

2m11.2591.3

Université de Montréal

Propriétés et mécanisme d'action du 8-iso-PGF_{2α}
sur les vaisseaux sanguins de la rétine.

par

Isabelle Lahaie

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

Août, 1997

© Isabelle Lahaie, 1997



UNIVERSITY

W

4

U58

1998

V.036

UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

2

1998

UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY



UNIVERSITY OF MICHIGAN

UNIVERSITY OF MICHIGAN

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Propriétés et mécanisme d'action du 8-iso-PGF_{2α}
sur les vaisseaux sanguins de la rétine.

présenté par:

Isabelle Lahaie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Jean St-Louis

Dr. Martin G. Sirois

Dr. Sylvain Chemtob

Mémoire accepté le: 29 octobre 1997

SOMMAIRE

Les radicaux libres formés au cours d'une oxydation sont impliqués dans des maladies d'origine ischémiques telles les rétinopathies. Suite à une peroxydation dans la rétine, les peroxydes modifient l'hémodynamie vasculaire en causant une vasoconstriction. Le thromboxane A_2 semble être responsable de cet effet constricteur. Cependant, le mécanisme par lequel les peroxydes augmentent la formation du thromboxane A_2 n'est pas très bien compris.

Les isoprostanes sont des composés formés *in vitro* et *in vivo* de façon non enzymatique par la peroxydation de l'acide arachidonique en présence de radicaux libres. Ce sont des vasoconstricteurs dont la puissance semble varier selon les tissus et/ou les espèces et dont les mécanismes d'action ne sont pas connus.

Le but de ce travail est d'étudier les propriétés et le mécanisme d'action du 8-iso-PGF_{2 α} , un isoprostane de type F₂, sur les vaisseaux sanguins de la rétine chez le porc. Notre hypothèse est que le 8-iso-PGF_{2 α} causera une vasoconstriction des vaisseaux sanguins de la rétine par la libération de thromboxane A_2 et d'endothéline-1 via possiblement un récepteur médiant l'entrée de calcium.

Les effets du 8-iso-PGF_{2 α} sur la vasomotricité rétinienne ont été étudiés par des courbes dose-réponse en absence ou en présence de différents antagonistes, à l'aide d'une caméra-vidéo et d'un analyseur d'images. La formation du thromboxane A_2 et de l'endothéline-1 dans la rétine a été mesurée par des essais radioimmunologiques et immunoenzymatiques respectivement. L'augmentation du

calcium intracellulaire dans des cellules de vaisseaux sanguins rétiniens a été étudiée à l'aide du fura-2.

Le 8-iso-PGF_{2α} cause une puissante vasoconstriction dans les artères de la rétine avec un EC₅₀ de 5.9 ± 0.5 nM. Cette constriction est inhibée par les antagonistes du récepteur du thromboxane A₂ (TP), de l'endothéline (ET_A), d'un récepteur qui médie l'entrée de calcium (ROCC) ainsi que par les inhibiteurs de la thromboxane synthase et de l'enzyme de conversion de l'endothéline et de façon moindre par un antagoniste des canaux calciques voltage dépendant. Le 8-iso-PGF_{2α} stimule la sécrétion de l'endothéline-1, la formation du thromboxane A₂ et cause une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales. Ces effets sont bloqués par un antagoniste du ROCC et de façon mimine par un antagoniste des canaux calciques voltage dépendant.

En conclusion, le 8-iso-PGF_{2α} cause une puissante vasoconstriction dans les artères de la rétine grâce à une sécrétion d'endothéline-1 et principalement à une formation de thromboxane A₂ dans la rétine et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins rétiniens, via possiblement un récepteur médiant l'entrée de calcium par l'intermédiaire de canaux calciques non dépendants du voltage. L'inhibition des effets des isoprostanes pourrait être bénéfique pour la rétinopathie du prématuré et la rétinopathie diabétique.

TABLE DES MATIÈRES

Page d'identification du jury	ii
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
I. INTRODUCTION	1
1. Les radicaux libres	2
1.1 Les radicaux libres oxygénés non lipidiques	3
1.1.1 L'anion superoxyde	3
1.1.2 Le radical hydroxyl	5
1.1.3 L'oxygène singulet	6
1.1.4 L'oxyde nitrique	7
1.2 Les sources biologiques des radicaux libres	8
1.2.1 Les mitochondries	8
1.2.2 Les composantes cytosoliques	8
1.2.3 Les peroxysomes	9

1.2.4 La membrane plasmique	9
1.2.5 Les cytochromes	10
1.2.6 Les leucocytes	10
1.2.7 Autres sources biologiques	10
1.3 Réaction des radicaux libres avec les composantes cellulaires	11
1.3.1 Les acides gras et la peroxydation	11
1.3.2 Les protéines	13
1.3.3 Les acides nucléiques et l'ADN	14
1.4 Les systèmes antioxydants	14
1.4.1 Les antioxydants enzymatiques	14
1.4.1.1 La superoxyde dismutase	14
1.4.1.2 La catalase	15
1.4.1.3 La glutathione peroxydase	15
1.4.2 Les antioxydants non enzymatiques	15
1.4.2.1 La vitamine E	16
1.4.2.2 La vitamine C	16
1.4.2.3 Les caroténoïdes	16
1.4.2.4 Les thiols	17
1.4.2.5 La céruloplasmine	17
1.4.2.6 Les composés liant des métaux	17
1.4.2.7 Autres antioxydants	17
2. Les isoprostanes	18
2.1 La formation des isoprostanes	18

2.2 L'activité biologique des isoprostanes	22
3. Le thromboxane A₂	24
3.1 La mobilisation de l'acide arachidonique	26
3.2 La voie métabolique de la PGH synthase	26
3.2.1 L'activité oxygénase	28
3.2.2 L'activité peroxydase	28
3.3 La thromboxane synthase	30
3.4 Les effets physiologiques du thromboxane A ₂	30
4. L'endothéline	31
4.1 Les trois types d'endothélines	31
4.1.1 L'endothéline-1	31
4.1.2 L'endothéline-2	32
4.1.3 L'endothéline-3	32
4.2 Les récepteurs de l'endothéline	32
4.2.1 Le récepteur ET _A	33
4.2.2 Le récepteur ET _B	33
4.3 Les effets physiologique de l'endothéline-1	34
5. Peroxydation et réactivité vasculaire	34
5.1 Les composantes du vaisseau sanguin	35
5.2 Les effets vasomoteurs lors d'une oxydation	35
5.3 Les mécanismes d'action possibles des peroxydes	36
5.3.1 La formation de prostaglandines	36
5.3.1.1 La libération de l'acide arachidonique	37

5.3.1.2 La stimulation de la cyclooxygénase	37
5.3.1.3 La régulation de l'expression de la PGH synthase-2	38
5.3.2 Modification de la concentration intracellulaire du calcium	39
5.3.2.1 Modification de l'entrée de calcium dans la cellule	39
5.3.2.2 Modification du calcium provenant du réticulum endoplasmique	40
5.3.2.3 Une perte de réponse et un maintien élevé de la concentration intracellulaire de calcium	40
II. HYPOTHÈSE ET BUTS	43
III. ARTICLE INTITULÉ:	
A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-iso prostaglandin F_{2α} on retinal vessels	46
1.1 Abstract	48
1.2 Introduction	50
1.3 Materials and Methods	52
1.4 Results	61
1.5 Discussion	73
1.6 Acknowledgments	78
1.7 References	79
IV. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	88
V. DISCUSSION	91
VI. DIRECTIONS FUTURES	102
VII. BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES TABLEAUX

Table I. Principales formes actives de l'oxygène

3

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	La peroxydation.	12
Figure 2.	La formation des isoprostanes.	20
Figure 3.	La formation du thromboxane A ₂ .	25
Figure 4.	La mobilisation de l'acide arachidonique.	27
Figure 5.	Concentration-response curves of 8-iso-PGF _{2α} on retinal arterioles of piglets in the absence and presence of different antagonists.	64
Figure 6.	Effects of 8-iso-PGF _{2α} on endothelin-1 (A) and thromboxane B ₂ (B) formation by retina and cultured retinal endothelial cells (C).	67
Figure 7.	Effects of 8-iso-PGF _{2α} on intracellular calcium transients in endothelial (A and B) and smooth muscle cells (C et D) from retinal vasculature.	70
Figure 8.	8-Iso-PGF _{2α} synthesis in retina of piglets subjected to <i>in vitro</i> (A) and <i>in vivo</i> (B) oxidant stress.	72
Figure 9.	Courbe dose-réponse du 8-iso-PGF _{2α} en absence ou en présence du SQ 29548, un antagoniste du récepteur TP.	89
Figure 10.	Courbe dose-réponse de l'endothéline-1 en absence ou en présence du L-670,596 et du CGS12970.	89
Figure 11.	Les effets du 8-iso-PGF _{2α} en absence ou en présence d'éconazole sur la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules endothéliales vasculaires.	90

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- [Ca²⁺]_i: concentration intracellulaire du calcium
- 8-iso-PGF_{2α}: 8-isoprostane-prostaglandine F_{2α}
- ADN: acide désoxyribonucléique
- ARN: acide ribonucléique
- ATP: adénosine triphosphate
- Br⁻: ion brome
- CAT: catalase
- Cl⁻: ion chlore
- Co²⁺: ion cobalt
- Cu¹⁺: ion cuivre
- EC₅₀: concentration qui donne 50% de l'effet maximal
- ECE: enzyme de conversion de l'endothéline
- EIA: essai immunoenzymatique
- ET_A: récepteur A de l'endothéline
- ET_B: récepteur B de l'endothéline
- Fe²⁺: ion ferreux
- Fe³⁺: ion ferrique
- GPx: glutathione peroxydase
- H⁺: ion hydrogène
- H₂O: eau
- H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
- HNO: nitroxyl
- HOCl: hypochlorure d'acide
- HOO[·]: radical hydroperoxyl
- I⁻: ion iode
- Ins(1,4,5)P₃: inositol triphosphate
- K⁺: ion potassium
- L[·]: radical alkyl

LH: acide gras polyinsaturé
LOO[•]: radical peroxy
LOOH: hydroperoxyde
MDA: malondialdéhyde
Na⁺: ion sodium
NADH: nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO[•]: oxyde nitrique
NO₂⁻: nitrite
NO₂: dioxyde d'azote
NO₃⁻: nitrate
O₂^{-•}: anion superoxyde
O₂: oxygène
O₂¹: oxygène singulet
O₂²⁻: ion peroxyde
OH[•]: radical hydroxyl
OH⁻: ion hydroxyde
ONOO⁻: l'anion peroxy nitrite
ONOOH: acide peroxy nitreux
PGI₂: prostagandine I₂
PLA₂: phospholipase A₂
PLC: phospholipase C
RE: réticulum endoplasmique
RIA: essai radioimmunologique
ROCC: récepteur opérant des canaux calciques
SOD: superoxyde dismutase
t-BOOH: *tert*-butyl-hydroperoxyde
Ti³⁺: ion titane
TP: récepteur du thromboxane A₂
TxA₂: thromboxane A₂
TxB₂: métabolite stable du thromboxane A₂

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce mémoire à mes parents
ainsi qu'à mon ami Jean-Bernard
qui m'ont grandement aidé au cours de ma maîtrise
et qui ont su m'encourager dans les moments difficiles.

MERCI !

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier les organismes subventionnaires qui m'ont accordé des bourses d'études:

Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR)
Fight for Sight research division of Prevent Blindness America
Téléthon de la recherche sur les maladies infantiles

Au cours de ma maîtrise, j'ai cotoyé plusieurs personnes qui m'ont initié à la recherche et dont j'aimerais rendre un dernier hommage:

Sylvain Chemtob: mon directeur de maîtrise, je te remercie de m'avoir accueilli dans ton laboratoire. Tu as toujours pris le temps de m'écouter et de te rendre disponible pour m'aider. Tu respectes beaucoup tes étudiants et tu leur donnes la place qui leur revient, merci.

Dr Varma: professeur à l'université McGill, qui m'a initié à l'écriture d'articles scientifiques, merci de vos précieux conseils.

Hensy Fernandez: technicienne de laboratoire, qui m'a fait partager son expérience. Merci beaucoup Hensy, j'ai grandement apprécié ton aide et tes encouragements. C'était toujours un plaisir pour moi de travailler avec toi.

Daniel Abran: assistant de recherche, Daniel était toujours disponible pour répondre à mes questions et m'aider à résoudre mes problèmes. De plus tu m'as communiqué ta joie de vivre, merci Daniel.

Pierre Hardy: étudiant au doctorat, merci pour tes précieux conseils. Tu es le modèle par excellence par ton sens du devoir bien accompli et ton professionnalisme.

Mousumi Bhattacharya: étudiante au doctorat, merci de ton aide pour la culture cellulaire, tes conseils et tes encouragements. Grâce à toi j'ai appris à parler anglais!

Isabelle Dumont: étudiante au doctorat, qui m'a toujours encouragé par son sourire, ces paroles et ces gestes. C'est toujours agréable de cotoyer une personne comme toi!

Krishna Peri: assistant de recherche, merci pour tes conseils.

Pierre Asselin: étudiant post-doctorat, merci pour tes encouragements.

I. INTRODUCTION

La rétinopathie est une maladie oculaire fréquemment rencontrée chez les nouveaux-nés prématurés ainsi que chez les personnes diabétiques. La rétinopathie est une maladie qui affecte les vaisseaux sanguins de la rétine. La première phase de la maladie est caractérisée par une vasoconstriction pouvant aller jusqu'à une oblitération des vaisseaux sanguins. La deuxième phase consiste à une prolifération active de vaisseaux sanguins dans la rétine. Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le développement de la maladie dont l'oxygène qui forme des radicaux libres. Par leurs réactions, les radicaux libres modifient, entre autres, l'hémodynamie vasculaire et la fonction physiologique de la rétine. Dans ce mémoire, il sera question des propriétés physiologiques et des mécanismes d'action des isoprostanes formés lors d'une peroxydation en présence de radicaux libres. Ces composés pourraient être impliqués dans la première phase de la rétinopathie.

1. Les radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui possède une configuration électronique ayant un nombre impair d'électrons non partagés. La formation de radicaux libres est, en général, le résultat d'un gain ou d'une perte d'un électron. De par leur nature, les radicaux libres sont donc des composés très instables ce qui leur confère une très grande réactivité. La molécule d'oxygène, présente dans tous les organismes aérobiques, possède deux électrons non appariés, situés dans les deux orbitales externes de la molécule ce qui facilite la production de formes actives

oxygénées incluant des radicaux libres oxygénés (Table 1). Il sera donc question des radicaux libres oxygénés puisque ceux-ci forment la majorité des radicaux libres biologiques.

Table I. Principales formes actives de l'oxygène

$O_2^{\cdot -}$	anion superoxyde	instable
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène	stable
OH^{\cdot}	radical hydroxyl	très instable
O_2^1	oxygène singulet	très instable
NO^{\cdot}	oxyde nitrique	stable
HOO^{\cdot}	radical hydroperoxyl	instable
LOO^{\cdot} (L=lipide)	radical peroxy	stable

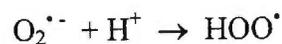
1.1 Les radicaux libres oxygénés non lipidiques

1.1.1 L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)

Par la réduction ou l'addition d'un électron de la molécule d'oxygène, il y a formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Plusieurs composantes cellulaires peuvent produire l' $O_2^{\cdot -}$. Certaines enzymes de la chaîne respiratoire des mitochondries produisent l' $O_2^{\cdot -}$ (Freeman et Crapo, 1982). La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH) qui est présente sur les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les plaquettes et les cellules endothéliales produit l' $O_2^{\cdot -}$ lorsqu'elle est activée par différents stimuli (Babior, 1978; Babior et Peters, 1981). Des enzymes telles la cyclooxygénase (Kukreja et coll., 1986; Pourcyrous et coll., 1993), la lipoxygénase (Kukreja et coll., 1986), l'oxyde nitrique synthase (Pou

et coll., 1992), la xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydase, les flavoprotéines déhydrogénases, la dihydroorotate déhydrogénase, les peroxydases (McCord et Fridovich, 1968) et la tryptophane dioxygénase (Hirata et Hayaishi, 1971) peuvent générer l' $O_2^{\cdot-}$. Les réactions d'auto-oxydations impliquant des catécholamines (Misra et Fridovich, 1972), les flavines (Ballou et coll., 1969), les hydroquinones (McCord et Fridovich, 1970), les thiols (Misra, 1974) et les tétrahydroptérines (Fisher et Kaufman, 1973) constituent une source d' $O_2^{\cdot-}$. Lorsque des radiations ionisantes traversent des solutions aqueuses contenant de l'oxygène, il y a formation de l' $O_2^{\cdot-}$ (Marklund, 1985). Finalement, l' $O_2^{\cdot-}$ peut également être formé par le cytochrome P₄₅₀ (Estabrook et Werringloer, 1976).

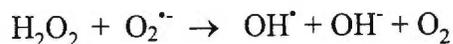
L' $O_2^{\cdot-}$ est un radical libre instable et suite à l'addition d'un autre électron il y aura production de l'ion peroxyde (O_2^{2-}). Cependant, à pH physiologique, l'ion peroxyde sera immédiatement converti en peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , qui n'est pas, par définition, un radical libre. Le H_2O_2 peut également être formé spontanément en solution aqueuse avec formation intermédiaire du radical hydroperoxyl (HOO^{\cdot}) (Southorn et Powis, 1988; Warner et Wispé, 1992):



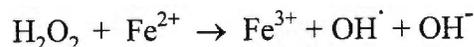
L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) dont la tâche est d'éliminer l' $O_2^{\cdot-}$, contribue également à la production intracellulaire de H_2O_2 par cette même réaction. De plus, certaines oxydases se trouvant dans les peroxysomes produisent du H_2O_2 (Masters et Holmes, 1977).

1.1.2 Le radical hydroxyl (OH[•])

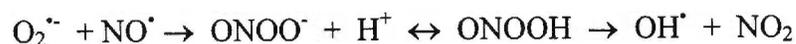
En solution aqueuse, O₂^{•-} et H₂O₂ sont des oxydes faibles et vont plutôt servir de substrats pour la formation du radical hydroxyl (OH[•]) qui est très instable. C'est une molécule qui réagit instantanément avec presque toutes les molécules cellulaires qu'elle rencontre. Cette formation peut se produire selon la réaction de Haber Weiss (Halliwell et Gutteridge, 1984; Southorn et Powis, 1988) en présence d'un catalyseur contenant l'ion ferrique (Fe³⁺):



Le radical hydroxyl peut également être formé selon la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1984; Southorn et Powis, 1988) où le peroxyde d'hydrogène est mis en contact avec des ions ferreux (Fe²⁺) ou d'autres métaux (Ti³⁺, Cu¹⁺, Co²⁺):



Il a été proposé que le radical hydroxyl pouvait être produit par l'interaction du radical libre oxyde nitrique (NO[•]) et de l'anion superoxyde formant l'anion peroxynitrite (ONOO⁻) qui à pH physiologique se transforme en acide peroxynitieux (ONOOH) (Beckman et coll., 1990). Étant donné que ce dernier est très instable, il sera rapidement décomposé en radical hydroxyl et en dioxyde d'azote (NO₂):



Cependant, de récentes études thermodynamiques suggèrent qu'il est peu probable que l'anion peroxynitrite se décompose en radical hydroxyl puisque la séparation de la liaison covalente O-O requiert beaucoup d'énergie (Koppenol et coll., 1992). Finalement, le radical hydroxyl peut être formé lors de la décomposition de l'eau par des radiations ionisantes (Southorn et Powis, 1988).

1.1.3 L'oxygène singulet (O_2^1)

L'oxygène singulet est formé par l'inversion de la rotation d'un de ses électrons qui sont situés sur les deux orbitales externes. Il y a deux formes d'oxygène singulet: l'oxygène singulet sigma ($O_2^1\Sigma g^+$) qui est caractérisé par une demi-vie très courte (10^{-12} secondes) et l'oxygène singulet delta (Δg) qui possède une demi-vie plus longue (10^{-6} secondes) (Bellus, 1978). Étant donné que les deux électrons inversés sont dans la même orbitale, l'oxygène singulet delta n'est pas, par définition, un radical libre. Cependant, lorsqu'il est formé, il peut réagir facilement avec plusieurs composantes cellulaires.

L'oxygène singulet peut être formé par l'activation photochimique de la molécule d'oxygène (Southorn et Powis, 1988; Halliwell, 1990). Il a également été suggéré que la formation de l'oxygène singulet pourrait avoir lieu *in vivo* lors de la dismutation de l'anion superoxyde (Arudi et coll., 1984), au cours de la réaction phagocytaire (Wefers, 1987), lors de la réaction de deux radicaux peroxy au cours de la peroxydation (Wefers, 1987), au cours de l'oxydation des halides par le H_2O_2 , et finalement lors de la réaction Haber Weiss (Del Maestro, 1980; Southorn et Powis, 1988).

1.1.4 L'oxyde nitrique (NO[•])

L'oxyde nitrique est un radical libre qui possède de nombreuses propriétés physiologiques. Il est impliqué dans la vasodilatation (Furchgott et Zawadzki, 1980; Palmer et coll., 1987), dans l'action cytotoxique des macrophages (Hibbs et coll., 1987), dans la neurotransmission synaptique (Garthwaite et coll., 1988; Bredt et Snyder, 1989) et finalement il empêche l'agrégation plaquettaire (Azuma et coll., 1986; Furlong et coll., 1987; Radomski et coll., 1987). L'oxyde nitrique synthase synthétise le NO[•] à partir de la L-arginine en présence d'oxygène et de la NADPH (Palmer et coll., 1988). Les facteurs responsables de la formation du NO[•] dans les cellules endothéliales sont le débit sanguin pulsatile (Pohl et coll., 1986) et l'hypoxie (Moncada et coll., 1991). Également, suite à l'activation des récepteurs d'agents tels que l'acétylcholine, la thrombine, la substance P, la bradykinine, il y a formation de NO[•] (Moncada et coll., 1991). Récemment, il a été postulé que la superoxyde dismutase (SOD) augmente la formation de NO[•] par l'oxydation d'un composé intermédiaire, le nitroxy (HNO), formé lors de la conversion du L-arginine en NO[•] (Hobbs et coll., 1994).

Dans des conditions physiologiques, le NO[•] peut se lier rapidement d'une part avec l'hémoglobine et d'autre part avec la guanylate cyclase (Moncada et coll., 1991). De plus, le NO[•] peut se lier avec la molécule d'oxygène pour former le dioxyde d'azote (NO₂). En solution aqueuse, le NO₂ se transforme en nitrite (NO₂⁻) et en nitrate (NO₃⁻) (Moncada et coll., 1991). Il a également été démontré que le NO[•] réagit avec l'O₂^{•-} pour former l'anion peroxyde nitrite (ONOO⁻) (Blough et Zafiriou, 1985).

1.2 Les sources biologiques des radicaux libres

1.2.1 Les mitochondries

La chaîne respiratoire des mitochondries transforme l' O_2 en H_2O par des réactions d'oxydo-réductions pour fournir l'énergie cellulaire, surtout sous forme d'ATP. Il y a trois composantes de la chaîne respiratoire qui peuvent réduire une faible portion de l'oxygène par le transfert d'un seul électron pour produire l' $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et le OH^{\cdot} (Freeman et Crapo, 1982): le complexe NADH déshydrogénase, la région de l'ubiquinone-cytochrome B (Turrens et coll., 1982) et la dihydroorotate déshydrogénase (Forman et Kennedy, 1976). La formation de formes actives de l'oxygène par les mitochondries augmente en fonction de la concentration d'oxygène. En effet, lors de conditions normoxyques, la production d' $O_2^{\cdot-}$ est de 1% à 2% alors qu'elle peut augmenter jusqu'à 25% lors de conditions hyperoxyques (Turrens et coll., 1982).

1.2.2 Les composantes cytosoliques

Plusieurs composantes cytosoliques solubles comme les thiols, les hydroquinones, les catécholamines, les flavines et les tétrahydroptéridines peuvent effectuer des réactions d'auto-oxydations dans lesquelles il y a une formation importante d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 intracellulaire (Freeman et Crapo, 1982). De plus, bon nombre d'enzymes cytoplasmiques et microsomaux peuvent également contribuer à la formation de radicaux libres. Ces enzymes sont la xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydase, la flavoprotéine déshydrogénase, la tryptophane dioxygénase (Freeman et

Crapo, 1982) et l'oxyde nitrique synthase (Pou et coll., 1992). Cependant, la xanthine oxydase est la plus importante puisqu'elle semble être impliquée dans le phénomène de l'ischémie-reperfusion (McCord, 1985).

1.2.3 Les peroxysomes

Les peroxysomes contiennent une grande variété d'enzymes dont la D-amino acide oxydase, l'urate oxydase, la glycolate oxidase, la L- α -hydroxyacide oxydase et l'acétyl co-enzyme A oxydase (Freeman et Crapo, 1982) qui interviennent dans des réactions d'oxydation contribuant de façon importante à la formation du H_2O_2 . La catalase qui est présente dans les peroxysomes a pour rôle de transformer le H_2O_2 produit par ces oxydases en H_2O (Jones, 1982).

1.2.4 La membrane plasmique

La cyclooxygénase et la lipoxygénase sont des enzymes liées aux membranes plasmiques qui produisent respectivement des prostaglandines et des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique. Au cours de ces réactions, il y a formation de radicaux libres non lipidiques tel le OH^\bullet , ainsi que des radicaux libres lipidiques (Freeman et Crapo, 1982). Il y a également une formation de radicaux libres lipidiques lors d'une peroxydation. Donc la formation de radicaux libres dans la membrane plasmique peut être particulièrement critique pour l'intégrité de la cellule puisqu'elle contient des protéines et des acides gras polyinsaturés susceptibles de réagir avec les radicaux libres (Warner et Wispé, 1992).

1.2.5 Les cytochromes

Le réticulum endoplasmique, les microsomes et les membranes nucléaires possèdent les cytochromes P_{450} et b_5 qui sont des monooxygénases accomplissant des réactions de déméthylation, d'hydroxylation et de désaturation. Ces réactions d'auto-oxydations génèrent $l'O_2^{\cdot-}$, le H_2O_2 , le OH^{\cdot} ainsi que le radical peroxy (LOO^{\cdot}) (Estabrook et Werringloer, 1976; Freeman et Crapo, 1982).

1.2.6 Les leucocytes

La NADPH oxydase présente sur les leucocytes polymorphonucléaires et les macrophages convertit la molécule d'oxygène en $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 , lorsqu'elle est activée par différents stimuli. Ces formes actives de l'oxygène vont servir à produire des oxydants bactéricides divisés en deux principales catégories: les halogènes oxydés et les radicaux libres oxygénés. La myéloperoxydase qui est une hémoprotéine transforme les ions halides (Cl^- , Br^- , I^-) en hypohalite tel l'acide d'hypochlorure ($HOCl$) en présence de H_2O_2 . Les radicaux libres oxygénés comprennent $l'O_2^{\cdot-}$ et le OH^{\cdot} (Babior, 1984).

1.2.7 Autres sources biologiques

Il y a d'autres sources biologiques qui produisent des formes actives de l'oxygène. Il y a les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les macrophages et les neutrophiles qui peuvent former $l'O_2^{\cdot-}$, le NO^{\cdot} et par combinaison des deux $l'ONOO^{\cdot}$ (Moncada et coll., 1988). Un excès de H_2O_2 , peut causer une dégradation

de l'hémoglobine et la myoglobine libérant les ions de fer ce qui peut contribuer à la formation du radical hydroxyl et initier une peroxydation (Gutteridge, 1986).

1.3 Réaction des radicaux libres avec les composantes cellulaires

Étant donné que les radicaux libres ont une très grande réactivité, ils vont réagir avec des molécules qui se trouvent dans leur environnement immédiat. Il sera donc question des composantes cellulaires les plus susceptibles d'être altérées par les radicaux libres.

1.3.1 Les acides gras et la peroxydation

La peroxydation est une réaction d'auto-oxydation des radicaux libres avec les acides gras polyinsaturés (LH) retrouvés dans les tissus et les membranes cellulaires. Cette réaction débute par l'attraction, par un radical libre (R^{\bullet}), d'un atome d'hydrogène d'un atome de carbone, formant ainsi un radical alkyl (L^{\bullet}) qui subira rapidement un réarrangement moléculaire des liaisons doubles adjacentes pour former un diène conjugué. Ce dernier réagit alors avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy (LOO^{\bullet}) et un hydroperoxyde (LOOH). Il se produit alors une réaction en chaîne où le LOO^{\bullet} va à son tour, déplacer un atome d'hydrogène d'un atome de carbone pour former un diène conjugué participant ainsi à la propagation des réactions d'auto-oxydation. La propagation va se terminer lorsque deux radicaux libres vont réagir ensemble ou par l'action d'un antioxydant sur un radical libre lipidique (Flaherty et Weisfeldt, 1988; Southorn et Powis, 1988) (Figure 1):

À partir des LOOH formés et en présence d'ions métalliques, il y aura une production d'aldéhydes, dont le malondialdéhyde (MDA), d'alcane et de radicaux alkoxy qui contribuent également à la propagation de la peroxydation. De plus, ces produits peuvent causer une modification de la perméabilité vasculaire, de l'oedème, de l'inflammation et finalement une altération des fonctions des protéines membranaires comme les récepteurs, les canaux ioniques et les enzymes (Del Maestro, 1980).

1.3.2 Les protéines

Les protéines qui contiennent des groupements sulfhydryls et aromatiques sont susceptibles d'être oxydés par les radicaux libres. Il peut y avoir une fragmentation de la protéine, une modification des charges électriques des acides, une inactivation des sites catalytiques ainsi qu'une altération des structures secondaire et tertiaire avec une exposition des régions hydrophobes. Il se produit alors une agglutination des protéines ce qui diminue leur solubilité (Davies, 1987; Ryter et coll., 1990). Ces protéines agglutinées sont impliquées notamment dans la formation de la cataracte (Taylor et Davies, 1987).

Cette susceptibilité des protéines dépend évidemment des acides aminés qui composent les protéines, de la localisation ainsi que de l'importance des acides aminés qui ont été attaqués dans la conformation et l'activité de la protéine, de la localisation de la protéine dans la cellule et de l'étendue de la réaction avec les radicaux libres (Freeman et Crapo, 1982).

1.3.3 Les acides nucléiques et l'ADN

Les purines, les pyrimidines et les glucides désoxyribose sont la cible du radical hydroxyl qui effectue des réactions d'hydroxylation. Ces réactions ont pour conséquences une séparation des brins d'ADN, une inhibition de la synthèse des protéines, une amplification d'aberrations chromosomiques et de mutations ainsi qu'une formation de produits secondaires tels des dérivés d'urée (Teoule, 1987; Ryter et coll., 1990).

1.4 **Les systèmes antioxydants**

L'organisme aérobique produit continuellement des formes actives oxygénées en faible proportion, en raison des réactions métaboliques cellulaires. En général, cette quantité produite est neutralisée par les systèmes antioxydants intracellulaires et extracellulaires. Il existe deux grandes catégories d'antioxydants: il y a les antioxydants enzymatiques et il y a les antioxydants non enzymatiques.

1.4.1 Les antioxydants enzymatiques

En général, les antioxydants enzymatiques contrôlent la formation de radicaux libres capables d'initier une peroxydation.

1.4.1.1 *La superoxyde dismutase (SOD)*: Elle a pour rôle de transformer l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et en O_2 (Fridovich, 1978). Cette métalloprotéine, principalement intracellulaire, existe sous deux formes: celle contenant du cuivre et du zinc se retrouve dans le cytoplasme (CuZn-SOD) et celle ayant du manganèse se retrouve

dans les mitochondries (Mn-SOD). Il y a une SOD extracellulaire qui est en très faible concentration dans le plasma, la lymphe et le liquide céphalo-rachidien (McCord, 1974).

1.4.1.2 *La catalase (CAT)*: Elle a pour fonction d'éliminer le H_2O_2 . Comparativement à la glutathione peroxydase, cette hémoprotéine a une faible affinité pour le H_2O_2 mais elle devient très efficace lorsqu'il y a des concentrations élevées de H_2O_2 (Southorn et Powis, 1988). La CAT est située surtout dans les peroxysomes.

1.4.1.3 *La glutathione peroxydase (GPx)*: À faible concentration, le H_2O_2 est éliminé grâce à la GPx qui possède une affinité élevée pour le H_2O_2 . Cette enzyme élimine également les peroxydes prévenant ainsi la propagation de la peroxydation. Ces décompositions nécessitent la présence du glutathion comme cofacteur et le glutathion oxydé est régénéré par la glutathione réductase (Southorn et Powis, 1988). La GPx est présente dans les mitochondries et le cytoplasme (Flaherty et Weisfeldt, 1988).

1.4.2 Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques vont, en général, inactiver les radicaux libres qui sont formés par des réactions de réduction.

1.4.2.1 *La vitamine E (α -tocophérol)*: Elle est capable de convertir l' $O_2^{\bullet-}$, le OH^{\bullet} , l' O_2^1 , le radical peroxy et le radical alkoxy en donnant un atome d'hydrogène (Tappel, 1962). Elle possède une structure liposoluble qui lui permet de se loger dans les membranes plasmiques les protégeant de la peroxydation (Ozawa et coll., 1978). Elle se retrouve aussi dans le plasma empêchant l'oxydation des lipoprotéines (Halliwell et Gutteridge, 1990).

1.4.2.2 *La vitamine C (acide ascorbique)*: Elle élimine l' $O_2^{\bullet-}$, le HOO^{\bullet} , le OH^{\bullet} , l' O_2^1 , le ROO^{\bullet} et l'acide d'hypochlorure. Cette vitamine hydrosoluble est présente dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien, et dans certains tissus comme l'oeil (Varma et coll., 1984; Halliwell et Gutteridge, 1990). Elle est capable d'inhiber la peroxydation en empêchant d'une part la dégradation de l'hémoglobine et la myoglobine lors d'un excès de H_2O_2 et d'autre part, en protégeant les lipides plasmatiques des radicaux libres libérés par les neutrophiles activés (Halliwell, 1990). Elle possède l'habileté de régénérer l' α -tocophérol qui a été oxydé à la surface des membranes cellulaires contribuant ainsi à l'activité antioxydante de la vitamine E (Halliwell et Gutteridge, 1990).

1.4.2.3 *Les caroténoïdes*: Ils sont efficaces pour neutraliser la peroxydation et éliminer l' O_2^1 d'origine photochimique (Halliwell, 1990). Le β -carotène, le lycopène et la lutéine sont les caroténoïdes les plus importants.

1.4.2.4 *Les thiols*: Les composés contenant des groupements thiols comme la cystéine, le glutathion ainsi que les protéines possédant des groupements sulfydryls neutralisent les radicaux libres en donnant un électron de leur groupe sulfydryl (Freeman et Crapo 1982).

1.4.2.5 *La céruloplasmine*: Elle semble jouer un rôle important dans le métabolisme du fer par son activité ferroxidase où le Fe^{2+} est oxydé en Fe^{3+} sans aucune formation de radicaux libres. Elle lie également de façon non spécifique les ions de cuivre. Par ces propriétés, cette protéine plasmatique empêche la formation du radical hydroxyl ainsi que la peroxydation (Gutteridge et Stocks, 1981).

1.4.2.6 *Les composés liant des métaux*: Des composés tels que l'albumine, la transferrine-lactoferrine qui sont présents dans le plasma, lient des métaux comme le fer et le cuivre et inhibent la formation de radicaux libres ainsi que la peroxydation. De plus, la bilirubine qui est liée à l'albumine empêche la peroxydation des acides gras transportés par l'albumine (Halliwell et Gutteridge, 1990).

1.4.2.7 *Autres antioxydants*: Il existe plusieurs autres composés possédant des propriétés antioxydantes tels l'acide urique, l'haptoglobine/hémopexine, le glucose (Halliwell et Gutteridge, 1990), l'ubiquinol-10 (Frei et coll., 1990) qui se retrouvent dans le plasma ainsi que dans des composantes intracellulaires.

Il faut noter qu'un antioxydant présent dans un environnement particulier de l'organisme n'est pas nécessairement un antioxydant dans tout l'organisme (Halliwell, 1990). En général, les systèmes antioxydants sont capables de neutraliser la majorité des radicaux libres produits par l'organisme. Lorsque la production de formes actives oxygénées excède les capacités antioxydantes, l'organisme subit un stress oxydatif. Ce phénomène peut survenir lors d'une exposition élevée à l'oxygène (hyperoxie) ou parce que les défenses antioxydantes sont déficientes ou non développées. Chez les nouveau-nés, par exemple, certains tissus tel l'oeil, n'ont pas encore développés de systèmes antioxydants ce qui les rend plus susceptibles aux dommages oxydatifs (Nielsen et coll., 1988; Oliver et Newsome, 1992) et au développement de maladies comme la rétinopathie.

2. Les isoprostanes

Les isoprostanes sont des composés chimiques de 20 atomes de carbone possédant une structure moléculaire semblable à celle des prostaglandines. Jusqu'à maintenant, quatre types d'isoprostanes ont été découverts: il s'agit des isoprostanes de type F₂, E₂, D₂ et des isothromboxanes.

2.1 La formation des isoprostanes

Les isoprostanes sont formés *in vivo* et *in vitro* de façon non enzymatique par la peroxydation de l'acide arachidonique en présence de radicaux libres (Morrow et Roberts, 1996). Ce processus débute avec la formation d'un radical lipidique (L') lorsqu'un des trois atomes de carbone (C₇, C₁₀ ou C₁₃) perd un atome d'hydrogène

au profit d'un radical libre (R') (Figure 2A). Par la suite, le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxy (LOO') (Figure 2B). Il peut y avoir jusqu'à quatre isomères de radicaux peroxyls ainsi formés selon l'atome de carbone attaqué. Par l'insertion d'une deuxième molécule d'oxygène au radical peroxy, il y aura formation d'un cycle cyclopentanique créant ainsi un endoperoxyde bicyclique (Figure 2C). Selon le type d'isoprostanés formé, il y aura une réduction de l'endoperoxyde bicyclique menant à une formation d'isoprostanés de type F_2 , ou un réarrangement spontané de l'endoperoxyde bicyclique créant ainsi les isoprostanés de type E_2 , D_2 (Morrow et coll., 1994) et les isothromboxanes (Morrow et coll., 1996). À partir des quatre isomères de radicaux peroxyls formés, il peut y avoir jusqu'à quatre régioisomères d'endoperoxydes bicycliques produits et chacun d'eux pourra théoriquement former huit diastéréoisomères racémiques. Par ce processus, il peut y avoir théoriquement jusqu'à 64 composés différents. Les isoprostanés ont préférentiellement une isomérisation *cis* à l'opposé des prostaglandines formées par la cyclooxygénase qui ont une isomérisation *trans* (Morrow et coll., 1990a).

Les isoprostanes sont formés *in situ* dans les phospholipides et ils sont ensuite libérés possiblement par la phospholipase A₂ (Morrow et coll., 1992a). Ce sont des molécules chimiques très stables qu'on retrouve dans tous les tissus et fluides biologiques tels que le plasma, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, la bile, la lymphe, le liquide synovial et bronchoalvéolaire (Morrow et Roberts, 1996). D'ailleurs ils sont de plus en plus utilisés comme indicateur d'une oxydation. Selon les tissus, la quantité de chaque type d'isoprostanes formés varie; dans certains tissus, les isoprostanes de type F₂ sont plus abondants alors que dans d'autres les isoprostanes F₂, E₂ et D₂ sont retrouvés en quantité équivalente. Les facteurs favorisant la formation d'un type d'isoprostanes par rapport à un autre ne sont pas connus (Morrow et Roberts, 1996).

Morrow et Roberts ont découvert à leur grande surprise, que la quantité d'isoprostanes formés dans le corps humain lors de conditions normales excède la quantité des produits majoritairement formés par la cyclooxygénase (Morrow et Roberts, 1996). De plus, lors d'un stress oxydatif, leur production est fortement augmentée (Salahudeen et coll., 1995; Longmire et coll., 1994b; Morrow et coll., 1992b; Morrow et coll., 1990b). Lors d'une déficience d'antioxydants, comme la vitamine E, et sans qu'il y ait de composé pouvant induire une peroxydation chez le rat, il y a une augmentation de leur formation (Awad et coll., 1994). Il a été rapporté que des isoprostanes de type F₂, dont le 8-iso-PGF_{2α}, pouvaient être formés par la cyclooxygénase dans les plaquettes et le sérum (Pratico et coll., 1995; Wang, 1995). Cependant cette formation enzymatique n'est pas significative puisque qu'il y a 1000 fois moins de 8-iso-PGF_{2α} produits par rapport au thromboxane A₂ dans les

plaquettes et que normalement la quantité de produits formés par la cyclooxygénase est moindre que celle des isoprostanes formés de façon non enzymatique (Morrow et Roberts, 1996).

2.2 L'activité biologique des isoprostanes

Les isoprostanes de type F₂ et E₂ exercent une puissante vasoconstriction avec un EC₅₀ de l'ordre du nanomolaire dans le rein perfusé chez le rat (Takahashi et coll., 1992). Ils induisent également une constriction au niveau des bronches et des vaisseaux sanguins des poumons (Banerjee et coll., 1992; Kang et coll., 1993; Wagner et coll., 1997), des artères coronaires et de l'aorte (Kromer et Tippins, 1996; Wagner et coll., 1997) ainsi qu'au niveau des artérioles cérébrales (Hoffman et coll., 1997). De plus, les isoprostanes induisent une formation d'inositol triphosphate, une augmentation du calcium cytosolique, une augmentation des produits formés par la cyclooxygénase ainsi qu'une stimulation de l'ADN des cellules de muscles lisses aortiques (Fukunaga et coll., 1993; Pratico et coll., 1996; Wagner et coll., 1997). Dans les plaquettes sanguines, les isoprostanes sont de faibles agonistes pour induire un changement physique et une agrégation plaquettaire. Récemment, il a été rapporté que le 8-iso-PGF_{2α} stimulerait la sécrétion de l'endothéline-1 dans les cellules endothéliales de l'aorte thoracique bovine (Fukunaga et coll., 1995). On croît que les isoprostanes peuvent modifier l'intégrité et la fluidité des membranes cellulaires, étant donné que ce sont des molécules très déformées (Morrow et coll., 1992a). Ils sont donc des médiateurs potentiels de pathologies associées à un stress

oxydatif. Les effets physiologiques des isoprostanes de type D₂ et des isothromboxanes n'ont pas encore été déterminés.

Plusieurs expériences ont été effectuées pour déterminer leur mécanisme d'action. Leurs effets vasculaires sont inhibés par un antagoniste sélectif du récepteur du thromboxane A₂ (TP), le SQ 29548, suggérant qu'ils pourraient agir via ce récepteur (Takahashi et coll., 1992; Banerjee et coll., 1992; Kang et coll., 1993; Kromer et Tippins, 1996; Hoffman et coll., 1997). D'autres expériences ont démontré que les effets des isoprostanes étaient beaucoup plus importants que ceux provoqués par un agoniste mimétique du thromboxane A₂, le U46619, sur le récepteur TP (Fukunaga et coll., 1993; Fukunaga et coll., 1997). De plus, le 8-iso-PGF_{2α} agit principalement comme un antagoniste au niveau des récepteurs TP des plaquettes (Morrow et coll., 1992c). Sur des cellules transfectées avec l'ADN complémentaire du récepteur du thromboxane A₂, le 8-iso-PGF_{2α} ne se lie pas au récepteur TP (Pratico et coll., 1996). Certains chercheurs ont alors suggéré que les isoprostanes agiraient probablement par l'intermédiaire d'un récepteur qui serait semblable au récepteur TP mais par ailleurs distinct de ce dernier (Fukunaga et coll., 1993; Longmire et coll., 1994a; Yura et coll., 1995; Pratico et coll., 1996; Fukunaga et coll., 1997). Récemment, il a été démontré que le 8-iso-PGF_{2α} activerait deux voies majeures de signalisation intracellulaire dans les carotides, via le récepteur du thromboxane A₂. Il s'agit de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine et de l'activation de la MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) (Molher et coll., 1996). Jusqu'à maintenant, le mécanisme d'action des isoprostanes n'a pas été

complètement élucidé et il semble être différent selon le type de cellule et/ou de tissu.

3. Le thromboxane A₂

Étant donné que le thromboxane A₂ semble être impliqué dans l'effet du 8-iso-PGF_{2α} dans les artères de la rétine, il me semble important de décrire les étapes de sa formation ainsi que de ses effets physiologiques.

Le thromboxane A₂, tout comme les prostaglandines, fait partie de la famille des prostanoides. C'est un acide gras de 20 atomes de carbone dont le précurseur est l'acide arachidonique. La formation du thromboxane A₂ est enzymatique et elle se divise en trois étapes: la mobilisation de l'acide arachidonique, la conversion de l'acide arachidonique en endoperoxyde, PGG₂ et PGH₂, via la voie métabolique de la PGH synthase et finalement le réarrangement de PGH₂ par la thromboxane synthase pour former le thromboxane A₂ (Smith et coll., 1991) (Figure 3).

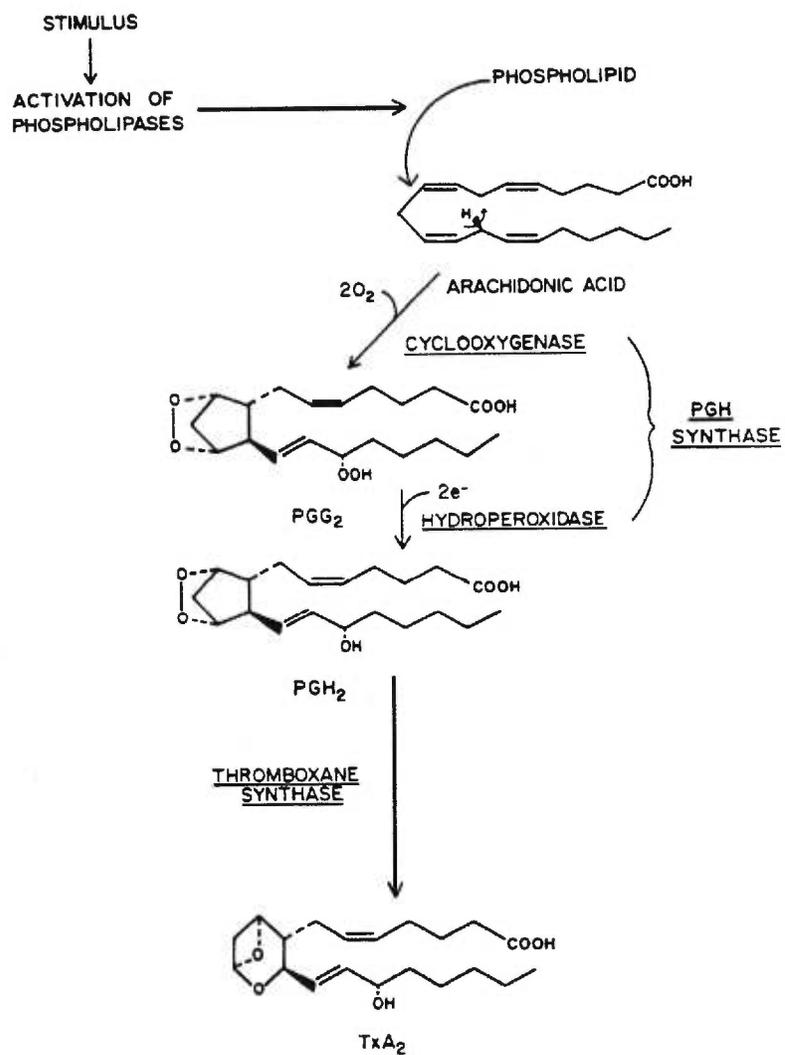


Figure 3. La formation du thromboxane (modifiée de Smith et coll., 1991)

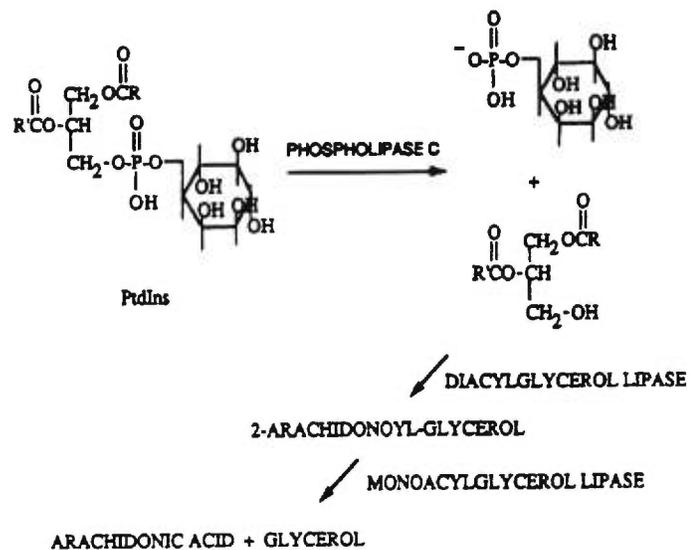
3.1 La mobilisation de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique se trouve dans les phosphoglycérides de la membrane plasmique. Suite à un stimulus approprié, l'acide arachidonique est séparé des phosphoglycérides. Il y a au moins deux voies par lesquelles l'acide arachidonique peut être mobilisé. Il y a la voie de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui sépare principalement l'acide arachidonique de la phosphatidylcholine, et à partir du phosphatidylinositol il y a la voie de la phospholipase C (PLC) et des lipases diacylglycérol et monoacylglycérol (Dennis, 1987). La contribution de chaque voie peut varier selon les types de cellules. Cependant, il semble que la voie de la phospholipase A₂ soit la plus importante (Dennis, 1987; Bettazzoli et coll., 1990) (Figure 4).

3.2 La voie métabolique de la PGH synthase

La PGH synthase possède deux activités catalytiques: L'activité oxygénase (cyclooxygénase) qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en PGG₂ et l'activité peroxydase qui catalyse la transformation de PGG₂ en PGH₂ (Miyamoto et coll., 1976; Van Der Ouderaa et coll., 1977). Les deux activités sont présentes sur la même PGH synthase et elles nécessitent la présence d'un groupement hème (Van Der Ouderaa et coll., 1977; Roth et coll., 1981; Kulmacz et Lands, 1984).

PHOSPHOLIPASE C PATHWAY:



PHOSPHOLIPASE A₂ PATHWAY:

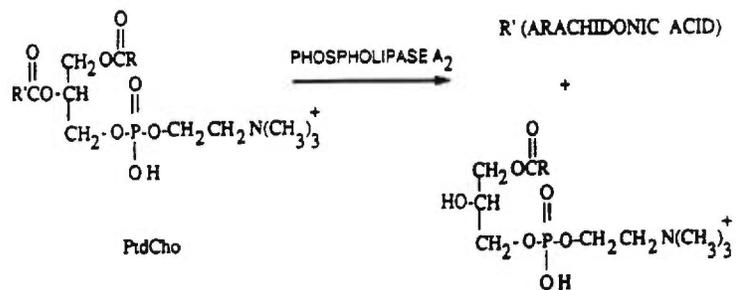


Figure 4. La mobilisation de l'acide arachidonique (modifiée de Smith et coll., 1991)

3.2.1 L'activité oxygénase

Suite à la libération de l'acide arachidonique des phosphoglycérines, la cyclooxygénase va transformer l'acide arachidonique en PGG₂ en présence de deux molécules d'oxygène. Cette étape débute par l'attraction d'un atome d'hydrogène en C-13 de l'acide arachidonique produisant un radical lipidique. Ce dernier réagit alors rapidement avec une molécule d'oxygène. Il y a ensuite une série de réarrangement de la molécule qui donne lieu à la formation d'un peroxyde bicyclique avec les chaînes latérales orientées *trans*. Finalement une deuxième molécule d'oxygène réagit avec un radical lipidique en C-15 et par la réduction d'un électron du radical 15-hydroperoxyl il y a formation de PGG₂ (Hamberg et Samuelsson, 1967). Il faut noter que la cyclooxygénase doit être activée par un peroxyde pour pouvoir exercer son action catalytique (Hemler et coll., 1979; Kulmacz et Lands, 1983).

3.2.2 L'activité peroxydase

Par une réduction simultanée de deux électrons sur un groupement hydroperoxyl de PGG₂ catalysée par l'activité peroxydase, il y a une formation de PGH₂ (Smith et coll., 1991). D'ailleurs, cette activité peroxydase a une grande affinité pour les hydroperoxydes provenant des acides gras tandis qu'elle est beaucoup moins active envers le H₂O₂ et presque inactive avec les hydroperoxydes tertiaires comme l'hydroperoxyde de cumène et le *t*-butyl-hydroperoxyde (Ohki et coll., 1979; Kulmacz et Lands, 1983). L'activité peroxydase de la PGH synthase possède des propriétés spectrales et catalytiques semblables à d'autres peroxydases

dépendantes d'un groupement hème tels que la catalase, le cytochrome c peroxydase et la peroxydase du raifort (Yamazaki, 1974; Dunford et Stillman, 1976).

La PGH synthase existe sous deux formes. La PGH synthase-1 est exprimée de façon continue dans presque toutes les cellules de l'organisme (Williams et DuBois, 1996). La PGH synthase-2 est exprimée dans certaines cellules à la suite d'une stimulation par différents stimuli (Herschman, 1996). La PGH synthase-2 est exprimée dans les macrophages, les monocytes, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, les neurones du système nerveux central, les ostéoblastes et les cellules du système reproducteur féminin (Herschman, 1996). Plusieurs stimuli extracellulaires et intracellulaires peuvent induire l'expression de la PGH synthase-2 comme les mitogènes, les cytokines et les promoteurs tumoraux, les facteurs de croissance ainsi que l'activité synaptique (Herschman, 1996; Williams et DuBois, 1996). La PGH synthase-1 est située principalement sur le réticulum endoplasmique alors que la PGH synthase-2 est située sur le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire (Morita et coll., 1995). Par conséquent, la distribution des prostaglandines métabolisées par ces deux enzymes sera divisée; les prostaglandines formées par la PGH synthase-2 seront plutôt distribuées dans le compartiment nucléaire de la cellule pour moduler la transcription de certains gènes ciblés (Williams et DuBois, 1996). Le fait que les deux PGH synthases soient localisées différemment expliquerait qu'ils ont un rôle physiologique distinct d'où l'importance d'avoir deux PGH synthases (Morita et coll., 1995).

3.3 La thromboxane synthase

Par l'action de la thromboxane synthase sur le PGH_2 , il y a formation du thromboxane A_2 . La réaction débute par la formation d'un oxygène électropositif en C-11 suivi d'une séparation d'un groupement peroxyde (Pace-Asciak et Smith, 1983). La formation du thromboxane A_2 est souvent accompagné d'une production de malondialdéhydes (MDA) et d'acides gras hydroxyls (HHTrE) (Smith et coll., 1991). La thromboxane synthase serait une enzyme possédant les caractéristiques du cytochrome P_{450} (Ullrich et Haurand, 1983). La thromboxane synthase se retrouve principalement dans les plaquettes, les poumons et les macrophages (Hamberg et coll., 1975; Smith, 1987). La demi-vie du thromboxane A_2 est d'environ 30 secondes à 37°C et il est rapidement hydrolysé en son métabolite stable, le thromboxane B_2 (Smith et coll., 1991).

3.4 Les effets physiologiques du thromboxane A_2

Une fois qu'il est formé, le thromboxane A_2 va agir localement: soit en stimulant la cellule qui l'a produite (façon autocrine), soit en stimulant les cellules avoisinantes (façon paracrine). Le thromboxane A_2 exerce ses effets physiologiques via son récepteur TP. Il produit une constriction des vaisseaux sanguins et il est un puissant stimulateur de l'agrégation plaquettaire et de la sécrétion de granules plaquettaires (Smith et coll., 1991).

4. L'endothéline

Il y a plusieurs évidences qui nous laisse croire que l'endothéline (ET) pourrait jouer un rôle dans l'effet du 8-iso-PGF_{2α} sur les vaisseaux sanguins rétiniens. Au cours de cette section, il y aura donc une description des trois types d'ET, de leurs récepteurs, ainsi que des effets physiologiques de l'ET-1 puisqu'elle est la plus susceptible d'être impliquée dans l'effet du 8-iso-PGF_{2α}.

4.1 Les trois types d'endothélines

Les endothélines sont des peptides de 21 acides aminés synthétisés par les cellules endothéliales et d'autres tissus et organes. Il existe trois types d'endothéline: ET-1, ET-2, ET-3 qui sont synthétisés à partir de trois gènes distincts (Inoue et coll., 1989a,b). Les trois types d'ET sont synthétisés à partir des préproET qui sous l'activité d'une endopeptidase sont réduits à des propeptides nommés "big ET". Par la suite, les big ET subissent une coupure par l'enzyme de conversion de l'ET (ECE) pour donner finalement les trois types d'endothélines (Rubanyi et Polokoff, 1994). Leur production semble être principalement contrôlée au niveau de la transcription de l'ARN messenger (Yanagisawa et coll., 1988).

4.1.1 L'endothéline-1

Parmi les trois types d'ET, l'endothéline-1 est la seule qui est synthétisée par les cellules endothéliales. C'est la plus puissante substance endogène connue pour induire une constriction des vaisseaux sanguins (Pollock et coll., 1995). L'ET-1 est aussi synthétisée par les cellules de muscles lisses vasculaires, les neurones, les

astrocytes, les cellules de l'endomètre, les hépatocytes, les cellules de Sertoli et les cellules épithéliales des glandes mammaires (Simonson, 1993; Rubanyi et Polokoff, 1994; Levin, 1995). Plusieurs stimuli peuvent induire la transcription de l'ARN messager de l'ET-1 tels que l'hypoxie, l'ischémie et le débit sanguin pulsatile (Levin, 1995).

4.1.2 L'endothéline-2

L'endothéline-2 est synthétisée principalement dans l'intestin et les reins. Le myocarde, le placenta et l'utérus produisent également en petite quantité de l'endothéline-2. Par comparaison avec l'endothéline-1, l'endothéline-2 n'a pas une fonction physiologique qui lui est propre (Levin, 1995).

4.1.3 L'endothéline-3

L'endothéline-3 est présente dans le plasma mais on ne connaît pas la(les) source(s) responsable(s) de sa formation. Elle est présente en forte concentration dans le cerveau, ce qui nous laisse croire qu'elle pourrait jouer un rôle important dans le développement et la prolifération des neurones et des astrocytes. Elle est également présente dans les poumons, les reins ainsi que dans l'appareil gastro-intestinal (Levin, 1995).

4.2 Les récepteurs de l'endothéline

Les trois types d'endothéline se lient à deux récepteurs: ET_A et ET_B présents chez les mammifères. Ces récepteurs sont associés à une protéine G. Il existerait un

troisième type de récepteur (ET_C), mais il n'y a aucune preuve moléculaire de sa présence chez les mammifères (Pollock et coll., 1995).

4.2.1 Le récepteur ET_A

L'affinité du récepteur ET_A pour les trois types d'ET est: ET-1 ≥ ET-2 > ET-3 (Rubanyi et Polokoff, 1994). Il est principalement situé sur les cellules de muscles lisses vasculaires et les myocytes cardiaques (Levin, 1995). Dans l'oeil, il a été démontré que le récepteur ET_A semble être le principal récepteur de l'endothéline présent sur les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens. (MacCumber et D'Anna, 1994; McDonald et coll., 1996). Ce récepteur médie principalement la vasoconstriction induite par l'ET-1 bien que le récepteur ET_B pourrait contribuer à cet effet constricteur dans certains lits vasculaires (Rubanyi et Polokoff, 1994; Levin, 1995).

4.2.2 Le récepteur ET_B

Le récepteur ET_B possède une affinité similaire pour les trois types d'ET (Rubanyi et Polokoff, 1994). Il est surtout présent sur les cellules endothéliales et de façon moindre, sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Levin, 1995). Il existerait deux types de récepteurs ET_B: ET_{B1} serait responsable d'une vasodilatation et le ET_{B2} d'une vasoconstriction (Pollock et coll., 1995).

4.3 Les effets physiologiques de l'endothéline-1

Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans l'effet constricteur de l'ET-1: une augmentation de la concentration du calcium cytosolique grâce à une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire et/ou à une mobilisation du calcium intracellulaire; une activation de la phospholipase C, menant à la formation de l'inositol triphosphate et de la diacylglycéról; une activation de la protéine kinase C; et finalement à une activation des phospholipases A₂ et D ainsi qu'à une activation du métabolisme de l'acide arachidonique (Rubanyi et Polokoff, 1994).

À part une action directe sur la vasomotricité, l'ET-1 exerce plusieurs autres effets dont une constriction des muscles lisses non vasculaires, une prolifération cellulaire, des effets cardiaques ainsi qu'une stimulation et la libération d'hormones telles que la prostacycline, le thromboxane A₂ et le facteur natriurétique auriculaire (Reynolds et Mok, 1990; La et Reid, 1995).

5. Peroxydation et réactivité vasculaire

Les conséquences physiologiques d'un stress oxydatif sont importants et vont affecter presque tous les composants de l'organisme, dont les vaisseaux sanguins. Dans un premier temps, et pour bien comprendre le mécanisme de la réactivité vasculaire, il y aura une description des composants d'un vaisseau sanguin et de leurs rôles physiologiques. Par la suite, il sera question des effets de la peroxydation sur la réactivité vasculaire ainsi que des mécanismes possiblement impliqués.

5.1 Les composantes du vaisseau sanguin

Les vaisseaux sanguins sont composés de trois couches de tissus: l'endothélium qui se compose de cellules endothéliales tapisse la lumière du vaisseau sanguin, la couche moyenne est composée de cellules musculaires lisses et la couche externe se compose de tissu conjonctif, de petits vaisseaux sanguins et des faisceaux de nerfs périphériques. L'épaisseur des couches varie selon le type de vaisseau sanguin et l'endroit où il est situé.

Les cellules endothéliales n'accomplissent pas qu'une fonction structurale; elles produisent et sécrètent diverses substances qui vont faciliter le mouvement du sang, influencer la résistance vasculaire et assurer l'homéostasie (Schilling et Elliott, 1992). Les cellules musculaires lisses ont pour rôle de régler le diamètre de la lumière par un ajustement de leur degré de contraction grâce, entre autres, aux substances libérées par eux et l'endothélium.

La vasomotricité artérielle de l'organisme est modulée par le système nerveux sympathique à l'exception des artérioles de la rétine (Brown et Jampol, 1996). Ce sont les diverses substances sécrétées localement par les cellules endothéliales et musculaires ainsi que par le parenchyme de la rétine qui vont moduler le degré de contraction des artérioles rétiniennes selon les circonstances.

5.2 Les effets vasomoteurs lors d'une oxydation

Au cours d'un stress oxydatif, la dynamique des vaisseaux sanguins subit des changements. Les radicaux libres formés, incluant les peroxydes, vont influencer la résistance vasculaire et induire une modification du débit sanguin soit par une

vasoconstriction ou par une vasodilatation. Ces changements vasomoteurs dépendent du type de vaisseau sanguin touché, des radicaux libres et des peroxydes impliqués, de leur concentration, du tissu où se trouve le vaisseau sanguin touché et de l'espèce animale. Cependant, les mécanismes physiologiques par lesquels les radicaux libres et les peroxydes induisent leurs effets ne sont pas connus. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer les effets vasomoteurs des radicaux libres et des peroxydes.

5.3 Les mécanismes d'action possibles des peroxydes

5.3.1 La formation de prostaglandines

Les prostaglandines semblent être impliquées dans les effets vasomoteurs des peroxydes. Parmi les prostaglandines formées, il y a le TxA_2 (Tate et coll., 1984; Walsh et coll., 1993; Abran et coll., 1995b) et la prostacycline (PGI_2) (Harlan et Callahan, 1984; Leffler et coll., 1990; Schimke et coll., 1992; Abran et coll., 1995a). La réponse finale serait probablement déterminée par le ratio $\text{PGI}_2 / \text{TxA}_2$; s'il y a une plus grande production de TxA_2 il y aura une vasoconstriction et si la formation de PGI_2 est plus grande il y aura alors une vasodilatation. La production et la sécrétion de prostaglandines semblent se faire principalement dans les cellules endothéliales puisque la concentration de la PGH synthase est 20 fois plus grande dans les cellules endothéliales que dans les cellules musculaires (Smith, 1986). Les peroxydes et les radicaux libres stimulent la formation des prostaglandines selon deux voies majeures: une augmentation de la libération de l'acide arachidonique

(Gurtner et coll., 1983; Vane et coll., 1990) et la stimulation de la cyclooxygénase (Hemler et coll., 1979; Kulmacz et Lands, 1983). De façon moindre, la régulation de l'expression de la PGH synthase-2 pourrait aussi jouer un rôle dans la formation des prostaglandines par les radicaux libres et les peroxydes (Davidge et coll., 1993).

5.3.1.1 *La libération de l'acide arachidonique*: Les radicaux libres et les peroxydes stimulent la libération de l'acide arachidonique en augmentant l'activité de la phospholipase A₂ (Harlan et Callahan, 1984; Schimke et coll., 1992; Natarajan, 1995). Cependant, le mécanisme par lequel les peroxydes et les radicaux libres stimulent l'activité de la PLA₂ n'est pas très bien caractérisé. En fait, plusieurs mécanismes possibles sont proposés: une augmentation de la libération du calcium intracellulaire (Chakraborti et coll., 1989), la conversion de la PLA₂ inactive en sa forme active (DeHass et coll., 1968), une augmentation de l'activité de la calmoduline qui à son tour stimule l'activation de la PLA₂ (Chakraborti et coll., 1989), une activation de la protéine kinase C ainsi qu'une activation des tyrosines kinases (Natarajan, 1995). D'autre part, il a également été rapporté qu'une faible proportion de la libération de l'acide arachidonique pouvait être secondaire à une activation de la PLC par les hydroperoxydes (Shasby et coll., 1988; Chakraborti et coll., 1989).

5.3.1.2 *La stimulation de la cyclooxygénase*: Pour induire la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, la cyclooxygénase-1 a besoin d'être activés par des peroxydes (Hemler et coll., 1979; Kulmacz et Lands, 1983;

Williams et DuBois, 1996). Par ses réactions métaboliques, la cyclooxygénase-1 va, à son tour, former des peroxydes (Cook et Lands, 1975). Il semble donc y avoir un feed-back positif entre les peroxydes et la voie métabolique de la cyclooxygénase ce qui a été démontré dans la circulation rétinienne et choroïdienne chez le porcelet (Chemtob et coll., 1995). Par ailleurs, les peroxydes pourraient contrôler la formation des prostaglandines à un second niveau puisqu'ils peuvent inactiver la PGI₂ synthase dans les cellules endothéliales (Weiss et coll., 1979; Warso et Lands, 1983) ayant pour conséquence une plus grande production d'autres prostaglandines comme le TxA₂.

5.3.1.3 *La régulation de l'expression de la PGH synthase-2*: La synthèse des prostaglandines par la PGH synthase-2 est dépendente du degré d'expression de celle-ci. Récemment, des chercheurs ont découvert que le gène de la PGH synthase-2 est un "immediate-early gene" (Maier et coll., 1990) et qu'il possède des caractéristiques similaires aux proto-oncogènes *c-myc* and *c-fos* qui sont eux aussi des "immediate-early genes" (Smith et coll., 1991). Étant donné que les formes actives de l'oxygène peuvent induire l'expression de l'ARN messenger des proto-oncogènes *c-myc* and *c-fos* et que ces derniers peuvent stimuler la synthèse de l'ADN (Rao et Berk, 1992), il est possible qu'un stress oxydatif puisse induire l'expression de l'ARN messenger de la PGH synthase-2, d'où une augmentation de la synthèse des prostaglandines (Davidge et coll., 1993).

5.3.2 Modification de la concentration intracellulaire du calcium $[Ca^{2+}]_i$

Des changements dans la $[Ca^{2+}]_i$ vont moduler plusieurs fonctions dépendantes du calcium dont entre autres, l'activation de la PLA₂, et ainsi influencer la réactivité vasculaire. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas complètement caractérisés, les radicaux libres et les peroxydes provoquent une modification de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales qui semble se produire selon les processus suivants: une modification de l'entrée de calcium dans la cellule, une modification de la libération de calcium du réticulum endoplasmique (RE) et une perte de réponse à la suite d'une stimulation par un agoniste avec un maintien de la $[Ca^{2+}]_i$ élevée (Schilling et Elliott, 1992; Natarajan, 1995).

5.3.2.1 *Modification de l'entrée de calcium dans la cellule*: Des expériences ont démontré que le *tert*-butyl-hydroperoxyde (*t*-BOOH), inhibe l'entrée de calcium induite par la bradykinine dans les cellules endothéliales d'aorte pulmonaire bovine (Elliott et coll., 1989). Le mécanisme par lequel le *t*-BOOH inhibe cette entrée de calcium n'est pas connu. Une modification des canaux responsables de l'entrée de calcium pourrait expliquer cette inhibition (Schilling et Elliott., 1992). D'autre part, il a été démontré que le H₂O₂ stimule l'entrée de calcium suite à une stimulation par l'ATP (Doan et coll., 1994). Il a également été démontré que les peroxydes peuvent stimuler un canal calcique voltage dépendant contribuant ainsi à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Hirosumi et coll., 1988).

5.3.2.2 *Modification du calcium provenant du RE*: Le H_2O_2 stimule la libération du calcium provenant du RE sensible à l'Ins(1,4,5) P_3 (Doan et coll., 1994). Par contre, suite à une stimulation par un agoniste, il y a une inhibition par le *t*-BOOH de la libération de calcium du RE qui semble être reliée à une modification des étapes menant à l'activation du canal calcique sensible à l'Ins(1,4,5) P_3 situé sur le RE (Schilling et Elliott, 1992). Cette inhibition pourrait également être associée à une réduction du calcium contenu dans le RE (Schilling et Elliott, 1992). Les Ca^{2+} -ATPases ont pour fonction de rétablir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'inhibition des Ca^{2+} -ATPases par les peroxydes causerait alors une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Grover et coll., 1992; Schilling et Elliott, 1992). Une oxydation des groupements sulfhydryls qui composent les Ca^{2+} -ATPases expliquerait leur inactivation par les radicaux libres et les peroxydes (Jones et coll., 1983).

5.3.2.3 *Une perte de réponse et un maintien élevé de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$* : Au cours d'une exposition prolongée au *t*-BOOH, il y a une augmentation continue de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et lorsqu'il y a une stimulation par un agoniste, il n'y a aucune élévation additionnelle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Schilling et Elliott, 1992). Par ailleurs, la cellule est toujours capable de maintenir un gradient de calcium élevé entre le cytosol et le milieu extracellulaire démontrant aucune perte d'intégrité membranaire. Cependant, il y a une perte élevée d'ions K^+ de la cellule qui se fait probablement par les canaux potassiques calcium dépendant (Schilling et Elliott, 1992). Le *t*-BOOH modulerait également l'activité des pompes Na^+ - K^+ -ATPases et des cotransporteurs Na^+ - K^+ (Elliott et coll., 1992). Finalement le stress oxydatif sévère serait associé à une

activation d'un canal cationique non-sélectif qui pourrait aussi contribuer à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Elliott et coll., 1991).

D'autres mécanismes ont également été suggérés pour expliquer l'effet vasomoteur des radicaux libres et des peroxydes. Certains ont proposé une activation de la guanylate cyclase soit via la formation d'oxyde nitrique ou soit par le métabolisme des peroxydes par la catalase (Wolin et coll., 1989). Par contre, d'autres études ont démontré que les radicaux libres pourraient inactiver l'oxyde nitrique augmentant ainsi l'effet constricteur des radicaux libres (Rubanyi et Vanhoutte, 1986). L'activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP a également été suggérée pour expliquer la vasodilatation des artérioles cérébrales par le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite (Wei et coll., 1996). Par contre, la vasoconstriction engendrée par un agoniste après stimulation par les hydroperoxydes lipidiques semblerait être produite par un effet direct des peroxydes sur le muscle lisse (Hubel et coll., 1993). Finalement, les mécanismes d'action des peroxydes sur la vasomotricité semblent différés selon le tissu et/ou l'espèce animale.

Les effets de la peroxydation sur la réactivité vasculaire peuvent donc se résumer à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ menant à une activation de la PLA_2 qui contribue, à son tour, à la formation de prostanoides dont le thromboxane A_2 . Cependant, la cascade des événements qui précède l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et la formation du thromboxane A_2 n'est pas très bien compris. Étant donné que les isoprostanes sont produits au cours d'une peroxydation, ils pourraient être impliqués

dans cette série d'événements contribuant ainsi à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Nous avons donc entrepris l'étude des mécanismes d'action des isoprostanes sur les vaisseaux sanguins dans un tissu particulièrement susceptible à la peroxydation: la rétine.

II. HYPOTHÈSE ET BUTS

L'hypothèse:

Plusieurs maladies et pathologies, dont la rétinopathie du prématuré et diabétique, sont associées à une formation de radicaux libres suite à une oxydation. Dans la rétine, il a été démontré qu'au cours d'une oxydation, l'hémodynamie des vaisseaux sanguins est modifiée au point de causer une forte vasoconstriction. Le thromboxane A_2 semble être impliqué dans cette constriction mais la cascade des événements menant à sa formation demeure obscure. Par ailleurs, nous savons que la peroxydation entraîne une augmentation du calcium cytosolique dans les cellules vasculaires. Récemment on a découvert de nouveaux produits de peroxydation, les isoprostanes, qui causent une vasoconstriction. Il a été démontré que les isoprostane de type F_2 peuvent stimuler la sécrétion de l'endothéline-1. Cependant, on ne connaît pas le mécanisme par lequel les isoprostanes agissent.

Nous proposons donc que le 8-iso-PGF_{2α}, un isoprostane de type F_2 , causera une vasoconstriction des vaisseaux sanguins de la rétine par la libération de thromboxane A_2 et d'endothéline-1 via possiblement un récepteur médiant l'entrée de calcium.

Les buts sont:

- 1) Étudier les propriétés vasomotrices du 8-iso-PGF_{2α} sur les artères de la rétine chez des porcelets nouveau-nés (âgés de un à trois jours).
- 2) Déterminer le récepteur sur lequel le 8-iso-PGF_{2α} agit.
- 3) Etablir le rôle du thromboxane A₂ et de l'endothéline-1 dans l'effet du 8-iso-PGF_{2α}.
- 4) Déterminer si le 8-iso-PGF_{2α} modifie la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules des vaisseaux sanguins de la rétine et si c'est le cas, de savoir quels sont les canaux calciques impliqués.

III. ARTICLE INTITULÉ:

**A novel mechanism for vasoconstrictor action of
8-iso prostaglandin F_{2α} on retinal vessels**

Article soumis à American Journal of Physiology
et accepté avec révisions

A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-iso prostaglandin F_{2α} on retinal vessels

Isabelle Lahaie¹, Pierre Hardy¹, Haroutioun Hasséssian², Pierre Asselin¹, Guillermina Almazan³, Daya R. Varma³, Jason D. Morrow⁴, L. Jackson Roberts II⁴, Sylvain Chemtob¹

¹Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research Center of Hôpital Ste Justine, University of Montréal, ²Department of Ophthalmology, Guy-Bernier Research Center of Hôpital Maisonneuve-Rosemont, University of Montréal, ³Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, Canada, and ⁴Departments of Pharmacology and Medicine, Vanderbilt University, Nashville, TN USA 37232.

abbreviated title: Mechanism of 8-iso-PGF_{2α} actions in retina

Correspondence to:

Dr Sylvain Chemtob, MD, PhD, FRCPC

Departments of Pediatrics and Pharmacology

Research Center of Hôpital Ste Justine

3175, Chemin Côte Ste Catherine

Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Tel: (514) 345-4691

Fax: (514) 345-4801

E-mail: chemtobs@ere.umontreal.ca

1.1 Abstract

Oxidant stress, involved in various retinal disorders, leads to production of 8-iso-PGF_{2α}. This study was conducted to characterize the effects of 8-iso-PGF_{2α} on retinal vasculature using video-imaging technique on *ex vivo* eye-cup preparations from piglets. 8-Iso-PGF_{2α} potently contracted retinal vessels in a concentration-dependent manner with an EC₅₀ value of 5.9 ± 0.5 nM. The vasoconstrictor effects of 8-iso-PGF_{2α} were completely antagonized by the thromboxane synthase blocker CGS12970, the thromboxane A₂ receptor antagonist L-670,596, the putative inhibitor of non-voltage-dependent receptor-operated calcium pathway SK&F96365; constrictor effects of 8-iso-PGF_{2α} were also partially inhibited by the endothelin ET_A receptor antagonist, BQ-123, and an inhibitor of endothelin converting enzyme, phosphoramidon, but was negligibly affected by the L-type voltage-gated calcium channel blocker nifedipine and the ET_B receptor antagonist, BQ-788. Consistent with these observations, 8-iso-PGF_{2α} elicited an increase in endothelin-1 release from retinal preparations, which was inhibited by pretreatment with phosphoramidon and markedly reduced by SK&F96365. 8-Iso-PGF_{2α} also increased thromboxane A₂ production in the retina and cultured endothelial cells, but not on retinovascular smooth muscle cells; these effects of 8-iso-PGF_{2α} were blocked by CGS12970, SK&F96365 and EGTA but not by nifedipine. Since endothelin-1 and thromboxane A₂ release are calcium-dependent processes intracellular calcium flux was studied. 8-Iso-PGF_{2α} increased calcium transients in cultured retinovascular endothelial cells, which was inhibited by SK&F96365 and EGTA but not by nifedipine; in contrast, 8-

iso-PGF_{2α} did not increase calcium signals in smooth muscle cells. Conversely, U46619 stimulated a rise in calcium transients in smooth muscle but not endothelial cells. Finally, incubation of retinas with H₂O₂ and FeCl₂ as well as exposure of piglets to anoxia followed by reoxygenation stimulated formation of 8-iso-PGF_{2α} in retina. It is concluded that 8-iso-PGF_{2α}-induced retinal vasoconstriction is mediated by a release of thromboxane A₂ and to a lesser extent endothelin-1, via a mechanism which involves calcium entry into cells possibly through receptor-operated calcium channels. The retinal vasoconstrictor effects of 8-isoprostanes might play a role in the genesis of ischemic retinopathies, such as retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy.

Key Words: free radicals, peroxidation, calcium influx, thromboxane, endothelin

1.2 Introduction

Oxidative stress leads to the formation of reactive oxygen species which have been implicated in numerous diseases (42). One of the main targets of oxygen free radicals is unsaturated fatty acids from cellular membranes leading to peroxidation and cellular injury (42). In the retina, peroxidation appears to play an important role in the genesis of various disorders such as ischemic retinopathies, most notably retinopathy of prematurity and diabetes (37, 45, 46). Oxidant stress can alter retinal hemodynamics (7) by causing marked vasoconstriction which is sustained in the newborn (1, 3, 7). We and other investigators have shown that reactive oxygen species stimulate the cyclooxygenase pathway to produce thromboxane A₂ which appears to be involved in this constriction (3, 7, 26, 44). However, the cascade of events leading to this production of thromboxane A₂ is not known.

A series of prostaglandin-like compounds, termed isoprostanes, have lately been shown to be produced during oxidant stresses *in vivo* and *in vitro* in animals and humans (35, 36). Isoprostanes are produced independently of the cyclooxygenase pathway and their formation results from oxidation of the ubiquitous arachidonic acid by free radicals (35, 36). In contrast to prostaglandins formed by cyclooxygenase, the isoprostanes are formed *in situ* on esterified phospholipids and are released in free form presumably by phospholipases (31). Isoprostanes are stable products and their formation increases markedly in animal models subjected to free radical injury (27, 31, 33, 40).

8-Iso-PGF_{2α} which is an abundantly produced isoprostane *in vivo* is a highly potent renal vasoconstrictor with an EC₅₀ in the low nanomolar range (33, 43). It has

also been shown that 8-iso-PGF_{2α} constricts bronchioles, as well as coronary, pulmonary and cerebral vessels, which can be inhibited by thromboxane A₂ receptor antagonists (5, 19, 23, 24). However, binding studies suggest that 8-iso-PGF_{2α} does not directly interact with the thromboxane A₂ receptor (12, 38, 47). 8-Iso-PGF_{2α} has also been shown to stimulate endothelin-1 release from aortic endothelial cells, but the mechanism of endothelin release is not known (13). Altogether, the potency and efficacy of 8-iso-PGF_{2α} in different tissues varies markedly (5, 19, 23, 24, 33, 43), and these cannot be extrapolated to other tissues such as the retina. Moreover, the mechanism of isoprostane action remains unclear. Therefore, we investigated in this study the effects of 8-iso-PGF_{2α} on retinal vasculature of piglets, and propose a new mechanism of action for 8-iso-PGF_{2α}.

1.3 Materials and Methods

Animals were used according to a protocol of the Animal Care Committee of Hôpital Sainte Justine in accordance with the principles of the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* of the Canadian Council on Animal Care.

Tissue Preparation

Piglets (1-3 days old) were obtained from Fermes Ménard Inc (L'Ange-Gardien, Qc, Canada). Animals were anesthetized with halothane (2.5%) and sacrificed with an intracardiac injection of pentobarbital sodium (120 mg/kg). The eyes were removed and placed immediately in ice-cold Krebs buffer (pH 7.4) of the following composition (mM): NaCl 120, KCl 4.5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.0, NaHCO₃ 27, KH₂PO₄ 1.0, and glucose 10; 1.5 U ml/ heparin was added to the buffer. For biochemical measurements, tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Vasomotor response to 8-iso-PGF_{2α} and other agents

Eyecup preparations were used to study the response of the relatively undisturbed retinal vasculature as previously described (1, 3, 7, 16). In brief, a circular incision was made 3-4 mm posterior to the ora serrata to remove the anterior segment and vitreous body with minimal handling of the retina. The remaining eyecup was fixed with pins to a wax base in a 20 ml tissue bath containing Krebs buffer (pH 7.35-7.45) equilibrated with 21% O₂ and 5% CO₂ and maintained at 37°C (3). The preparations were allowed to stabilize for 30 to 45 min during which they were rinsed 2 to 3 times with fresh buffer.

Cumulative concentration-response curves to 8-iso-PGF_{2α}, the TxA₂ mimetic U46619 and endothelin-1 were constructed on nonperfused primary arterioles (100-200 μm diameter). The outer vessel diameter was recorded with a video camera mounted on a dissecting microscope (Zeiss M-400) and responses were quantified by a digital image analyzer (Sigma Scan software, Jandel Scientific, Corte Madera, CA, U.S.A.). Vascular diameter was recorded before and 10 min following topical application of 8-iso-PGF_{2α}. Each measurement was repeated three times and had a variability of <1%. The effects of 8-iso-PGF_{2α} were also studied 20 min after pretreatment with the following agents at concentrations shown to inhibit desired targets: L-670,596 (100 nM), a thromboxane A₂ receptor antagonist (11), CGS12970 (1 μM), a thromboxane synthase inhibitor, (4), phosphoramidon (10 μM), an endothelin converting enzyme inhibitor (10), BQ-123 (1 μM), a selective ET_A receptor antagonist (21), BQ-788 (25 μM), an ET_B-selective antagonist (22), nifedipine (1-5 μM), an L-type voltage-gated calcium channel blocker (14), SK&F96365 (20 μM), a calcium entry blocker (and putative inhibitor of non-voltage-dependent receptor-mediated calcium entry) (28, 29), or econazole (10 μM), a calcium influx blocker as well (17).

Retinal microvascular endothelial and smooth muscle cell cultures

For primary cultures of retinovascular endothelial and smooth muscle cells, retinas were collected in HBSS buffer (pH 7.4) of the following composition (mM): KCl 2.8, KH₂PO₄ 0.2, NaCl 68, Na₂HPO₄ 0.16, glucose 2.8, Hepes 100, and Phenol red 0.01. Retinal microvessels were prepared as previously described (2). Briefly,

retinas were gently homogenized with a Wheaton pestle in 5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) containing (mM): acetylsalicylic acid 1.1, EGTA 0.5, benzamidine 1, PMSF 0.1; 100 μ g/ml soybean trypsin inhibitor was added to the buffer. The homogenate was mixed with Ficol 400 (40%) at a 1:1 vol/vol ratio and centrifuged at 20,000 x g for 20 min at 4°C. The pellet, which contains the microvessels, was washed in HBSS three times. Purity of the microvessel preparation was confirmed by high power microscopy and by gamma-glutamyl transpeptidase activity which was higher in vasculature (5.6-6.1 mU/mg protein) than in neural parenchyma (0.3-0.35 mU/mg protein) (2).

Microvessels were resuspended in selective medium: endothelial growth medium for endothelial cells or smooth muscle growth medium for smooth muscle cells (Clonetics, CA, U.S.A.) containing gentamicin (5 μ g/ml), kanamycin (20 μ g/ml) and nystatin (10 U/ml) and placed in a humidified atmosphere with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37°C for three to four passages. Confluent endothelial and smooth muscle cells were trypsinized, centrifuged, reseeded in culture flasks and subcultured. Cell viability was verified by trypan blue exclusion and was >90%. Endothelial cells were identified by their cobblestone morphology at confluence, positive reactivity to mouse monoclonal anti-Factor VIII antibody, and negative reactivity to smooth muscle specific α -actin and glial fibrillary acidic protein antibodies. Smooth muscle cells were recognized by their spindle-shape appearance, positive reactivity to smooth muscle specific α -actin antibody, and negative reactivity to mouse monoclonal anti-Factor VIII antibody and glial fibrillary acidic protein antibodies. Confluent cultures

of endothelial and smooth muscle cells of third or four passage were used for experiments.

Immunostaining for a mouse monoclonal anti-Factor VIII antibody, smooth muscle specific α -actin and glial fibrillary acidic protein was performed by fixing cells on cover slips with acetone for 10 s and subsequently rehydrated in phosphate buffer saline (PBS) for 20 min. The cells were then washed for 15 min in PBS containing 0.2% bovine serum albumin, 5% goat serum and 0.2% Triton X-100. Fixed cells were incubated for 60 min with a mouse monoclonal anti-Factor VIII antibody, smooth muscle α -actin or glial fibrillary acidic protein antibody (1:50) diluted in PBS containing 10% fetal calf serum and 5% goat serum with 0.1% Triton X-100. After 5 washes in PBS, the secondary antibody fluorescein [FITC]-conjugated goat anti-rabbit (1:100) was applied under the same conditions, and cells were washed again in PBS and water. Coverslips were then mounted in Immuno-mount and examined under an epifluorescent microscope (Leitz Diaplan).

Thromboxane B₂ and endothelin-1 assay

The effects of 8-iso-PGF_{2 α} on thromboxane A₂ and endothelin-1 production were also studied. Retinas were stimulated with 8-iso-PGF_{2 α} (1 μ M) for 15 min without or with 20 min pretreatment with CGS12970 (1 μ M), BQ-123 (1 μ M), phosphoramidon (10 μ M), SK&F96365 (20 μ M), nifedipine (5 μ M), EGTA (5 mM) or saline and reaction was stopped with liquid N₂. Thromboxane A₂ was determined as previously described (3, 16). Briefly, retinas were suspended in a cold buffer (pH 7.4) of the following composition (mM): Tris HCl 5, acetylsalicylic acid 1.1, EDTA 1, and

butyl hydroxytoluene 0.045. The tissue was homogenized with a tissue grinder (30,000 rpm, 2 x 30 s); proteins were measured on an aliquot by dye-binding method (6). The homogenate was centrifuged at 1,000 x g for 10 min at 4°C to remove undisrupted cells and nuclei. The supernatant was rehomogenized and then centrifuged at 28,000 x g for 45 min at 4°C to remove membranes and enhance extraction of prostanoids on octadecylsilyl silica columns. The supernatant was dissolved in 100% ethanol and acidified to pH 3 with glacial acetic acid. The samples were applied to the octadecylsilyl silica columns (>97% efficiency) pre-activated with methanol and distilled water and then washed with 15% aqueous ethanol followed by petroleum ether. Prostanoids were subsequently eluted with methyl formate and evaporated under vacuum to dryness. TxB₂ (stable TxA₂ metabolite) was measured by radioimmunoassay as previously described (3, 16). The recovery of TxA₂ was > 97 % and the interassay variability was < 5 %. Using a similar procedure, TxB₂ levels were also measured in the culture media of retinovascular endothelial cells and smooth muscle cells stimulated with 8-iso-PGF_{2α} (1 μM) for 15 min in the absence or the presence of SK&F96365 (20 μM) or nifedipine (5 μM).

For endothelin-1 measurements, retinas were homogenized using a small Potter tissue homogenizer in 2 ml ice-cold Krebs buffer containing aprotinin (500 KIU/ml). The homogenate was centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4°C. To the supernatant was added an equal volume of 1% trifluoroacetic acid and then centrifuged at 10,000 x g for 20 min at 4°C. The resulting supernatant was applied to the octadecylsilyl silica columns preactivated with 100% acetonitrile and 1% trifluoroacetic acid. The columns were washed with 1% trifluoroacetic acid and

samples were eluted with 60% acetonitrile in 1% trifluoroacetic acid. Eluates were evaporated under vacuum to dryness. Endothelin-1 was measured by enzyme immunoassay technique using a commercial kit (Peninsula Labs, CA, U.S.A.); specificity of the assay for endothelin-1, 2 and 3 was 100%, 7% and 7%, respectively. The intra- and inter-assay variations were < 5%.

Intracellular calcium measurements

Intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) was measured using the fluorescent indicator fura-2/AM. Confluent endothelial cells and smooth muscle cells were trypsinized in a solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA for 2 min after which 5 ml HBSS was added. Cells were centrifuged at 250 x g for 10 min and resuspended in a buffer containing (mM): Hepes 20, D-glucose 10, KCl 4.6, NaCl 118, and $CaCl_2$ 0.5, as well as 1% fetal bovine serum. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was >90%. Fura-2/AM (2 μ M) and 0.2% Pluronic F-127 were added to cell suspensions and incubated at 37°C for 30 min. Pluronic F-127 was used to improve loading of fura-2/AM into the cells. The loaded cells were then washed twice and resuspended in HBSS with Ca^{2+} (2.5 mM) and 1% fetal bovine serum with or without 15 min pretreatment with SK&F96365 (20 μ M), nifedipine (5 μ M) or EGTA (5 mM), followed by stimulation with 8-iso-PGF_{2 α} (1 μ M), ATP (1 μ M) or U46619 (1 μ M). The $[Ca^{2+}]_i$ was determined in 2 ml of fura-2-loaded cell suspension ($\sim 2 \times 10^6$ cells/ml) continuously stirred and measured by a spectrofluorometer LS 50 (Perkin Elmer, Beaconsfield, England) using excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 510 nm. Calibration of the fluorescent signal was determined on 2 ml cell

suspension by sequential addition of 0.2% Triton X-100 to obtain the maximal fluorescence ratio (R_{\max}) and to 5 mM EGTA plus 10 μ M of ionomycin to obtain the minimal fluorescence ratio (R_{\min}). Autofluorescence was determined by measuring fluorescence from nonloaded cells and subtracting it from the fluorescence produced by fura-2-loaded cells in order to calculate the fluorescence ratio R (340/380) corresponding to the values produced at 340 and 380 nm. The $[Ca^{2+}]_i$ was calculated from the equation of Grynkiewicz *et al* (15): $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R-R_{\min}) / (R_{\max}-R)] (S_{f2} / S_{b2})$, where K_d (224 nM) is the effective dissociation constant of the fura-2- Ca^{2+} complex and S_{f2} / S_{b2} the ratio of fluorescence intensity at wavelength 380 nm in the presence of EGTA and Triton X-100, respectively.

Measurement of 8-iso-PGF_{2 α} in isolated retina subjected to oxidation

Retinas were exposed *in vitro* to hydroxyl generating conditions with H_2O_2 (0.1 mM) and $FeCl_2$ (20 μ M) for 30 min, in the presence or absence of indomethacin (10 μ M). Extraction of isoprostanes was performed as described above for thromboxane A_2 . 8-Iso-PGF_{2 α} was measured by enzyme immunoassay technique using a commercial kit (Cayman Chemical, MI, U.S.A.). The specificity for the assay was 100% for 8-isoprostanes, 82% for 8-iso-PGF_{2 α} and 0.7% for 8-iso-PGE₂. The intra- and the inter-assay variability was < 5%.

Measurement of 8- iso-PGF_{2α} in retina of anesthetized piglets subjected to oxidant stress

Oxidant stress was produced *in vivo* by subjecting animals to asphyxia followed by reoxygenation as previously described (7). Piglets were anesthetized with 2% halothane for tracheostomy and catheterization of a femoral vein for drug injection. Animals were ventilated with air by means of a Harvard small animal respirator. Halothane was discontinued and immediately thereafter piglets were sedated with α -chloralose (50 mg/kg bolus followed by 10 mg/kg/h) and paralyzed with pancuronium (0.1 mg/kg twice). Animals were kept under a radiant warmer to keep body temperature at 38°C. After 1.5 h recovery from surgery piglets were asphyxiated by interrupting ventilation for 5 min. Ventilation was resumed normally for 45 min and animals were then sacrificed (pentobarbital sodium 120 mg/kg iv) and eyes were removed. Retinas were collected to measure 8-iso-PGF_{2α} as described above.

Chemicals

L-670,596 and CGS12970 were generous gifts from Merck-Frosst (Pointe-Claire, Qc, Canada) and Ciba-Geigy (Summit, NJ, U.S.A.), respectively. The following products were purchased: 8-iso-PGF_{2α}, 8-iso-PGF_{2α} enzyme immunoassay kit, and U46619 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, U.S.A.); acetylsalicylic acid, adenosine 5'-triphosphate, aprotinin, benzamidine, butylated hydroxytoluene, econazole, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), FeCl₂, H₂O₂, indomethacin, ionomycin,

nifedipine, N-(α -rhamnopyranosyloxy-hydroxyphosphinyl)-leu-trp (phosphoramidon), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), soybean trypsin inhibitor (type II-S), Triton X-100, and Tris(hydroxymethyl)aminomethane HCl (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A. Chemical Co); 1-[β -[3-(4-Methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazole hydrochloride (SK&F96365) (BioMol, Plymouth Meeting, PA, U.S.A.); endothelin-1 and cycro(-D-Trp-D-Asp(ONa)-Pro-D-Val-Leu) (BQ-123) (Research Biochem, Natick, MA, U.S.A.); N-*cis*-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-L- γ MeLeu-D-Trp(COOMe)-D-Nle-ONa (BQ-788), fura 2-AM, Pluronic F-127 (Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.); TxB₂ radioimmunoassay kit (Amersham, Oakville, ON, Canada); endothelin enzyme immunoassay kit (Peninsula, Belmont, CA, U.S.A.); endothelium and smooth muscle growth medium (Clonetics, CA, U.S.A.); mouse monoclonal anti-Factor VIII antibody, smooth muscle specific α -actin antibody and glial fibrillary acidic protein antibody (Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.); FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody, fetal calf serum, goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, U.S.A.); all other chemicals (Fisher Scientific, Montréal, Qc, Canada).

Data Analysis

Results were analyzed using Student's t test and a two-way ANOVA, factoring for concentrations and different treatments. Post-ANOVA comparisons among means were performed using the Tukey-Kramer method (41). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are presented as means \pm SE.

1.4 Results

Vasoconstrictor effects of 8-iso-PGF_{2α}, U46619 and endothelin-1 on retinal arterioles

8-Iso-PGF_{2α}, U46619 and endothelin-1, caused concentration-dependent constriction of retinal arterioles (Fig. 5A). Maximal efficacy of 8-iso-PGF_{2α} was nearly half that of U46619 and endothelin-1. The EC₅₀ of 8-iso-PGF_{2α}, U46619 and endothelin-1 were, 5.9 ± 0.5 nM, 159 ± 26 nM and 0.9 ± 0.7 nM, respectively.

Roles of thromboxane A₂ and endothelin-1 in 8-iso-PGF_{2α}-induced constriction of retinal arterioles

Retinal vasoconstriction to 8-iso-PGF_{2α} was markedly inhibited by the thromboxane A₂ receptor antagonist L-670,596 as well as by the thromboxane synthase inhibitor CGS12970 (Fig. 5B).

Vasoconstriction to 8-iso-PGF_{2α} was significantly reduced by the endothelin converting enzyme inhibitor phosphoramidon (10 μM) and similarly by the ET_A receptor blocker BQ-123 (1 μM) (Fig. 5C). The ET_B receptor blocker BQ-788 (even at high concentration, 25 μM) did not affect vasoconstriction to 8-iso-PGF_{2α}. Phosphoramidon (10 μM) effectively inhibited endothelin-1 formation (Fig. 6A), and BQ-123 (1 μM) fully prevented constriction in response to endothelin-1 (up to 10 nM).

Effects of calcium channel blockers on vasoconstriction produced by 8-iso-PGF_{2α}

Because thromboxane A₂ and endothelin-1 release were suspected to contribute to effects of 8-iso-PGF_{2α} (based on inhibition of constriction by CGS12970

and phosphoramidon), we speculated that calcium entry, which is required for the formation and release of these autacoids, may be involved in the action of 8-iso-PGF_{2α}. Since L-type voltage-gated calcium channels play a major role in the entry of calcium in smooth muscle and other cell types as well as in vascular contraction (18), their contribution in 8-iso-PGF_{2α} effect was tested using the selective blocker nifedipine. Nifedipine (1 μM) did not modify retinal vasoconstriction to 8-iso-PGF_{2α} (Fig. 5D); 5-fold higher concentrations of nifedipine also did not alter effects of 8-iso-PGF_{2α}, but virtually abolished constriction to KCl (20 mM). In contrast, the calcium entry blocker SK&F96365 fully inhibited vasoconstrictor response to 8-iso-PGF_{2α}. Econazole (10 μM), another non-voltage dependent calcium channel blocker (17), inhibited the constrictor effects of 8-iso-PGF_{2α} to an equal degree (data not shown) as SK&F96365.

Figure 5. Constrictor concentration-response curves to 8-iso-PGF_{2α}, the TxA₂ receptor mimetic U46619 and endothelin-1 on retinal arterioles of piglets in the absence (*A*) and presence of the TxA₂ synthase inhibitor CGS12970 (1 μM) and the TxA₂ receptor antagonist L-670,596 (100 nM) (*B*); the ET_A receptor antagonist BQ-123 (1 μM), the ET_B receptor antagonist BQ-788 (25 μM) and the endothelin converting enzyme inhibitor phosphoramidon (10 μM) (*C*); the L-type voltage-gated calcium channel blocker nifedipine (1 μM) and the putative receptor-mediated calcium channel blocker SK&F96365 (20 μM) (*D*). Data are means ± SE of 4-7 separate experiments. * $p < 0.05$ compared with effects of 8-iso-PGF_{2α} in the absence of antagonists (by two-way analysis of variance).

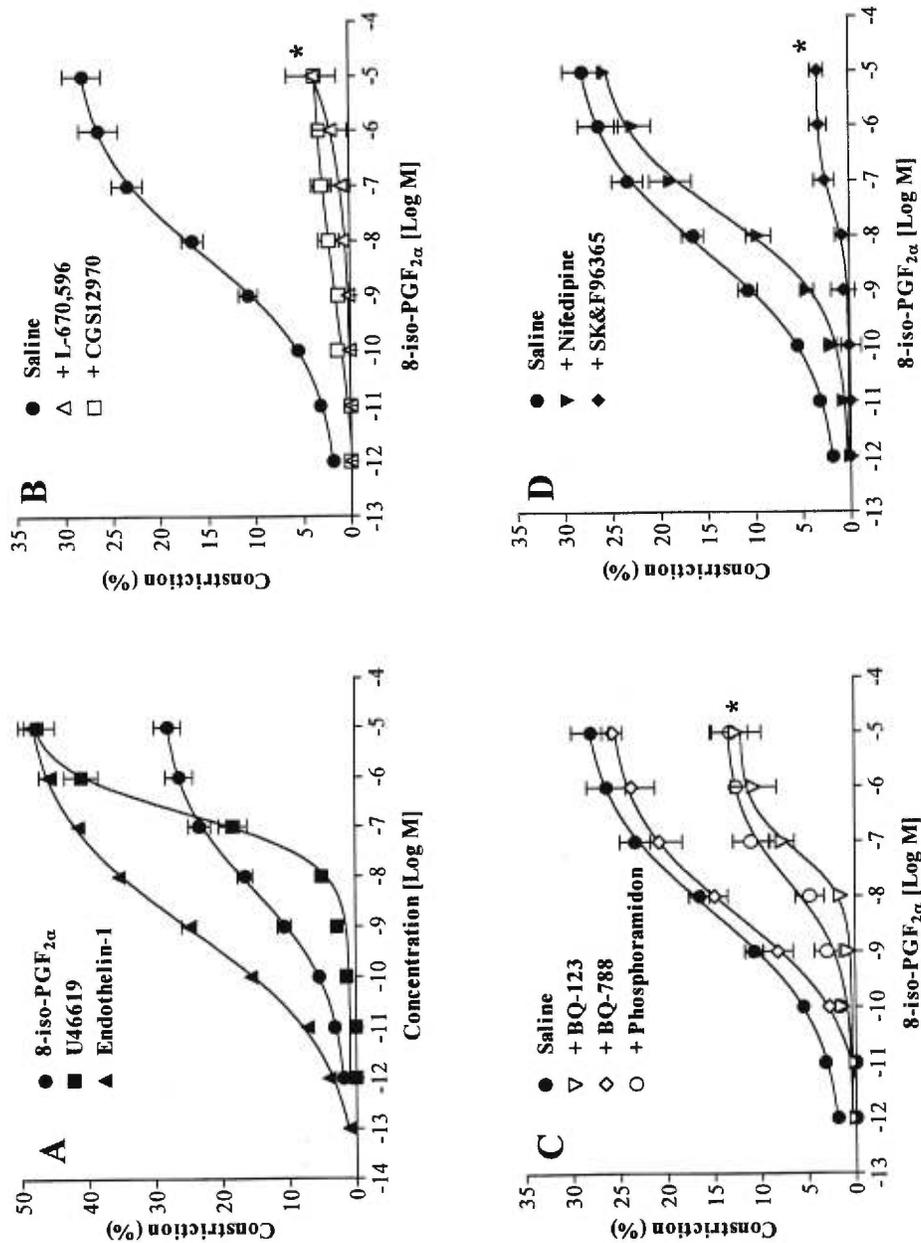


Figure 5. Concentration-response curves of 8-iso-PGF_{2α} on retinal arterioles of piglets in the absence and presence of different antagonists.

Effects of 8-iso-PGF_{2α} on thromboxane A₂ and endothelin-1 release

8-Iso-PGF_{2α} stimulated endothelin-1 release (Fig. 6A) from retina, which was inhibited by pretreatment with phosphoramidon and significantly reduced by SK&F96365. 8-Iso-PGF_{2α} also increased TxB₂ production (Fig. 6B) in retina; this effect was markedly diminished by the thromboxane synthase inhibitor CGS12970, by the calcium chelator EGTA, and by the calcium entry blocker SK&F96365. Basal (unstimulated) TxB₂ formation was not affected by SK&F96365 as previously shown (25), but was reduced by approximately 70% by CGS12970. 8-Iso-PGF_{2α}-induced TxB₂ production was slightly attenuated by BQ-123 (1 μM) and unaltered by nifedipine (5 μM) (Fig. 6B).

8-Iso-PGF_{2α} stimulated TxB₂ formation in cultured retinovascular endothelial cells, which was inhibited by SK&F96365 but not by nifedipine (Fig. 6C). In retinovascular smooth muscle cells basal TxB₂ formation was low (<3 pg/ 10⁶ cells/ 15 min) and was not affected by 8-iso-PGF_{2α}.

Figure 6. Effects of 8-iso-PGF_{2α} (1 μM) on endothelin-1 (*A*) and TxB₂ formation by retina (*B*) and cultured retinal endothelial cells (*C*). Tissues and cells were pretreated for 20 min with saline or inhibitors at the following concentrations (μM): CGS12970 1, BQ-123 1, phosphoramidon 10, SK&F96365 20, nifedipine 5, and EGTA 5000. Data are means ± SE of 4-6 experiments. * p < 0.05 compared with basal values; † p < 0.05 compared with values with saline (+ 8-iso-PGF_{2α}).

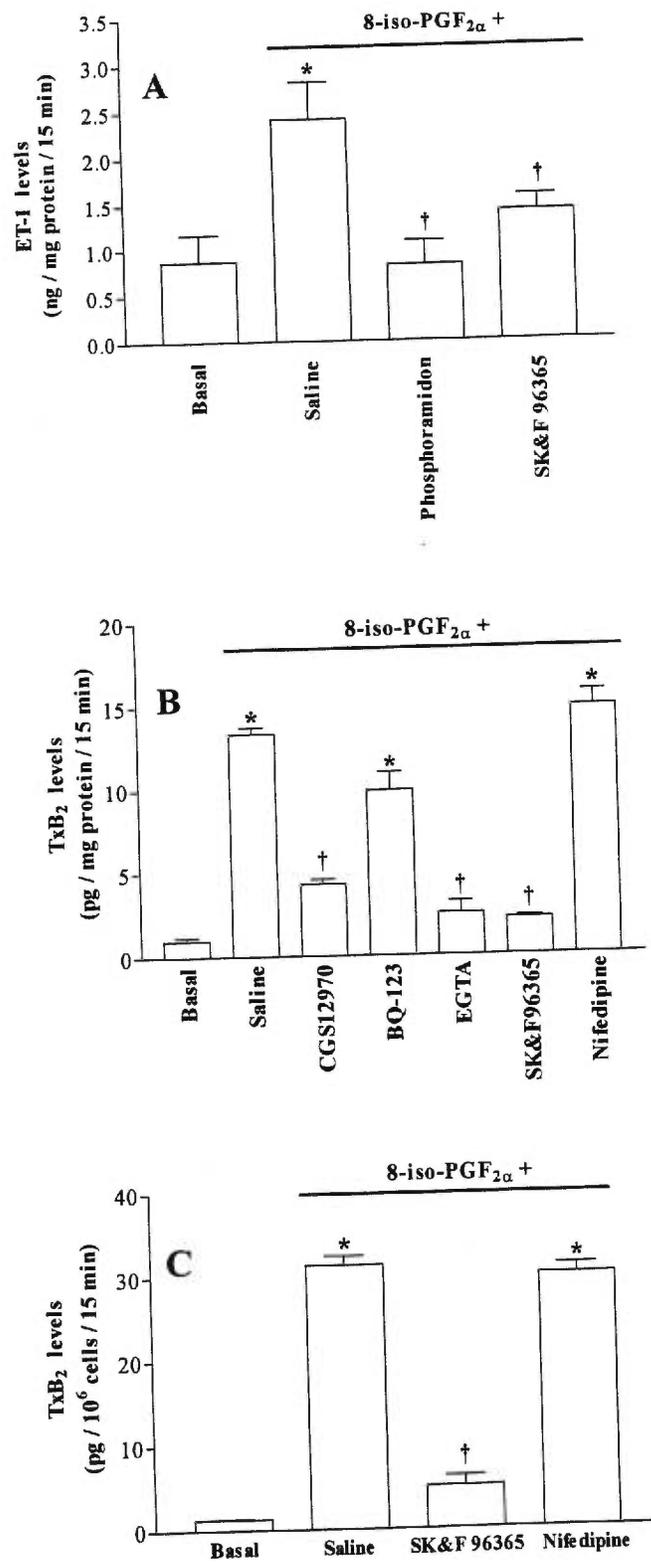


Figure 6. Effects of 8-iso-PGF_{2α} on endothelin-1 (A) and thromboxane B₂ formation by retina (B) and cultured retinal endothelial cells(C).

Effects of 8-iso-PGF_{2α} on intracellular calcium transients in endothelial and on smooth muscle cells from retinal vasculature

8-Iso-PGF_{2α} elicited an increase in intracellular calcium in endothelial cells (Fig. 7, *A* and *B*). This effect of 8-iso-PGF_{2α} on endothelial cells was not significantly affected by nifedipine, but was virtually abolished by SK&F96365, and annulled by EGTA and by the absence of extracellular calcium. However, 8-iso-PGF_{2α} did not cause an increase in intracellular calcium in smooth muscle cells, whereas ATP was effective (Fig. 7, *C* and *D*). Conversely, U46619 stimulated an increase in intracellular calcium in smooth muscle cells but not in endothelial cells (Fig. 7, *B*, *C* and *D*).

8-iso-PGF_{2α} formation in retina subjected to oxidation

Finally, generation of 8-iso-PGF_{2α} was verified in the retina after *in vitro* and *in vivo* oxidant stress. Incubation of retinas with H₂O₂ and FeCl₂ caused a marked increase in 8-iso-PGF_{2α} generation, which was not inhibited by indomethacin (Fig. 8*A*). An increase in 8-iso-PGF_{2α} concentrations was also detected in the retina of animals subjected to an asphyxic episode followed by reoxygenation (Fig. 8*B*).

Figure 7. Effects of 8-iso-PGF_{2α} and U46619 on intracellular calcium transients in endothelial and smooth muscle cells from retinal vasculature. Typical tracings and peak increases in intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) are presented in endothelial cells (*A* and *B*) and smooth muscle cells (*C* and *D*). Cells were pretreated for 15 min with SK&F96365 (20 μM), nifedipine (5 μM), EGTA (5 mM), or saline with or without extracellular calcium (2.5 mM), prior to the addition of 8-iso-PGF_{2α} (1 μM), ATP (1 μM) or U46619 (1 μM). Data are means ± SE of 4-6 experiments. † p < 0.01 compared with values with saline (+ 8-iso-PGF_{2α}).

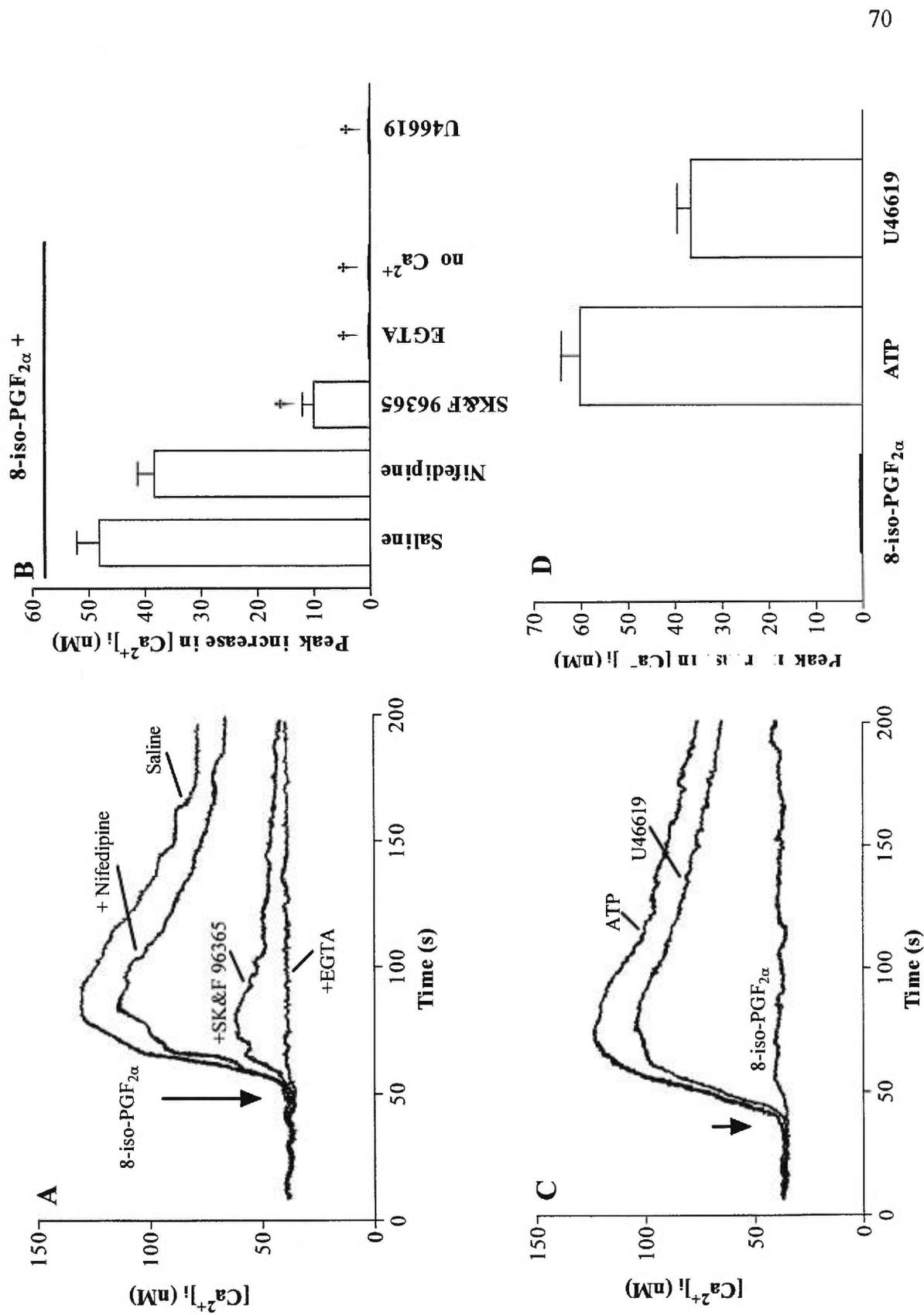


Figure 7. Effects of 8-iso-PGF_{2α} on intracellular calcium in endothelial cells (A and B) and smooth muscle cells (C and D) from retinal vasculature.

Figure 8. 8-Iso-PGF_{2α} synthesis in retina of piglets subjected to *in vitro* and *in vivo* oxidant stress. Retinas were incubated for 30 min with H₂O₂ (100 μM) and FeCl₂ (20 μM) with or without a 15 min pretreatment with indomethacin (10 μM) (*A*). 8-iso-PGF_{2α} levels in retinas of piglets subjected to 5 min asphyxic episode followed by 45 min of reoxygenation (*B*). Data are means ± SE of 4 experiments. * p < 0.01 compared with control or pre-asphyxia values.

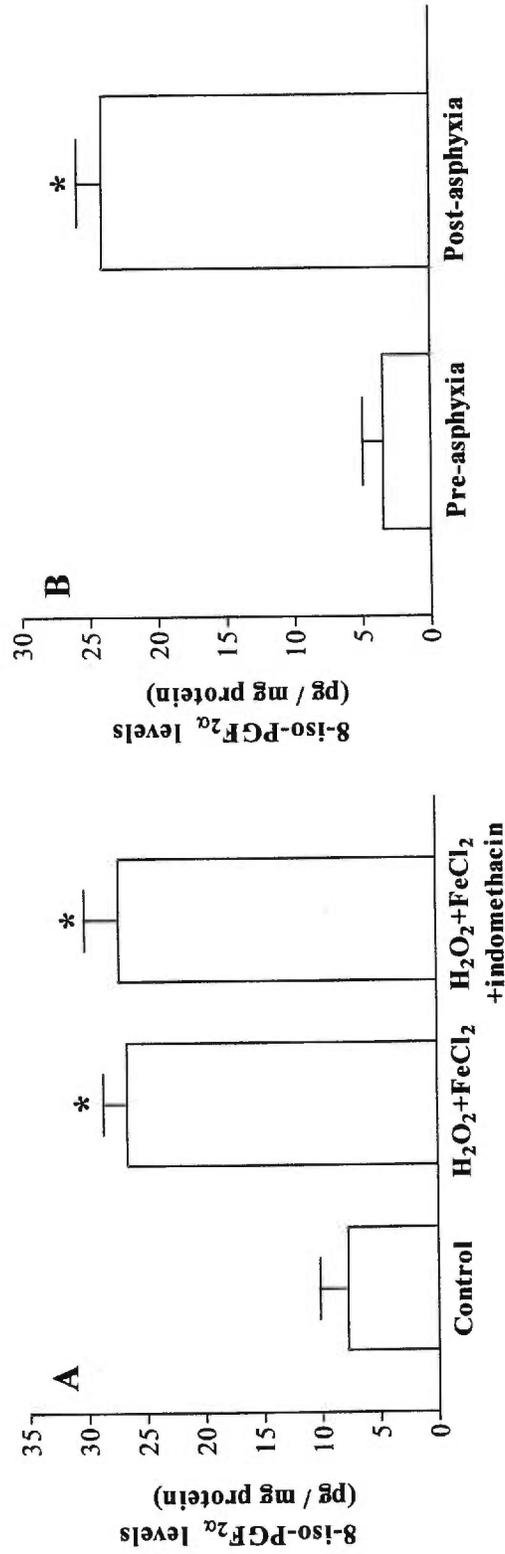


Figure 8. 8-Iso-PGF_{2α} synthesis in retina of piglets subjected to *in vitro* (A) and *in vivo* (B) oxidant stress.

1.5 Discussion

Isoprostanes are stable oxidation products of arachidonic acid produced by a free radical mechanism in numerous tissues (27, 31, 32, 35, 36). One of the F₂-isoprostanes which has been shown to be produced *in vivo* is 8-iso-PGF_{2α} (34); in this study we showed that 8-iso-PGF_{2α} is produced by the retina when subjected to an oxidant stress both *in vitro* and *in vivo* (Fig. 8). 8-Iso-PGF_{2α} causes the constriction of various vascular beds albeit at different efficacy and potency (5, 19, 23, 24). Although the effects of 8-iso-PGF_{2α} have been found to be markedly inhibited by thromboxane A₂ receptor blockers (5, 19, 23, 24, 43), binding studies suggest that 8-iso-PGF_{2α} does not directly interact with the thromboxane A₂ receptor (12, 38, 47) but possibly with distinct binding sites (12, 47). In short, the mechanisms of action of 8-iso-PGF_{2α} remain unclear. The primary purpose of this study was to investigate the effects and potential mechanisms of action of 8-iso-PGF_{2α} on retinal vessels. The data suggest that 8-iso-PGF_{2α} causes retinal vasoconstriction by releasing thromboxane A₂ and endothelin-1 from retina and retinal endothelial cells via a mechanism which involves calcium entry into cells possibly through non-voltage-dependent calcium channels. In this context, it is of relevance that reactive oxygen species can also increase capacitative calcium influx (9) as well as activate cyclooxygenase and cause vasoconstriction by increasing the synthesis of thromboxane A₂ (3, 44). Thus isoprostanes may serve as mediators in peroxidation-induced vasoconstriction.

8-Iso-PGF_{2α} caused retinal vasoconstriction with an EC₅₀ in the low nanomolar range and with an efficacy somewhat less than that of the thromboxane A₂ mimetic U46619 and endothelin-1. These vasoconstrictor effects of 8-iso-PGF_{2α} were

almost completely suppressed by inhibition of synthesis and action of thromboxane A_2 , and to a significantly lesser extent by blockers of endothelin synthesis and of ET_A receptors. In addition, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ stimulated the formation of endothelin-1 and thromboxane A_2 in retina as well as retinal endothelial cells but not retinovascular smooth muscle cells. These data suggest that both thromboxane A_2 and endothelin-1 are involved in the vasoconstrictor effect of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. However, because thromboxane A_2 synthesis and receptor blockers were more effective than those of endothelin in antagonizing the effects 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, it implies a relatively more important role for thromboxane A_2 in the retinal vasoconstriction to 8-iso-PGF $_{2\alpha}$.

Since CGS12970 inhibits the synthesis of thromboxane A_2 but does not block thromboxane A_2 receptors (4), inhibition of the effect of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ by CGS12970 suggests that 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ does not directly act on thromboxane A_2 receptors. This suggestion implies that the inhibition of the vasoconstrictor effects of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ by the thromboxane A_2 receptor antagonist L-670,596 is exerted by a blockade of the effects of thromboxane A_2 released in response to 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. This inference is supported by 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -induced increase in thromboxane A_2 synthesis in retina and retinal endothelial cells (Fig. 6). Further evidence that 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ does not seem to act on the thromboxane A_2 receptor is provided by divergent actions of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ and the thromboxane A_2 mimetic U46619 on calcium influx in endothelial and smooth muscle cells (Fig. 7, *B*, *C* and *D*). Hence, it can be inferred that in retina 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ seems to interact on a binding site distinct from the thromboxane A_2 receptor, concordant with suggestions of others (12, 38, 47).

It is of interest that, in contrast to retinal parenchymal and endothelial cells, smooth muscle cells did not generate thromboxane A_2 or exhibit an increase in calcium transients in response to 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. These observations would suggest that 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ might exert little, if any, direct action on retinovascular smooth muscle and that its vasoconstrictor effects are mediated indirectly by release of thromboxane A_2 (and endothelin-1) from retinal parenchymal and retinal vascular endothelial cells (Fig. 6). In contrast to our findings, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ has been shown to exert diverse actions on rat aortic smooth muscle cells including stimulation of DNA, inositol trisphosphate synthesis, and increase in cytosolic calcium (12, 38). The other finding different from ours applies to the cyclooxygenase-dependence of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ action, which in kidney and lung has been reported to be unrelated to products of this enzyme (5, 43). Reasons for these disparities between our study in porcine retina and those of others regarding effects of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ on smooth muscle cells and cyclooxygenase-dependence are not clear, but may be due to differences in tissues as well as species; for instance, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ constricts coronary arteries of the bovine but not of the ovine (24).

In addition to thromboxane A_2 , endothelin-1 also appears to play a role, albeit to a lesser extent, in the vasoconstrictor response to 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Endothelins are potent vasoconstrictors that can be produced by oxidant stress (8). 8-Iso-PGF $_{2\alpha}$ has been shown to stimulate endothelin-1 release from aortic endothelial cells (13). In the present study, the vasoconstrictor effects of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ were reduced to approximately the same degree by the endothelin converting enzyme inhibitor phosphoramidon and by the ET $_A$ receptor blocker BQ-123. Furthermore, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$

induced the release of endothelin-1 from the retina. These findings suggest that vasoconstrictor effects of 8-iso-PGF_{2α} are partially mediated by endothelin-1 via the ET_A receptor. Since endothelin-1 can release thromboxane A₂ (39), it is possible that a part of the endothelin-mediated effects of 8-iso-PGF_{2α} are exerted indirectly via thromboxane A₂. Indeed 8-iso-PGF_{2α}-induced thromboxane A₂ formation was reduced by BQ-123 (Fig. 6B).

Because the release of endothelin-1 and formation of thromboxane A₂ are calcium-dependent processes, we tested the role of calcium in the action of 8-iso-PGF_{2α}. 8-Iso-PGF_{2α} elicited an increase in intracellular calcium which was dependent upon extracellular calcium (prevented by EGTA as well as by absence of calcium [Fig. 7]). The L-type voltage-gated calcium channels do not seem to be implicated since nifedipine did not inhibit the effects of 8-iso-PGF_{2α} on retinal vessel tone, on endothelin-1 and thromboxane A₂ release, as well as on intracellular calcium transients. In contrast, the vasomotor effects, the generation of endothelin-1 and thromboxane A₂, as well as the increase in intracellular calcium by 8-iso-PGF_{2α} were significantly inhibited by SK&F96365, a blocker of calcium entry including that by non-voltage-dependent calcium channels (28, 29).

Non-voltage-gated calcium channels, which comprise receptor-operated channels, are for the most part not well characterized (20). In addition, their physiological role is difficult to elucidate in the absence of selective blockers. SK&F96365 has been reported to inhibit receptor-mediated calcium entry at ≤30 μM concentrations; however at concentrations >100 μM SK&F96365 also blocks voltage-gated calcium channels. In the present study the inhibitory effects of SK&F96365 on

8-iso-PGF_{2α} action was observed at concentrations <30 μM. Further evidence that non-voltage-gated calcium channels were involved in the vasoconstrictor action of 8-iso-PGF_{2α} was obtained in our study with econazole, which can also block calcium influx from non-voltage dependent calcium channels (17). Altogether, these data suggest that 8-iso-PGF_{2α} increases influx of calcium possibly by facilitating receptor-mediated calcium entry into cells, present in both excitable and non-excitable cells (20, 28), which in turn stimulates the release of endothelin-1 and thromboxane A₂ responsible for mediating retinal vasoconstriction to 8-iso-PGF_{2α}. The involvement of a receptor-operated calcium channel would be consistent with the existence of a distinct 8-iso-PGF_{2α} receptor site (12), which remains to be characterized.

In conclusion, this study reveals a retinal vasoconstrictor effect of 8-iso-PGF_{2α} by a previously undescribed mechanism. Our results suggest that the effect of 8-iso-PGF_{2α} on retinal vasculature is mediated mostly by increased release of thromboxane A₂ and to a lesser extent endothelin-1, probably through non-voltage-gated cation channels. Because isoprostanes are produced in retina during oxidant stress (Fig. 8), it is possible that 8-iso-PGF_{2α} may contribute to the pathogenesis of ischemic-reperfusion retinal injury such as in retinopathy of prematurity and of diabetes. Along these lines a role for thromboxane A₂ has been proposed in ischemic retinopathies (3, 30).

1.6 Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Jacques Maclouf (Paris, France) for expert assistance in measuring 8-iso-prostaglandins by enzyme immunoassay, Ms Hendrika Fernandez and Daniel Abran from DA Labs, Inc for technical support. This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, the Hospital for Sick Children Foundation, the March of Dimes Birth Defects Foundation, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and the United Cerebral Palsy Foundation. Isabelle Lahaie is a recipient of a student fellowship from Fight for Sight research division of Prevent Blindness America and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. Pierre Hardy is recipient of a fellowship award from the Medical Research Council of Canada. Haroutioun Hasséssian is supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

1.7 References

1. Abran, D., P. Hardy, D.R. Varma, and S. Chemtob. Mechanisms of the biphasic effects of peroxides on the retinal vasculature of newborn and adult pigs. *Exp. Eye Res.* 61: 285-292, 1995.
2. Abran, D., D.-Y. Li, D.R. Varma, and S. Chemtob. Characterization and ontogeny of PGE₂ and PGF_{2α} receptors on the retinal vasculature of the pig. *Prostaglandins* 50: 253-267, 1995.
3. Abran, D., D.R. Varma, and S. Chemtob. Increased thromboxane-mediated contractions of retinal vessels of newborn pigs to peroxides. *Am. J. Physiol.* 268 (*Heart Circ. Physiol.* 37): H628-H632, 1995.
4. Ambler, J., K.D. Butler, E.C. Ku, E.D. Maguire, J.R. Smith, and R.B. Wallis. CGS 12970: a novel, long acting thromboxane synthetase inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* 86: 497-504, 1985.
5. Barnerjee, M., K.H. Kang, J.D. Morrow, L.J. Roberts II, and J.H. Newman. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF_{2α}, in rabbit lung in situ. *Am. J. Physiol.* 263 (*Heart Circ. Physiol.* 32): H660-H663, 1992.

6. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
7. Chemtob, S., P. Hardy, D. Abran, D.-Y. Li, K. Peri, O. Cuzzani, and D.R. Varma. Peroxide cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J. Appl. Physiol.* 78: 2039-2046, 1995.
8. De Keulenaer, G.W., L.J. Andries, S.U. Sys, and D.L. Brutsaert. Endothelin-mediated positive inotropic effect induced by reactive oxygen species in isolated cardiac muscle. *Circ. Res.* 76: 878-884, 1995.
9. Doan, T.N., D.L. Gentry, A.A. Taylor, and S.J. Elliott. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca^{2+} -flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem. J.* 297: 209-215, 1994.
10. Emoto, N., and M. Yanagisawa. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* 270: 15262-15268, 1995.

11. Ford-Hutchinson, A.W., Y. Girard, A. Lord, T.R. Jones, M. Cirino, J.F. Evans, J. Gillard, P. Hamel, C. Leveillé, P. Masson, and R. Young. The pharmacology of L-670,596, a potent and selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 989-993, 1989.
12. Fukunaga, M., N. Makita, L.J. Roberts II, J.D. Morrow, K. Takahashi, and K.F. Badr. Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 264 (*Cell Physiol.* 33): C1619-C1624, 1993.
13. Fukunaga, M., T. Yura, and K.F. Badr. Stimulatory effect of 8-iso-PGF_{2α}, an F₂-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26: (Suppl. 3), S51-S52, 1995.
14. Godfraind, T. Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 443-450, 1983.
15. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3344-3450, 1985.
16. Hardy, P., D. Abran, D.-Y. Li, H. Fernandez, D.R. Varma, and S. Chemtob. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet: interaction with prostaglandins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 580-591, 1994.

17. Himmel, H.M., A.R. Whorton, and H.C. Strauss. Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 21: 112-127, 1993.
18. Hockerman, G.H., B.Z. Peterson, B.D. Johnson, and W.A. Catterall. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 361-396, 1997.
19. Hoffman, S.W., S. Moore, and E.F. Ellis. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* 28: 844-849, 1997.
20. Hughes, A.D. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.* 32: 353-370, 1995.
21. Ihara, M., K. Noguchi, T. Saeki, T. Fukuroda, S. Tsuchida, S. Kimura, T. Fukami, K. Ishikawa, M. Nishikibe, and M. Yano. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.* 50: 247-255, 1992.

22. Ishikawa, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda, T. Fukami, S. Ozaki, T. Nagase, M. Nishikibe, and M. Yano. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4892-4896, 1994.

23. Kang, K.H., J.D. Morrow, L.J. Roberts II, J.H. Newman, and M. Banerjee. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F_{2α} in isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.* 74: 460-465, 1993.

24. Kromer, B.M., and J.R. Tippins. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F_{2α}. *Br. J. Pharmacol.* 119: 1276-1280, 1996.

25. Kruse, H.J., B. Grunberg, W. Siess, and P.C. Weber. Formation of biologically active autacoids is regulated by calcium influx in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* 14: 1821-1828, 1994.

26. Leffler, C.W., D.W. Busija, W.M. Armstead, and R. Mirro. H₂O₂ effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets. *Am. J. Physiol.* 258 (*Heart Circ. Physiol.* 27): H1382-H1387, 1990.

27. Longmire, A.W., L.L. Swift, L.J. Roberts II, J.A. Awad, R.F. Burk, and J.D. Morrow. Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem.Pharmacol.* 47: 1173-1177, 1994.
28. Mason, M.J., M.P. Mahaut-Smith, and S. Grinstein. The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of the plasma membrane Ca²⁺ permeability of unstimulated rat lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 10872-10879, 1991.
29. Merritt, J.E., W.P. Armstrong, C.D. Benham, T.J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B.K. Eigh, S.A. McCarthy, K.E. Moores, and T.J. Rink. SK&F96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.* 271: 515-522, 1990.
30. Moreno, A., J.P. De La Cruz, F. Merida, J. Garcia Campos, and F. Sanchez De La Cuesta. Effects of ditazol on the vascular retinal pattern in experimental diabetes in rats. *Haemostasis* 25: 166-171, 1995.
31. Morrow, J.D., J.A. Awad, H.J. Boss, I.A. Blair, and L.J. Roberts II. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed *in situ* on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10721-10725, 1992.

32. Morrow, J.D., J.A. Awad, T. Kato, K. Takahashi, K.F. Badr, L.J. Roberts II, and R.F. Burk. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J. Clin. Invest.* 90: 2502-2507, 1992.
33. Morrow, J.D., K.E. Hill, R.F. Burk, T.M. Nammour, K.F. Badr, and L.J. Roberts II. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 9383-9387, 1990.
34. Morrow, J.D., T.A. Minton, K.F. Badr, and L.J. Roberts II. Evidence that the F₂-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F_{2α}, is formed *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 244-248, 1994.
35. Morrow, J.D., and L.J. Roberts II. The isoprostanes: current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1-9, 1996.
36. Morrow, J.D., and L.J. Roberts II. Generation and actions of isoprostanes. *Biochim. Biophys. Acta* 1345: 121-135, 1997.
37. Penn, J.S., L.A. Thum, and M.I. Naash. Oxygen-induced retinopathy in the rat. Vitamins C and E as potential therapies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33: 1836-1845, 1992.

38. Praticò, D., E.M. Smyth, F. Violi, and G.A. Fitzgerald. Local amplification of platelet function by 8-epi prostaglandin $F_{2\alpha}$ is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 271: 14916-14924, 1996.

39. Reynolds, E.E., and L.L.S. Mok. Role of thromboxane A_2 / prostaglandin H_2 receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 915-921, 1990.

40. Salahudeen, A., K.F. Badr, J.D. Morrow, and L.J. Roberts II. Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F_2 -isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 1300-1303, 1995.

41. Sokal, R.R., and F.J. Rohlf. Comparison among Means. In *Biometry*, edited by R.R. Sokal, and F.J. Rohlf. New York: WH Freeman & Co, 1981, p. 232-262.

42. Southorn, P.A., and G. Powis. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.* 63: 381-408, 1988.

43. Takahashi, K., T.M. Nammour, M. Fukunaga, J. Ebert, J.D. Morrow, J.L. Roberts II, R.L. Hoover, and K.F. Badr. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$, in the rat; evidence for interaction with thromboxane A_2 receptors. *J. Clin. Invest.* 90: 136-141, 1992.
44. Tate, R.M., H.G. Morris, W.R. Schroeder, and J.E. Repine. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 74: 608-613, 1984.
45. Tesfamarian, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 383-391, 1994.
46. Yagi, K., S. Matsuoka, H. Ohkawa, N. Ohishi, Y. Takevchi, and H. Kakai. Lipoperoxide level of the retina of the chick embryo exposed to high concentration of oxygen. *Clin. Chim. Acta* 80: 355-360, 1977.
47. Yura, T., M. Fukunaga, R. Grygorczyk, N. Makita, K. Takahashi, and K.F. Badr. Molecular and functional evidence for the distinct nature of F_2 -isoprostane receptors from those of thromboxane A_2 . *Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res.* 23: 237-239, 1995.

IV. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

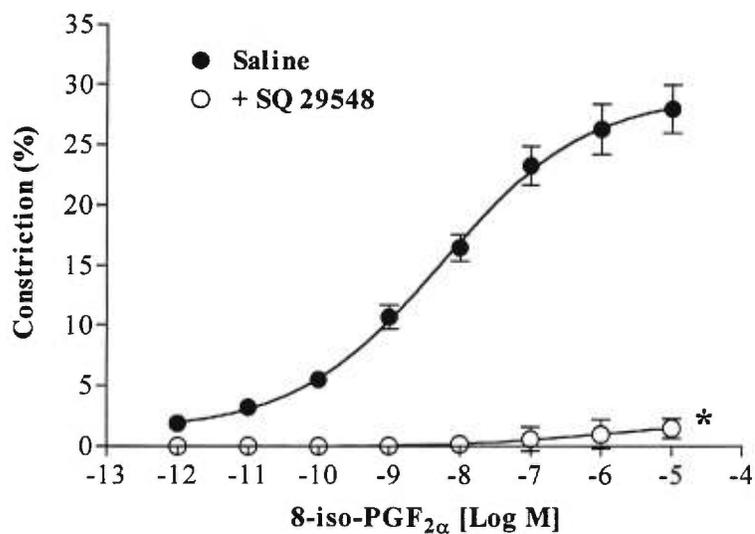


Figure 9. Courbe dose-réponse du 8-iso-PGF_{2α} en absence ou en présence du SQ 29548, un antagoniste du récepteur TP.

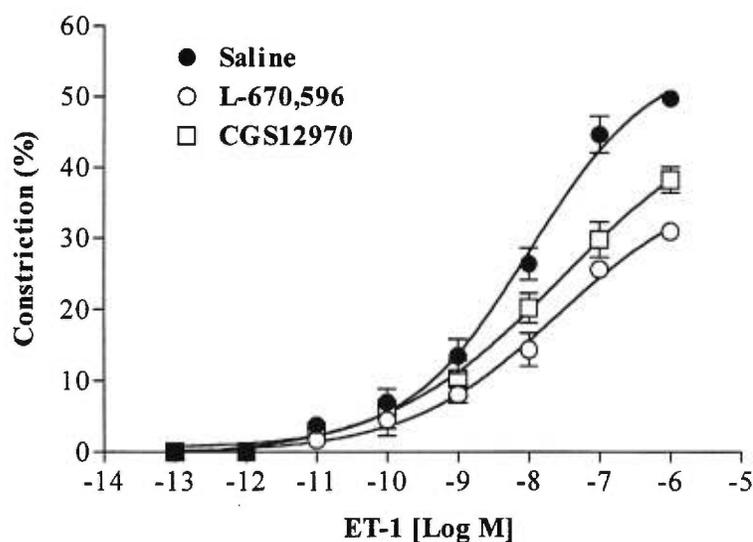


Figure 10. Courbe dose-réponse de l'endothéline-1 en absence ou en présence du L-670,596, un antagoniste du récepteur TP et du CGS12970, un inhibiteur de la thromboxane synthase.

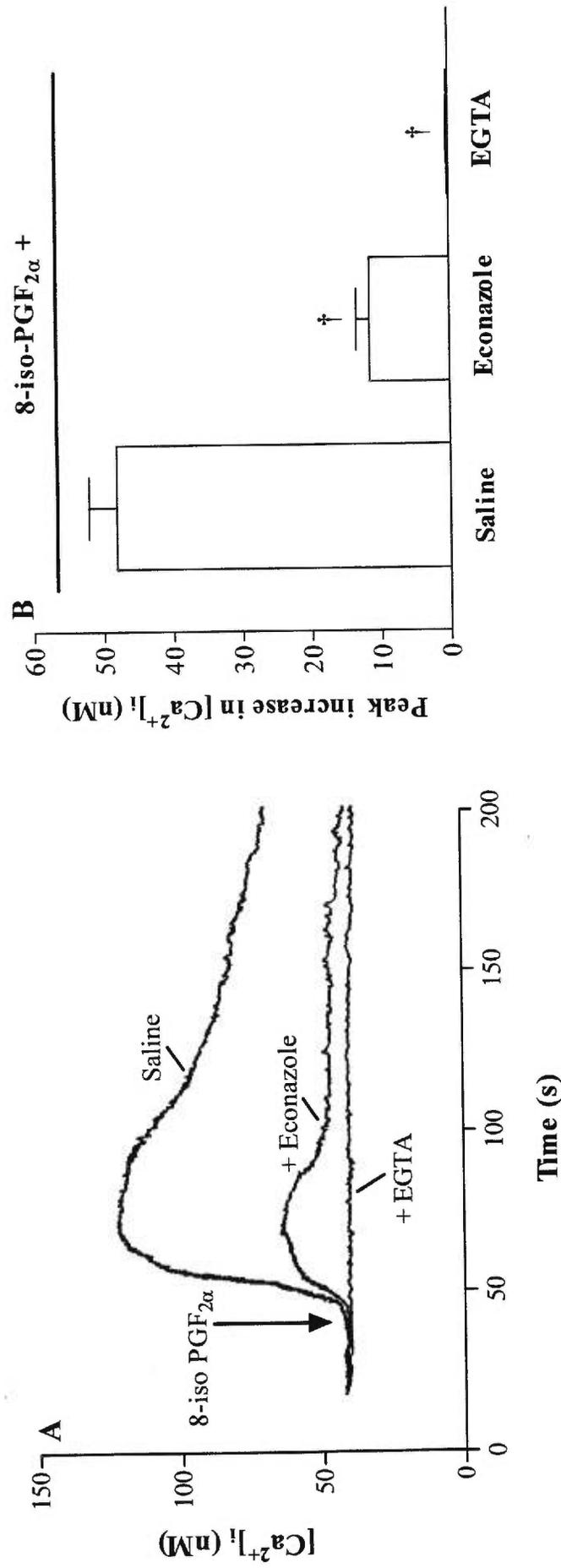


Figure 11. Les effets du 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ en absence ou en présence d'éconazole sur la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules endothéliales vasculaires.

V. DISCUSSION

La formation de radicaux libres au cours d'un stress oxydatif est à l'origine de plusieurs maladies telles que la rétinopathie du prématuré, l'artériosclérose, les maladies cardiovasculaires, le syndrome de détresse respiratoire, l'emphysème pulmonaire et les maladies cérébrovasculaires (Southorn et Powis, 1988). Ces radicaux libres peuvent réagir, entre autre, avec les acides gras des membranes cellulaires provoquant une peroxydation et des dommages cellulaires (Southorn et Powis, 1988). D'ailleurs, la peroxydation semble être à l'origine de nombreuses rétinopathies ischémiques dont la rétinopathie du prématuré et diabétique (Yagi et coll., 1977; Penn et coll., 1992; Tesfamarian, 1994). Au cours d'un stress oxydatif dans la rétine, l'hémodynamie vasculaire est modifiée (Chemtob et coll., 1995) causant une vasoconstriction sévère et prolongée particulièrement chez le nouveau-né (Abran et coll., 1995a; Abran et coll., 1995b; Chemtob et coll., 1995). Il y a de plus en plus d'évidences que le thromboxane A_2 serait responsable de cette constriction (Abran et coll., 1995b; Moreno et coll., 1995). Les radicaux libres semblent activer la formation du thromboxane A_2 par une stimulation de la voie métabolique de la cyclooxygénase (Tate et coll., 1984; Leffler et coll., 1990; Abran et coll., 1995b; Chemtob et coll., 1995). Cependant, on ne sait pas si les radicaux libres activent d'autres voies menant à la formation du thromboxane A_2 .

On a récemment découvert de nouveaux agents, nommés isoprostanes, qui sont formés au cours d'une peroxydation *in vitro* et *in vivo* dans de nombreux tissus chez l'humain comme chez l'espèce animale (Morrow et coll., 1992a; Morrow et

coll., 1992b; Longmire et coll., 1994b; Morrow et Roberts, 1996). Les isoprostanes de type F₂, exercent une constriction des vaisseaux sanguins dont la puissance et l'efficacité varient selon les tissus et l'espèce animale (Banerjee et coll., 1992; Kang et coll., 1993; Kromer et Tippins, 1996; Hoffman et coll., 1997; Wagner et coll., 1997). Cette vasoconstriction est fortement inhibée par des antagonistes du récepteur du thromboxane A₂. Cependant, des études de liaison ont démontré que le 8-iso-PGF_{2α} un isoprostane de type F₂, se lierait avec un récepteur semblable à celui du thromboxane A₂, mais par ailleurs, distinct de ce dernier (Fukunaga et coll., 1993; Yura et coll., 1995; Pratico et coll., 1996; Fukunaga et coll., 1997).

Étant donné que l'effet du 8-iso-PGF_{2α} diffère selon les tissus et que son mécanisme d'action n'est pas très bien caractérisé, cette étude a été réalisée dans le but de déterminer les propriétés et le mécanisme d'action du 8-iso-PGF_{2α} sur les vaisseaux sanguins de la rétine chez le porcelet. Nos résultats démontrent que le 8-iso-PGF_{2α} cause une puissante vasoconstriction des artères de la rétine. Cette constriction est médiée principalement par une stimulation de la formation du thromboxane A₂ et de façon moindre, par une stimulation de la sécrétion d'endothéline-1 par le parenchyme rétinien et les cellules endothéliales suite à une entrée de calcium possiblement par des canaux calciques activés par un récepteur (ROCC).

Tout d'abord, on a vérifié si les isoprostanes pouvaient être formés dans la rétine lors d'un stress oxydatif *in vitro* et *in vivo*. À la suite d'une exposition à du peroxyde d'hydrogène et du dichlorure de fer il y a une formation d'isoprostanes dans la rétine qui a été mesurée par essai immunoenzymatique (EIA). Cette

production d'isoprostanés n'est pas inhibée par un bloqueur de la cyclooxygénase, l'indométhacine. Ces résultats confirment les études de Morrow démontrant que les isoprostanés sont formés indépendamment de la cyclooxygénase (Morrow et coll., 1990b). De plus, suite à une période d'asphyxie suivit d'une période de réoxygénation, il y a également une production d'isoprostanés dans la rétine du porcelet.

Par la suite, les propriétés du 8-iso-PGF_{2α} sur les vaisseaux sanguins de la rétine ont été déterminées par des courbes dose-réponse. Le 8-iso-PGF_{2α} exerce une puissante vasoconstriction sur les artères de la rétine avec un EC₅₀ de l'ordre du nanomolaire. D'autres études avaient également établi que le EC₅₀ du 8-iso-PGF_{2α} était de l'ordre du nanomolaire dans le rein perfusé chez le rat (Morrow et coll., 1990b; Takahashi et coll., 1992). Par contre, d'autres expériences faites sur d'autres tissus et animaux montrent que le 8-iso-PGF_{2α} est beaucoup moins puissant (Kang et coll., 1993; Kromer et Tippins, 1996; Hoffman et coll., 1997; Wagner et coll., 1997). Ces divergences sont probablement attribuables à des différences selon le tissu et/ou l'espèce.

Étant donné que plusieurs études antérieures avaient démontré que des antagonistes du récepteur du thromboxane A₂ (TP) inhibaient de façon importante la vasoconstriction induite par le 8-iso-PGF_{2α} (Banerjee et coll., 1992; Kang et coll., 1993; Kromer et Tippins, 1996; Hoffman et coll., 1997; Wagner et coll., 1997), nous avons utilisé un antagoniste sélectif du récepteur TP, le L-670,596 (Ford-Hutchinson et coll., 1989) pour bloquer l'effet du 8-iso-PGF_{2α} sur les artères de la rétine. Le L-670,596 inhibe presque complètement la vasoconstriction exercée par le 8-iso-

PGF_{2α}. Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé un autre antagoniste sélectif du récepteur TP, le SQ 29548 (Ogletree et coll., 1985), et nous avons obtenu des réponses similaires au L-670,596 (Fig. 9). De même, l'utilisation d'un bloqueur de la thromboxane synthase, le CGS12970 (Ambler et coll., 1985) bloque de façon très significative la réponse au 8-iso-PGF_{2α}. Ces résultats suggèrent donc que le 8-iso-PGF_{2α} ne se lierait pas directement avec le récepteur du thromboxane A₂ puisque le CGS12970 ne bloque pas le récepteur du thromboxane A₂ mais uniquement sa synthèse (Ambler et coll., 1985). L'abolition de l'effet du 8-iso-PGF_{2α} par le L-670,596 et le SQ 29548 implique que ces antagonistes bloqueraient l'effet du thromboxane A₂ sur son propre récepteur suite à la stimulation de sa formation par le 8-iso-PGF_{2α}.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré par essai radioimmunologique la formation du thromboxane A₂ dans les rétines ainsi que dans les cellules endothéliales et musculaires de vaisseaux sanguins rétiniens. Le 8-iso-PGF_{2α} stimule la formation du thromboxane A₂ dans la rétine et les cellules endothéliales mais pas de façon significative dans les cellules de muscles lisses vasculaires. Une production significative de thromboxane A₂ par le parenchyme rétinien avait déjà été démontrée dans notre laboratoire, en exposant des rétines de rats âgés de deux jours et dépourvues de vaisseaux sanguins, à des peroxydes (données non publiées). Ces résultats suggèrent donc que l'effet vasoconstricteur du 8-iso-PGF_{2α} serait médié par une stimulation de la formation du thromboxane A₂ principalement par le parenchyme rétinien et par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de la rétine. Ces résultats vont à l'encontre d'études qui

démontrent que l'effet du 8-iso-PGF_{2α}, dans les reins et les poumons, est indépendant d'agents synthétisés par la cyclooxygénase (Banerjee et coll., 1992; Takahashi et coll., 1992). Ces divergences sont probablement attribuables à des différences selon le tissu et/ou l'espèce.

Récemment, une étude a démontré que le 8-iso-PGF_{2α} stimule la sécrétion de l'endothéline-1 dans les cellules endothéliales d'aorte de boeuf (Fukunaga et coll., 1995). L'endothéline est un puissant vasoconstricteur (Yanagisawa et coll., 1988) qui peut être produit lors d'un stress oxydatif (De Keulenaer et coll., 1995). Nous avons donc utilisé des antagonistes des récepteurs de l'endothéline et un bloqueur de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour tenter de bloquer la constriction induite par le 8-iso-PGF_{2α}. Le BQ-123, un antagoniste sélectif du récepteur ET_A (Ihara et coll., 1992), de même que le phosphoramidon, un bloqueur de l'ECE (Emoto et Yanagisawa, 1995), inhibent presque au même degré l'effet du 8-iso-PGF_{2α} mais de façon moindre comparativement aux bloqueurs L670,596, et CGS12970. Par contre, l'utilisation du BQ-788, un antagoniste sélectif du récepteur ET_B (Ishikawa et coll., 1994), n'a aucun effet sur la vasoconstriction induite par le 8-iso-PGF_{2α}. Ces résultats suggèrent qu'une partie de l'effet du 8-iso-PGF_{2α} serait médiée par l'endothéline-1 sur le récepteur ET_A suite à la stimulation de sa sécrétion. D'ailleurs, il a été démontré que le récepteur ET_A semble être le principal récepteur de l'endothéline présent sur les vaisseaux sanguins rétiniens et choroïdiens. (MacCumber et D'Anna, 1994; McDonald et coll., 1996). Pour confirmer ces observations, nous avons également mesuré par EIA la sécrétion de l'endothéline-1 dans la rétine. Le 8-iso-PGF_{2α} stimule la sécrétion d'endothéline-1

dans la rétine et elle est inhibée par le phosphoramidon confirmant que l'endothéline-1 médie une partie de l'effet vasoconstricteur du 8-iso-PGF_{2α}.

Jusqu'à maintenant, l'effet constricteur du 8-iso-PGF_{2α} semble être médié principalement par le thromboxane A₂ et de façon moindre par l'endothéline-1. Des études ont démontré que l'endothéline-1 peut stimuler la PLA₂ dans les cellules de muscles lisses d'aorte et d'artère rénale (Resink et coll., 1989; Reynolds et coll., 1989) libérant ainsi l'acide arachidonique pour former, entre autres, des prostaglandines. D'ailleurs, il a été démontré qu'une partie de l'effet de l'endothéline-1 est médiée par le thromboxane A₂ dans les cellules de muscles lisses aortiques (Reynolds et Mok, 1990). Alors, on a vérifié si une partie de l'effet de l'endothéline-1 ne pourrait pas être médiée par le thromboxane A₂ dans l'effet vasoconstricteur du 8-iso-PGF_{2α}. La formation du thromboxane A₂ induite par le 8-iso-PGF_{2α} est inhibée partiellement par un antagoniste du récepteur ET_A, le BQ-123. Pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré l'effet vasoconstricteur de l'endothéline-1 sur les vaisseaux sanguins rétiniens en présence ou non d'un antagoniste du récepteur TP, le L-670,596 et du bloqueur de la thromboxane synthase, le CGS12970. L'effet constricteur de l'endothéline-1 est en partie inhibée par les deux bloqueurs (Fig. 10). Ces résultats suggèrent donc que lorsque le 8-iso-PGF_{2α} stimule la sécrétion de l'endothéline-1, une partie de l'effet constricteur de celle-ci serait médiée indirectement par le thromboxane A₂.

Étant donné que la formation du thromboxane A₂ et la sécrétion de l'endothéline-1 sont des processus dépendants du calcium, nous avons évalué le rôle du calcium dans l'effet du 8-iso-PGF_{2α}. Nous avons utilisé deux bloqueurs de

canaux calciques pour tenter de bloquer l'effet constricteur du 8-iso-PGF_{2α}. Il y a la nifédipine qui est un antagoniste de canaux calciques voltage dépendant de type L (Godfraind, 1983) et le SK&F96365 qui est un bloqueur de l'entrée de calcium possiblement par un récepteur médiant l'entrée de calcium via des canaux calciques non dépendants du voltage (Merritt et coll., 1990; Manson et coll., 1991). Les récepteurs médiant l'entrée de calcium par des canaux calciques non dépendants du voltage sont présents sur les cellules possédant une membrane plasmique excitable et sur les cellules non-excitables (Mason et coll., 1991; Hugues, 1995). L'utilisation du SK&F96365 bloque de façon très significative la vasoconstriction induite par le 8-iso-PGF_{2α} alors que la nifédipine n'a presque pas d'effet. Pour investiguer davantage ces résultats, nous avons mesuré la sécrétion de l'endothéline-1 et la formation du thromboxane A₂ en présence de ces deux bloqueurs dans la rétine et les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins rétiniens. Ces deux processus qui sont stimulés par le 8-iso-PGF_{2α} sont significativement inhibés par le SK&F96365 mais pas par la nifédipine. Donc il semble que le 8-iso-PGF_{2α} agirait par l'intermédiaire de canaux calciques non dépendants du voltage dans la rétine et les cellules endothéliales pour induire une sécrétion de l'endothéline-1 et principalement une formation de thromboxane A₂.

Pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré l'augmentation du calcium intracellulaire à l'aide de l'indicateur fluorescent fura-2 dans les cellules endothéliales et musculaires des vaisseaux sanguins rétiniens. Le 8-iso-PGF_{2α} provoque une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales mais pas dans les cellules de muscles lisses vasculaires contrairement au U46619.

Ces données sur les cellules musculaires confirment les résultats obtenus avec la formation du thromboxane A_2 , c'est-à-dire que le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ne semblait pas augmenter de façon significative la formation du thromboxane A_2 dans les cellules de muscles lisses vasculaires. Ces résultats semblent suggérer que le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ n'aurait presque pas sinon aucun effet direct sur les cellules musculaires lisses, qu'il n'agirait pas via le récepteur TP situé sur ces cellules et que son effet vasoconstricteur serait plutôt médié indirectement par le thromboxane A_2 et légèrement par l'endothéline-1 libérés des cellules endothéliales vasculaires de la rétine ainsi que du parenchyme rétinien. Cependant, ces résultats vont à l'encontre d'études qui démontrent que le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ induit plusieurs effets dans les cellules de muscles lisses aortiques de rat incluant une stimulation de la synthèse d'inositol triphosphate, une augmentation du calcium cytosolique, une augmentation des produits formés par la cyclooxygénase et finalement une stimulation de la prolifération des cellules musculaires (Fukunaga et coll., 1993; Pratico et coll., 1996; Wagner et coll., 1997). Probablement que ces divergences par rapport à nos résultats sont attribuables à des différences selon le type de vaisseau sanguin et/ou l'espèce.

L'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales suite à une stimulation par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, proviendrait du milieu extracellulaire puisque lorsqu'on enlève le calcium du milieu ou qu'on ajoute du EGTA, il n'y a aucune réponse à la stimulation par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$. Par ailleurs, lorsqu'on utilise la nifédipine, on observe une augmentation du calcium intracellulaire semblable à celle induite par le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ lorsqu'il est employé seul signifiant que la nifédipine ne

semble pas bloquer l'effet de l'isoprostane. Par contre, en présence de SK&F96365, il y a une diminution significative de l'entrée de calcium dans les cellules endothéliales stimulées par le 8-iso-PGF_{2α}. Ces résultats confirment ceux observés antérieurement et suggèrent que les canaux calciques voltage dépendant de type L ne semblent pas être impliqués dans l'effet vasoconstricteur du 8-iso-PGF_{2α}. Il semble plutôt que le 8-iso-PGF_{2α} activerait des canaux calciques non dépendants du voltage pour induire une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales.

L'étude des canaux calciques non dépendants du voltage incluant les récepteurs opérant des canaux calciques (ROCC) est quelque peu difficile puisqu'ils ne sont pas très bien caractérisés (Hugues, 1995). De plus, l'absence de bloqueurs sélectifs pour ces canaux ne permet pas d'établir de façon précise leur rôle physiologique. Même si on a utilisé le SK&F96365 à une faible concentration (20 μM) qui est suffisante pour bloquer des récepteurs médiant l'entrée de calcium, il a été démontré qu'à des concentrations supérieures à 100 μM le SK&F96365 bloque également les canaux calciques voltage dépendant. Nous avons donc utilisé un autre bloqueur des canaux calciques non dépendants du voltage, l'éconazole (Himmel et coll., 1993) pour s'assurer que le 8-iso-PGF_{2α} stimule des canaux calciques non dépendants du voltage. L'éconazole bloque l'augmentation du calcium intracellulaire par le 8-iso-PGF_{2α} de façon semblable au SK&F96365 (Fig. 11). Il semble donc, à la lumière de ces résultats, que l'effet vasoconstricteur du 8-iso-PGF_{2α} implique la stimulation de canaux calciques non dépendants du voltage et suggère que le 8-iso-PGF_{2α} augmente le calcium intracellulaire dans les cellules

endothéliales vasculaires de la rétine possiblement par l'intermédiaire d'un récepteur médiant l'entrée de calcium. La possibilité que le 8-iso-PGF_{2α} active un récepteur médiant une entrée de calcium irait appuyer les études démontrant l'existence d'un récepteur distinct de celui du thromboxane A₂ (Fukunaga et coll., 1993; Yura et coll., 1995; Pratico et coll., 1996; Fukunaga et coll., 1997) qui d'ailleurs reste à être caractérisé.

En conclusion, cette étude démontre que le 8-iso-PGF_{2α} exerce une puissante vasoconstriction dans les artères de la rétine. Cette constriction serait médiée principalement par une augmentation de la formation du thromboxane A₂ et légèrement par une sécrétion d'endothéline-1 dans les cellules endothéliales vasculaires et le parenchyme rétinien, via possiblement un récepteur médiant l'entrée de calcium par l'intermédiaire de canaux calciques non dépendants du voltage. Donc le 8-iso-PGF_{2α} n'agirait pas directement sur les muscles lisses vasculaires rétiniens mais plutôt indirectement via la libération de thromboxane A₂ et d'endothéline-1 par l'endothélium vasculaire et le parenchyme rétinien. Étant donné que les isoprostanes sont formés dans la rétine au cours d'un stress oxydatif, il serait possible que le 8-iso-PGF_{2α} contribue aux pathologies d'origine ischémique dans la rétine comme la rétinopathie du prématuré et diabétique.

VI. DIRECTIONS FUTURES

Suite à cette étude, nous voulons déterminer les propriétés du 8-iso-PGF_{2α} sur la choroïde. Ce tissu est responsable de 80% de l'apport sanguin à la rétine. De plus, c'est un tissu purement vasculaire puisqu'il a une origine embryonique mésodermique qui diffère de celle de la rétine, un tissu nerveux d'origine ectodermique. Il se pourrait donc que les propriétés du 8-iso-PGF_{2α} ainsi que les mécanismes d'action dans la choroïde soient différents. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer et de comparer les effets et les mécanismes d'action d'un autre type d'isoprostane, le 8-iso-PGE₂ sur les vaisseaux sanguins de la rétine et de la choroïde.

Il serait important de caractériser le ou les récepteurs sur le(s)quel(s) le 8-iso-PGF_{2α} et le 8-iso-PGE₂ agissent dans la rétine et la choroïde. Comme l'effet du 8-iso-PGF_{2α} semble être différent selon les tissus, il se pourrait que les messagers secondaires impliqués soient également différents selon les tissus et les animaux. D'ailleurs, plusieurs études sont présentement en cours pour tenter de caractériser le récepteur des isoprostanes.

Finalement, il serait important de déterminer les implications que pourraient avoir les isoprostanes dans des maladies caractérisées par une oxydation. Dans la rétine, par la stimulation de la formation du thromboxane A₂, le 8-iso-PGF_{2α} pourrait contribuer au développement de la rétinopathie du prématuré ainsi qu'à la rétinopathie diabétique.

VII. BIBLIOGRAPHIE

Abran D., Hardy P., Varma D.R., Chemtob S. (1995a). Mechanisms of the biphasic effects of peroxides on the retinal vasculature of newborn and adult pigs. *Exp. Eye Res.*, 61, 285-292.

Abran D., Varma D.R., Chemtob S. (1995b). Increased thromboxane-mediated contractions of retinal vessels of newborn pigs to peroxides. *Am. J. Physiol.*, 268, H628-H632.

Ambler J., Butler K.D., Ku E.C., Maguire E.D., Smith J.R., Wallis R.B. (1985). CGS 12970: a novel, long acting thromboxane synthetase inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, 86, 497-504.

Arudi R.L., Bielski B.H.J., Allen A.O. (1984). Search for singlet oxygen luminescence in the disproportionation of HO_2/O_2^- . *Photochem. Photobiol.*, 39, 703-706.

Awad J.A., Morrow J.D., Hill K.E., Roberts II L.J., Burk R.F. (1994). Detection and localization of lipid peroxidation in selenium- and vitamin E-deficient rats using F_2 -isoprostanes. *J. Nutr.*, 124, 810-816.

Azuma H., Ishikawa M., Sekizakki S. (1986). Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, 88, 411-415.

Babior B.M. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl. J. Med.*, 298, 659-668.

Babior B.M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 73, 599-601.

Babior B.M., Peters W.A. (1981). The $O_2^{\bullet-}$ -producing enzyme of human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 256, 2321-2323.

Ballou D., Palmer G., Massey V. (1969). Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavin and of its catalytic decomposition by erythrocuprein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36, 898-904.

Banerjee M., Kang K.H., Morrow J.D., Roberts L.J., Newman J.H. (1992). Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF_{2α}, in rabbit lung in situ. *Am. J. Physiol.*, 263, H660-H663.

Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 1620-1624.

Bellus D. (1978). Quenchers of singlet oxygen - a critical review. In: *Singlet Oxygen: Reactions with Organic Compounds and Polymers*. Ranby B., Rabeck J.F. (ed.). John Wiley & Sons, New York. pp.61-110.

Bettazzoli L., Zirrolli J.A., Reidhead C.T., Shahgholi M., Murphy R.C. (1990). Incorporation of arachidonic acid into glycerophospholipids of a murine bone marrow derived mast cell. *Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res.*, 20, 71-78.

Blough N.V., Zafiriou O.C. (1985). Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.*, 24, 3502-3504.

Bredt D.S., Snyder S.H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 9030-9033.

Brown S.M., Jampol L.M. (1996). New concepts of regulation of retinal vessel tone. *Arch. Ophthalmol.*, 114, 199-204.

Chakraborti S., Gurtner G.H., Micheal J.R. (1989). Oxidant-mediated activation of phospholipase A₂ in pulmonary endothelium. *Am. J. Physiol.*, 257, L430-L437.

- Chemtob S., Hardy P., Abran D., Li D-Y., Peri K., Cuzzani O., Varma D.R. (1995). Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *J. Appl. Physiol.*, 78, 2039-2046.
- Cook H.W., Lands W.E.M. (1975). Evidence for an activating factor formed during prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65, 464-471.
- Davidge S.T., Hubel C.A., McLaughlin M.K. (1993). Cyclooxygenase-dependent vasoconstrictor alters vascular function in the vitamin E-deprived rat. *Circ Res.*, 73, 79-88.
- Davies K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 262, 9895-9901.
- DeHass G.H., Postema N.M., Nieuwenhuizen W., Van Deenen L.L.M. (1968). Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochem. Biophys. Acta*, 159, 118-129.
- De Keulenaer G.W., Andries L.J., Sys S.U., Brutsaert D.L. (1995). Endothelin-mediated positive inotropic effect induced by reactive oxygen species in isolated cardiac muscle. *Circ. Res.*, 76, 878-884.

Del Maestro R.F. (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.*, 492, 153-168.

Dennis E.A. (1987). Regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors. *Biotechnology*, 5, 1294-1300.

Doan T.N., Gentry D.L., Taylor A.A., Elliott S.J. (1994). Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca^{2+} -flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem. J.*, 297, 209-215.

Dunford H.B., Stillman J.S. (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coord. Chem. Rev.*, 19, 187-251.

Elliott S.J., Eskin S.G., Schilling W.P. (1989). Effect of *t*-butyl-hydroperoxide on bradykinin stimulated changes in cytosolic calcium in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 264, 3806-3810.

Elliott S.J., Meszaros J.G., Schilling W.P. (1992). Effect of oxidant stores and calcium signaling in vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 13, 635-650.

Elliott S.J., Schilling W.P., Kunze D.L. (1991). Oxidant stress activates a non-selective cation channel in pulmonary vascular endothelial cells. *FASEB J.*, 5, A656.

Emoto N., Yanagisawa M. (1995). Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.*, 270, 15262-15268.

Estabrook R.W., Werringloer J. (1976). Cytochrome P₄₅₀: its role in oxygen activation for drug metabolism. In: *Drug Metabolism Concepts*. Donald M.J., Robert R.G. (ed.). American Chemical Society, Washington.

Fisher D.B., Kaufman S. (1973). Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 248, 4300-4304.

Flaherty J.T., Weisfeldt M.L. (1988). Reperfusion injury. *Free Rad. Biol. Med.*, 5, 409-419.

Ford-Hutchinson A.W., Girard Y., Lord A., Jones T.R., Cirino M., Evans J.F., Gillard J., Hamel P., Leveillé C., Masson P., Young R. (1989). The pharmacology of L-670,596, a potent and selective thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67, 989-993.

Forman H.J., Kennedy J. (1976). Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 173, 219-224.

Freeman B.A., Crapo J.D. (1982). Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 412-426.

Frei B., Kim M.C., Ames B.N. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 4879-4883.

Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880.

Fukunaga M., Makita N., Roberts II L.J., Morrow J.D., Takahashi K., Badr K.F. (1993). Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 264, C1619-C1624.

Fukunaga M., Yura T., Badr K.F. (1995). Stimulatory effect of 8-epi-PGF₂α, an F₂-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26, (suppl. 3), S51-S52.

Fukunaga M., Yura T., Grygorczyk R., Badr K.F. (1997). Evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Am. J. Physiol.*, 272, F477-F483.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.

Furlong B., Henderson A.H., Lewis M.J., Smith J.A. (1987). Endothelium-derived relaxing factor inhibits *in vitro* platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, 90, 687-692.

Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336, 385-388.

Godfraind T. (1983). Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 224, 443-450.

Grover A.K., Samson S.E., Fromin V.P. (1992). Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am. J. Physiol.*, 263, H537-H543.

Gurtner G.H., Knoblauch A., Smith S., Sies H., Adkinson N.F.Jr. (1983). Oxidant- and lipid-induced pulmonary vasoconstriction mediated by arachidonic acid metabolites. *J. Appl. Physiol.*, 55, 949-954.

Gutteridge J.M.C. (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Letters*, 201, 291-295.

Gutteridge J.M.C., Stocks J. (1981). Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 14, 257-329.

Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comm.*, 9, 1-32.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219, 1-14.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 1-8.

Hamberg M., Samuelsson B. (1967). On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandin E₁ and F_{1 α} . *J. Biol. Chem.*, 242, 5336-5343.

Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2994-2998.

Harlan J.M., Callahan K.S. (1984). Role of hydrogen peroxide in the neutrophil-mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 74, 442-448.

Hemler M.E., Cook H.W., Lands W.E.M. (1979). Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 193, 340-345.

Herschman H.R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1299, 125-140.

Hibbs J.B.Jr., Vavrin Z., Taintor R.R. (1987). L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.*, 138, 550-565.

Himmel H.M., Whorton A.R., Strauss H.C. (1993). Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension*, 21, 112-127.

Hirata F., Hayaishi O. (1971). Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J. Biol. Chem.*, 246, 7825-7826.

Hirosumi J., Ouchi Y., Watanabe M., Kusunoki J., Nakamuri T., Orimo H. (1988). Effect of superoxide and lipid peroxide on cytosolic free calcium concentrations in cultured pig aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 152, 301-307.

Hobbs A.J., Fukuto J.M., Ignarro L.J. (1994). Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 10992-10996.

Hoffman S.W., Moore S., Ellis E.F. (1997). Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke*, 28, 844-849.

Hubel C.A., Davidge S.T., McLaughlin M.K. (1993). Lipid hydroperoxides potentiate mesenteric artery vasoconstrictor responses. *Free Rad. Biol. Med.*, 14, 397-407.

Hughes A.D. (1995). Calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.*, 32, 353-370.

Ihara M., Noguchi K., Saeki T., Fukuroda T., Tsuchida S., Kimura S., Fukami T., Ishikawa K., Nishikibe M., Yano M. (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.*, 50, 247-255.

Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K., Masaki T. (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 2863-2867.

Inoue A., Yanagisawa M., Takuwa Y., Mitsui Y., Kobayashi M., Masaki T. (1989b). The human preendothelin 1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.*, 264, 14954-14959.

Ishikawa K., Ihara M., Noguchi K., Mase T., Mino N., Saeki T., Fukuroda T., Fukami T., Ozaki S., Nagase T., Nishikibe M., Yano M. (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 4892-4896.

Jones D.P. (1982). Intracellular catalase function: analysis of the catalytic activity by product formation in isolated liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 214, 806-814.

Jones D.P., Thor H., Smith M.T., Jewell S.A., Orrenius S. (1983). Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca^{2+} sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J. Biol. Chem.*, 258, 6390-6393.

Kang K.H., Morrow J.D., Roberts II L.J., Newman J.H., Banerjee M. (1993). Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ in isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.*, 74, 460-465.

Koppenol W.H., Moreno J.J., Pryor W.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 834-842.

Kromer B.M., Tippins J.R. (1996). Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi-PG $_{2\alpha}$. *Br. J. Pharmacol.*, 119, 1276-1280.

Kukreja R.C., Kontos H.A., Hess M.L., Ellis E.F. (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.*, 59, 612-619.

Kulmacz R.J., Lands W.E.M. (1983). Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *Prostaglandins*, 25, 531-540.

Kulmacz R.J., Lands W.E.M. (1984). Prostaglandin H synthase: stoichiometry of heme cofactor. *J. Biol. Chem.*, 259, 6358-6363.

La M., Reid J.J. (1995). Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 22, 315-323.

Lawson J.A., Maxey K.M. (1996). Isoprostanes; Prostanoids that arise spontaneously in membrane phospholipids. *Cayman Currents*, Issue 2.

Leffler C.W., Busija D.W., Armstead W.M., Mirro R. (1990). H₂O₂ effects on cerebral prostanoids and pial arteriolar diameter in piglets. *Am. J. Physiol.*, 258, H1382-H1387.

Levin E.R. (1995). Endothelins. *New Engl. J. Med.*, 333, 356-363.

Longmire A.W., Roberts L.J., Morrow J.D. (1994a). Actions of the E₂-isoprostane, 8-iso-PGE₂, on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor. *Prostaglandins*, 48, 247-256.

Longmire A.W., Swift L.L., Roberts II L.J., Awad J.A., Burk R.F., Morrow J.D. (1994b). Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Bioch. Pharmacol.*, 47, 1173-1177.

MacCumber M.W., D'Anna S.A. (1994). Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch. Ophthalmol.*, 112, 1231-1235.

Maier J.A.M, Hla T., Maciag T. (1990). Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 10805-10808.

Marklund S.L. (1985). Oxygen toxicity and protective systems. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 23, 289-298.

Mason M.J., Mahaut-Smith M.P., Grinstein S. (1991). The role of intracellular Ca^{2+} in the regulation of the plasma membrane Ca^{2+} permeability of unstimulated rat lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 266, 10872-10879.

Masters C., Holmes R. (1977). Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.*, 57, 816-882.

McCord J.M. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185, 529-531.

McCord J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.*, 312, 159-163.

McCord J.M., Fridovich I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 243, 5753-5760.

McCord J.M., Fridovich I. (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J. Biol. Chem.*, 245, 1374-1377.

McDonald D.M., Baile J.R., Archer D.B., Chakravarthy U. (1996). Receptor binding and biological activity of synthetic ET-1 peptides in the retinal pericyte. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37, 1067-1073.

Merritt J.E., Armstrong W.P., Benham C.D., Hallam T.J., Jacob R., Jaxa-Chamiec A., Leigh B.K., McCarthy S.A., Moores K.E., Rink T.J. (1990). SK&F96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.*, 271, 515-522.

Misra H.P. (1974). Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.*, 249, 2151-2155.

Misra H.P., Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 247, 3170-3175.

Miyamoto T., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O. (1976). Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.*, 251, 2629-2636.

Mohler E.R., Franklin M.T., Adam L.P. (1996). Intracellular signaling by 8-epi-prostaglandin F_{2α} is mediated by thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptors in porcine carotid arteries. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 225, 915-923.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, 12, 365-372.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43, 109-142.

Moreno A., De La Cruz J.P., Merida F., Garcia Campos J., Sanchez De La Cuesta F. (1995). Effects of ditazol on the vascular retinal pattern in experimental diabetes in rats. *Haemostasis*, 25, 166-171.

Morita I., Schindler M., Regier M.K., Otto J.C., Hori T., DeWitt D.L., Smith W.L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 270, 10902-10908.

Morrow J.D., Awad J.A., Boss H.J., Blair I.A., Roberts II L.J. (1992a). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-Isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 10721-10725.

Morrow J.D., Awad J.A., Kato T., Takahashi K., Badr K.F., Roberts II L.J., Burk R.F. (1992b). Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-Isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J. Clin. Invest.*, 90, 2502-2507.

Morrow J.D., Awad J.A., Wu A., Zackert W.E., Daniel V.C., Roberts II L.J. (1996). Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (Isothromboxanes) *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 271, 23185-23190.

Morrow J.D., Harris T.M., Roberts II L.J. (1990a). Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.*, 184, 1-10.

Morrow J.D., Hill K.E., Burk R.F., Nammour T.M., Badr K.F., Roberts II L.J. (1990b). A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced *in vivo* in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 9383-9387.

Morrow J.D., Minton T.A., Mukundan C.R., Campbell M.D., Zackert W.E., Daniel V.C., Badr K.F., Blair I.A., Roberts II L.J. (1994). Free radical-induced generation of isoprostanes *in vivo*; Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J. Biol. Chem.*, 269, 4317-4326.

Morrow J.D., Minton T.A., Roberts II L.J. (1992c). The F₂-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F_{2α}, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins*, 44, 155-163.

Morrow J.D., Roberts II L.J. (1996). The isoprostanes: current knowledge and directions for future research. *Biochem. Pharmacol.*, 51, 1-9.

Natarajan V. (1995). Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J. Lab. Clin. Med.*, 125, 26-37.

Nielsen J.C., Naash M.I., Anderson R.E. (1988). The regional distribution of vitamins E and C in mature and premature human retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29, 22-26.

Ogletree M.L., Harris D.N., Greenberg R., Haslanger M.F., Nakane M. (1985). Pharmacological actions of SQ 29,548, a novel selective thromboxane antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 234, 435-441.

Ohki S., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O. (1979). Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.*, 254, 829-836.

Oliver P.D., Newsome D.A. (1992). Mitochondrial superoxide dismutase in mature and developing human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33, 1909-1918.

Ozawa T., Hanaki A., Matsumoto S., Matsuo M. (1978). Electron spin resonance studies of radicals obtained by the reaction of α -tocopherol and its model compounds with superoxide ion. *Biochim. Biophys. Acta*, 531, 72-78.

Pace-Asiak C.R., Smith W.L. (1983). Enzymes in the biosynthesis and catabolism of the eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and hydroxy fatty acids. In: *The Enzymes*. Boyer P.D. (ed.). Academic Press, New York. Vol. 16, pp.543-603.

Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-666.

Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.

Penn J.S., Thum L.A., Naash M.I. (1992). Oxygen-induced retinopathy in the rat. Vitamins C and E as potential therapies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33, 1836-1845.

Pohl U., Busse R., Kuon E., Bassenge E. (1986). Pulsatile perfusion stimulates the release of endothelial autocoids. *J. Appl. Cardiol.*, 1, 215-235.

Pollock D.M., Keith T.L., Highsmith R.F. (1995). Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.*, 9, 1196-1204.

Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H., Rosen G.M. (1992). Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 267, 24173-24176.

Pourcyrous M., Leffler C.W., Bada H.S., Korones S.B., Busija D.W. (1993). Brain superoxide anion generation in asphyxiated piglets and the effect of indomethacin at therapeutic dose. *Pediatr. Res.*, 34, 366-369.

Pratico D., Lawson J.A., FitzGerald G.A. (1995). Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi-prostaglandin F_{2α}. *J. Biol. Chem.*, 270, 9800-9808.

Pratico D., Smyth E.M., Violi F., FitzGerald G.A. (1996). Local amplification of platelet function by 8-epi prostaglandin F_{2α} is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J. Biol. Chem.*, 271, 14916-14924.

Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. (1987). Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 181-187.

Rao G.N., Berk B.C. (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.*, 70, 593-599.

Resink T.J., Scott-Burden T., Buhler F.R. (1989). Activation of phospholipase A₂ by endothelin in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 158, 279-286.

Reynolds E.E., Mok L.L.S. (1990). Role of thromboxane A₂ / prostaglandin H₂ receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252, 915-921.

Reynolds E.E., Mok L.L.S., Kurokawa S. (1989). Phorbol ester dissociates endothelin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 160, 868-873.

Roth G.J., Machuga E.T., Strittmatter P. (1981). The heme-binding properties of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.*, 256, 10018-10022.

Rubanyi G.M., Polokoff M.A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.*, 46, 325-415.

Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M. (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.*, 250, H822-H827.

Ryter S.W., Pacifici R.E., Davies K.J.A. (1990). Constitutive and inducible repair systems in oxidative stress. In: *Biological Oxidation Systems*. Reddy C.C., Hamilton G.A., Madyastha K.M. (ed.). Academic Press Inc. San Diego. Vol II, pp.929-952.

Salahudeen A., Badr K., Morrow J.D., Roberts II L.J. (1995). Hydrogen peroxide induces 21-aminosteroid-inhibitable F₂-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 6, 1300-1303.

Schilling W.P., Elliott S.J. (1992). Ca²⁺ signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol.*, 262, H1617-H1630.

Schimke I., Griesmacher A., Weigel G., Holshutter H.G., Muller M.M. (1992). Effects of reactive oxygen species on eicosanoid metabolism in human endothelial cells. *Prostaglandins*, 43, 281-292.

Shasby D.M., Yorek M., Shasby S.S. (1988). Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood*, 72, 491-499.

Simonson M.S. (1993). Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.*, 73, 375-411.

Smith W.L. (1986). Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Ann. Rev. Physiol.*, 48, 251-262.

Smith W.L. (1987). Localization of enzymes responsible for prostaglandin formation. In: *Handbook of Eicosanoids: Prostaglandins and Related Lipids*. Willis A.L. (ed.). CRC Press, Boca Raton. Vol IA, pp.175-184.

Smith W.L., Marnett L.J., DeWitt D.L. (1991). Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol. Ther.*, 49, 153-179.

Southorn P.A., Powis G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.*, 63, 381-408.

Takahashi K., Nammour T.M., Fukunaga M., Ebert J., Morrow J.D., Roberts II J.L., Hoover R.L., Badr K.F. (1992). Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F_{2α} in the rat; Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J. Clin. Invest.*, 90, 136-141.

Tappel A.L. (1962). Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vit. Hormones*, 20, 493-510.

Tate R.M., Morris H.G., Schroeder W.R., Repine J.E. (1984). Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J. Clin. Invest.*, 74, 608-613.

Taylor A., Davies K.J.A. (1987). Protein oxidation and loss of protease activity may lead to cataract formation in the aged lens. *Free Rad. Biol. Med.*, 3, 371-377.

Teoule R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. Rad. Biol. & Rel. Studies Phys. Chem. Med.*, 51, 573-589.

Tesfamarian B. (1994). Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 383-391.

Turrens J.F., Freeman B.A., Levitt J.G., Crapo J.D. (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.*, 217, 401-410.

Ullrich V., Haurand M. (1983). Thromboxane synthase as a cytochrome P₄₅₀ enzyme. *Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res.*, 11, 105-110.

Van Der Ouderra F.J., Buytenhek M., Nugteren D.H., Van Dorp D.A. (1977). Purification and characterization of prostaglandin synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta*, 487, 315-331.

Vane J.R., Anggard E.E., Botting R.M. (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. *New Engl. J. Med.*, 323, 27-36.

Varma S.D., Chand D., Sharma Y.R., Kuck J.F.Jr, Richards R.D. (1984). Oxidative stress on lens and cataract formation: role of light and oxygen. *Curr. Eye Res.*, 3, 35-57.

Wagner R.S., Weare C., Jin N., Mohler E.R., Rhoades R.A. (1997). Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-Prostaglandin(PG) $F_{2\alpha}$ in rat aortic rings. *Prostaglandins*, 54, 581-599.

Walsh S.W., Wang Y., Jesse R. (1993). Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 169, 1007-1012.

Wang Z., Ciabattini G., Créminon C., Lawson J., FitzGerald G.A., Patrono C., Maclouf J. (1995). Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$ excretion in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 94-100.

Warner B.B., Wispé J.R. (1992). Free radical-mediated diseases in pediatrics. *Sem. Perinat.*, 16, 47-57.

Warso M.A., Lands W.E.M. (1983). Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br. Med. Bull.*, 39, 277-280.

Wefers H. (1987). Singlet oxygen in biological systems. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 18, 91-104.

Wei E.P., Kontos H.A., Beckman J.S. (1996). Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am. J. Physiol.*, 271, H1262-H1266.

Weiss S.J., Turk J., Needleman P. (1979). A mechanism for the hydroperoxide-mediated inactivation of prostacyclin synthetase. *Blood*, 53, 1191-1196.

Williams C.S., DuBois R.N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am. J. Physiol.*, 270, G393-G400.

Wolin M.S., Messina E.J., Kaley G. (1989). Involvement of prostaglandins in arteriolar vasodilation to peroxides. *Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res.*, 19, 281-284.

Yagi K., Matsuoka S., Ohkawa H., Ohishi N., Takevchi Y., Kakai H. (1977). Lipoperoxide level of the retina of the chick embryo exposed to high concentration of oxygen. *Clin. Chim. Acta.*, 80, 355-360.

Yamazaki I. (1974). Peroxidase. In: *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Hayaishi O. (ed.). Academic Press, New York. pp.535-558.

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415.

Yura T., Fukunaga M., Grygorczyk R., Makita N., Takahashi K., Badr K.F. (1995). Molecular and functional evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res.*, 23, 237-239.