczność błękitu metylenowego. Brak więc przekonujących dowodów przemawiających za wpływem leku na śmiertelność [58, 64–66]. Fernandes i wsp. [67] podkreślili rolę hamowania szlaku aktywacji NOS w pierwszych 8 godzinach od zastosowania lipopolisacharydów. Oprócz skuteczności inhibicji NOS aminoguanidyną wskazuje się na możliwość odmiennej odpowiedzi na hamowanie syntazy w posocznicy wywołanej przez tlenowe i beztlenowe bakterie. W posocznicy wywołanej przez drobnoustroje beztlenowe odpowiedź na stosowanie aminoguanidyny była słabiej wyrażona, a śmiertelność w tej grupie była statystycznie większa niż w grupie zwierząt z posoczną wywołaną przez drobnoustroje tlenowe [68]. Badania doświadczalne potwierdziły udział NO w wyzwalanej lipopolisacharydami hiporeaktywności naczyń, a hamowanie NOS mogło wydawać się obiecującą metodą terapeutyczną [69]. Skuteczności zastosowania in-

hibitorów NOS potwierdzonej w badaniach doświadczalnych nie wykazano jednak w randomizowanych badaniach klinicznych [70–72]. U osób leczonych w pierwszych 3 dobach wstrząsu septycznego obserwowano poprawę parametrów hemodynamicznych podczas podawania 546C88 (L-NAME) [70]. Podobną poprawę i obniżenie stężenia NO stwierdzili Watson i wsp. [71], jednak badanie przerwano w związku ze znamienne większą śmiertelnością w grupie leczonej. Wzrost śmiertelności obserwowano także w badaniu prowadzonym przez Lopeza i wsp. [72]. Ponadto w badaniach zanotowano pogłębienie objawów wstrząsu po dożylnym podaniu preparatu w związku z gwałtownym zmniejszeniem pojemności minutowej serca. Produkcja tlenu azotu w posocznicy — szczególnie w pierwszym okresie — wydaje się istotna, a jej skutki hemodynamiczne można znacząco zredukować, podając inhibitory syntezy tlenu azotu. Jednak uwzględniając wieloczynnikową etiologię posocznicy i wtórnej hiporeaktywności mięśniówki gładkiej, mechanizm ten nie ma zastosowania w terapii wstrząsu septycznego, szczególnie że zwykle leczenie rozpoczyna się znacznie później niż w prowadzonych pracach doświadczalnych.

Nitroprusydek sodu jest często wykorzystywanym w farmakologii doświadczalnej i klinicznej donorem tlenu azotu. W odróżnieniu od nitrogliceryny nitroprusydek sodu nie wymaga przekształcenia na drodze enzymatycznej, lecz ulega spontanicznej degradacji z uwolnieniem tlenu azotu. 8Br-cGMP jest analogiem cGMP, nieulegającym łatwo hydroлизie i dobrze penetrującym do komórki. Jego działania są takie same jak działania cGMP. Efektem wpływu w obrębie mięśniówki gładkiej jest hiporeaktywność tej mięśniówki, w tym naczyń tętniczych [73, 74]. Skutek zmniejszenia wrażliwości naczyń na stymulację receptorową będzie obecny zarówno w obecności donora tlenu azotu, jak i substancji aktywujących syntezę tlenu azotu (lipopolisacharydy), a także wtórnego przekaźnika tlenu azotu (cGMP).

### Podsumowanie

Produkcja NO, zwłaszcza w pierwszym okresie posocznicy, wydaje się zjawiskiem istotnym nie tylko ze względu na skutki hemodynamiczne, ale również z powodu aktywacji procesu zapalnego. Zważywszy na wieloczynnikową etiologię posocznicy i wtórnej hiporeaktywności mięśniówki gładkiej, terapia związana z hamowaniem syntezy tlenu azotu nie ma zastosowania klinicznego, tym bardziej że zwykle leczenie rozpoczyna się znacznie

później niż interwencję terapeutyczną w doświadczalnych modelach wstrząsu septycznego.

### Piśmiennictwo

1. Lynn W.A., Cohen J. Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20: 143–158.
2. Carvalho A.C., Freeman N.J. How coagulation defects alter outcome in sepsis: survival may depend on reversing procoagulant conditions. *J. Crit. Illness* 1994; 9: 51–75.
3. Pajkrt D., van der Poll T., Levi M. i wsp. Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood* 1997; 89: 2701–2705.
4. Lorente J.A., Garcia-Frade L.J., Landin L. i wsp. Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest* 1993; 103: 1536–1542.
5. Kidokoro A., Iba T., Fukunaga M., Yagi Y. Alterations in coagulation and fibrinolysis during sepsis. *Shock* 1996; 5: 223–228.
6. Levi M., van der Poll T., ten Cate H., van Deventer S.J. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 1997; 27: 3–9.
7. Iba T., Kidokoro A., Yagi Y. The role of the endothelium in changes in procoagulant activity in sepsis. *J. Am. Coll. Surg.* 1998; 187: 321–329.
8. McGilvray I.D., Rotstein O.D. Role of coagulation system in the local and systemic inflammatory response. *World J. Sur.* 1998; 22: 179–186.
9. Levi M., ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N. Eng. J. Med.* 1999; 34: 586–592.
10. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B. i wsp. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Committee. *Chest* 1992; 101: 1644–1655.
11. Astiz M.E., Rackow E.C. Septic shock. *Lancet* 1998; 351: 1501–1505.
12. Martin G.S. Sepsis: the future is bright. *Crit. Care Med.* 2006; 34: 2484–2485.
13. Wheeler A.P., Bernard G.R. Treating patients with severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 207–214.
14. Balk R.A. Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. *Dis. Mon.* 2004; 50: 168–213.
15. Sharma V.K., Dellinger R.P. Treatment options for severe sepsis and septic shock. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2006; 4: 395–403.
16. Nguyen H.B., Rivers E.P., Abrahamian F.M. i wsp.; Emergency Department Sepsis Education Program and Strategies to Improve Survival (ED-SEPSIS) Working Group. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann. Emerg. Med.* 2006; 48: 28–54.
17. Zeni F., Freeman B., Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit. Care Med.* 1997; 25: 1095–1100.
18. Vervloet M.G., Thijs L.G., Hack C.E. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin. Thromb. Hemost.* 1998; 24: 33–44.
19. Rosenberg R.D., Aird W.C. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 1555–1564.

20. Bernard G.R., Wheeler A.P., Russell J.A. i wsp. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 912–918.
21. Levi M., ten Cate H., van der Poll T., van Deventer S.J. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 1993; 270: 975–979.
22. Esmon C.T. Inflammation and thrombosis: mutual regulation by protein C. *Immunologist* 1998; 6: 84–89.
23. Mammen E.F. The haematological manifestations of sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 41 (supl. A): 17–24.
24. Hesselvik J.F., Malm J., Dählback B., Blomback M. Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb. Haemost.* 1991; 65: 126–129.
25. Bajzar L., Nesheim M.E., Tracy P.B. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI dependent. *Blood* 1996; 88: 2093–2100.
26. Marlari R.A., Endros-Brooks J., Miller C. Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1985; 66: 59–63.
27. Patel G.P., Gurka D.P., Balk R.A. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. *Curr. Opin. Crit. Care* 2003; 9: 390–396.
28. Bernard G.R., Margolis B.D., Shanies H.M. i wsp. Extended Evaluation of Recombinant Human Activated Protein C United States Investigators: Extended evaluation of recombinant human activated protein C United States Trial (ENHANCE US): a single-arm, phase 3B, multicenter study of drotrecogin alfa (activated) in severe sepsis. *Chest* 2004; 125: 2206–2216.
29. Rice T.W., Wheeler A.P., Morris P.E. i wsp. Safety and efficacy of affinity-purified, anti-tumor necrosis factor- $\alpha$ , ovine fab for injection (CytoFab) in severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2006; 34: 2271–2281.
30. Dellinger R.P., Carlet J.M., Masur H. i wsp.; Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 2004; 32: 858–873.
31. Raghavan M., Marik P.E. Management of sepsis during the early „golden hours”. *J. Emerg. Med.* 2006; 31: 185–199.
32. Martin C., Viviani X., Arnaud S., Violet R., Rougnon T. Effects of norepinephrine plus dobutamine or norepinephrine alone on left ventricular performance of septic shock patients. *Crit. Care Med.* 1999; 27: 1708–1713.
33. Hall L.G., Oyen L.J., Taner C.B. i wsp. Fixed-dose vasopressin compared with titrated dopamine and norepinephrine as initial vasopressor therapy for septic shock. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 1002–1012.
34. Katsaragakis S., Kapralou A., Theodorou D. i wsp. Refractory septic shock: efficacy and safety of very high doses of norepinephrine. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2006; 28: 307–313.
35. Malay M.B., Ashton R.C. Jr., Landry D.W., Townsend R.N. Low-dose vasopressin in the treatment of vasodilatory septic shock. *J. Trauma* 1999; 47: 699–703.
36. Klinzing S., Simon M., Reinhart K., Bredle D.L., Meier-Hellmann A. High-dose vasopressin is not superior to norepinephrine in septic shock. *Crit. Care Med.* 2003; 31: 2646–2650.
37. Titheradge M.A. Nitric oxide in septic shock. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1411: 437–455.
38. 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.
39. Palmer R.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium — derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524–526.
40. Sessa W.C. The nitric oxide synthase family of proteins. *J. Vasc. Res.* 1994; 31: 131–143.
41. Dusting G.J. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J. Vasc. Res.* 1995; 32: 143–161.
42. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593–615.
43. Grzešk G., Szadujkis-Szadurski L. Pharmacometric analysis of  $\alpha_1$ -adrenoceptor function in pretreated with lipopolysaccharides rat tail artery. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 605–613.
44. Vo P.A., Lad B., Tomlinson J.A., Francis S., Ahluwalia A. Auto-regulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 7236–7243.
45. Connelly L., Madhani M., Hobbs A.J. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 10040–10046.
46. Hallemeesch M.M., Janssen B.J., de Jonge W.J., Soeters P.B., Lamers W.H., Deutz N.E. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 285: E871–E875.
47. Karimi G., Fatehi Z., Gholamnejad Z. The role of nitric oxide and protein kinase C in lipopolysaccharidemediated vascular hyporeactivity. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2006; 9: 119–123.
48. Muzaffar S., Jeremy J.Y., Angelini G.D., Stuart-Smith K., Shukla N. Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax* 2003; 58: 598–604.
49. Gupta A., Sharma A.C. Despite minimal hemodynamic alterations endotoxemia modulates NOS and p38-MAPK phosphorylation via metalloendopeptidases. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 265: 47–56.
50. Jia Y.X., Pan C.S., Yang J.H. i wsp. Altered L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the vascular adventitia of rats with sepsis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006; 33: 1202–1208.
51. Parker J.L., Adams H.R. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ. Res.* 1993; 72: 539–551.
52. Parker J.L., Myers P.R., Zhong Q., Kim K., Adams H.R. Inhibition of endothelium-dependent vasodilation by *Escherichia coli* endotoxemia. *Shock* 1994; 2: 451–458.
53. Dinh-Xuan A.T., Higenbottam T.W., Clelland C.A. i wsp. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324: 1539–1547.
54. Dinh-Xuan A.T., Pepke-Zaba J., Butt A.Y., Cremona G., Higenbottam T.W. Impairment of pulmonary-artery endothelium-dependent relaxation in chronic obstructive lung disease is not due to dysfunction of endothelial cell membrane receptors nor to L-arginine deficiency. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 109: 587–591.
55. Yousif M.H. Diabetes differentially modulated receptor- and non-receptor-mediated relaxation in rat renal artery. *Pharmacol. Res.* 2003; 48: 295–300.
56. Hobbs A.J., Ignarro L.J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Meth. Enzymol.* 1996; 269: 134–148.
57. Fleming I., Julou-Schaeffer G., Gray G.A., Parratt J.R., Stoclet J.C. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of

- tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by lipopolysaccharide. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 103: 1047–1052.
58. Paya D., Gray G.A., Stoclet J.C. Effects of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 21: 926–930.
  59. Keane J.F., Puyana J.C., Francis S., Loscalzo J.F., Stamler J.S., Loscalzo J. Methylene blue reverses lipopolysaccharide-induced hypotension. *Circ. Res.* 1994; 74: 1121–1125.
  60. Silva-Santos J.E., Terluk M.R., Assreuy J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock* 2002; 17: 70–76.
  61. Lorente J.A., Landin L., De Pablo R., Renes E., Liste D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit. Care Med.* 1993; 21: 1287–1295.
  62. Lorente J.A., Landin L., Renes E. i wsp. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit. Care Med.* 1993; 21: 759–767.
  63. Landin L., Lorente J.A., Renes E., Canas P., Jorge P., Liste D. Inhibition of nitric oxide synthesis improves the vasoconstrictive effect of noradrenaline in sepsis. *Chest* 1994; 106: 250–256.
  64. Mayer B., Brunner F., Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45: 367–374.
  65. Kirov M.Y., Evgenov O.V., Evgenov N.V. i wsp. Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. *Crit. Care Med.* 2001; 29: 1860–1867.
  66. Kwok E.S., Howes D. Use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *J. Intensive Care Med.* 2006; 21: 359–363.
  67. Fernandes D., da Silva-Santos J.E., Duma D., Villela C.G., Barja-Fidalgo C., Assreuy J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69: 983–990.
  68. Astolfi R.S., Khouri D.G., Brandizzi L.I., Avila-Campos M.J., Andrade H.F. Jr. Antagonistic effect of the inhibition of inducible nitric oxide on the mortality of mice acutely infected with *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007; 40: 317–322.
  69. Cobb J.P. Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg. Infect. (Larchmt)* 2001; 2: 93–100.
  70. Bakker J., Grover R., McLuckie A., Holzappel L. i wsp. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group: Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit. Care Med.* 2004; 32: 1–12.
  71. Watson D., Grover R., Anzueto A. i wsp. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group.: Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit. Care Med.* 2004; 32: 13–20.
  72. Lopez A., Lorente J.A., Steingrub J. i wsp. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* 2004; 32: 21–30.
  73. Liu H., Xiong Z., Sperelakis N. Cyclic nucleotides regulate the activity of L-type calcium channels in smooth muscle cells from rat portal vein. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1997; 29: 1411–1421.
  74. Xu J., Liu L. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation after hemorrhagic shock in the rat. *Shock* 2005; 23: 576–581.