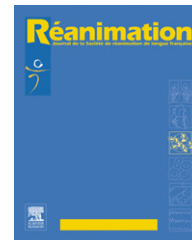




Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/REAURG/>



MISE AU POINT

Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres Endothelial dysfunction: Involvement of reactive oxygen species

O. Huet, J. Duranteau*

UFR de Bicêtre, département d'anesthésie–réanimation chirurgicale, CHU de Bicêtre, université Paris-Sud, 78, rue du Général-Leclerc, 94275 Le-Kremlin-Bicêtre cedex, France

Disponible sur Internet le 6 mai 2008

MOTS CLÉS

Sepsis ;
Inflammation ;
Endothélium ;
Stress oxydatif

Résumé Au cours de la dernière décennie une meilleure connaissance de la physiopathologie du sepsis a permis de mettre en exergue le rôle fondamental que jouait l'endothélium. Initialement décrit comme étant une simple frontière entre le sang et les tissus, il apparaît maintenant clair que l'endothélium est un organe à part entière avec des fonctions qui lui sont propres comme la régulation du tonus vasomoteur ou l'interaction active avec les éléments figurés ou non du sang. Lors du sepsis, de nombreuses études ont mis l'accent sur une atteinte de la cellule endothéliale. Cette atteinte qualifiée de dysfonction semble participer, au même titre que les organes nobles (cœur, reins, foie, poumons), à l'apparition du syndrome de défaillance multiviscérale. De ce fait, des études cliniques se sont spécifiquement intéressées au traitement de la dysfonction endothéliale, afin d'améliorer le pronostic des patients atteints de choc septique. Si les acteurs de la réaction inflammatoire comme le TNF- α ont bien été étudiés au cours du sepsis, le rôle des radicaux libres (de l'oxygène ou du nitrogène) est moins bien connu. Cela est principalement dû au fait qu'il est difficile de les caractériser directement à cause de leur demi-vie extrêmement courte. Cependant en évaluant indirectement la balance pro-oxydante/antioxydante, il a été démontré en réanimation qu'il existait un déséquilibre en faveur d'un état pro-oxydant témoignant d'une augmentation du stress oxydant et que ce déséquilibre était corrélé à la gravité des malades. Les radicaux libres de l'oxygène ont un rôle de second messenger dans une grande majorité des voies de signalisation intracellulaire. Cependant, de par leur particularité physicochimique, ils sont très cytotoxique et peuvent entraîner directement des lésions des protéines, de l'ADN et des membranes lipidiques. Ils ont aussi une cytotoxicité indirecte en intervenant dans la régulation de voies de signalisations cellulaires. Cela a été bien décrit en ce qui concerne la régulation de l'adhésion leucocytaire, du tonus vasculaire et de certains facteurs transcriptionnels comme le NF- κ B. Au cours du sepsis, l'endothélium va donc être une des cibles principales des radicaux libres. Les lésions endothéliales, qui en découlent, interviennent directement dans la survenue du syndrome de

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jacques.duranteau@kb.u-psud.fr (J. Duranteau).

KEYWORDS

Sepsis;
Inflammation;
Endothelium;
Oxidative stress

défaillance multiviscérale. Des études cliniques s'employant à antagoniser les radicaux libres semblent montrer des résultats encourageants, bien qu'actuellement cela soit insuffisant pour en tirer des conclusions pour améliorer la prise en charge des patients atteints de choc septique.
© 2008 Publié par Elsevier Masson SAS pour la Société de réanimation de langue française.

Summary During the last decade a better knowledge of sepsis pathophysiology stressed the central part taken by endothelium in this syndrome. Described at the beginning as a "simple" border between blood components and tissues, it now appears to be an organ with proper functions like vascular tone regulation and blood cells interaction. During sepsis it has well been described that endothelial dysfunction might occur. This dysfunction seems to participate, as well as other organs like the heart, kidneys or lung, in the occurrence of multiple organ failure syndrome. There fore clinical trial have tested treatment of endothelial dysfunction to improve septic shock patient prognosis. If inflammatory factors like TNF- α have well been studied during sepsis it is not the case of reactive oxygen or nitrogen species. This is principally due to the extreme instability of these molecules which make then difficult to characterize directly. However, It is possible to characterize oxidative stress by measuring pro-oxidant and antioxidant parameters. The imbalance between these parameters, in favor of a pro-oxidant state, witnesses a deleterious effect of oxidative stress. This pro-oxidant state has been described in patients during septic shock and has been correlated to the severity of the disease. Reactive oxygen species take part as a second messenger in a wide range of cellular signaling pathways. But due to their chemical properties they can induce direct cell damage acting on DNA, proteins or lipidic membrane. They can also have an indirect cytotoxicity by interfering in intracellular pathways. This has well been described concerning leukocytes adhesion, vascular tone or transcriptional factors like NF- κ B. So endothelium can be considered to be a prior target of reactive oxygen species during sepsis. Therefore, endothelial dysfunction that occur during sepsis, plays a key part in the occurrence of multiple organ failure syndrome. Clinical trials scavenging reactive oxygen species during species shows encouraging results. But they are not sufficient to change our clinical practices during septic shock for the moment.

© 2008 Publié par Elsevier Masson SAS pour la Société de réanimation de langue française.

Introduction

L'endothélium peut être considéré comme un organe à lui seul. En effet, le corps humain contient approximativement 10^{13} cellules endothéliales représentant un poids estimé à 1 kg et couvrant une surface de 4000 à 7000 m². L'endothélium est le garant de la qualité de la macrocirculation et de la microcirculation. C'est un acteur essentiel dans la régulation du tonus vasculaire, il participe au maintien de la viscosité sanguine, il assure une fonction anticoagulante et il participe à l'angiogénèse.

L'endothélium participe activement à la défense de l'organisme contre des pathogènes. Lors de l'agression tissulaire par des agents pathogènes, les cellules endothéliales recrutent les leucocytes, permettent leur migration vers les sites infectés, libèrent des médiateurs inflammatoires et favorisent localement des phénomènes de coagulation, afin de prévenir la dissémination hématogène de l'infection. Mais cette réponse localisée endothéliale adaptée face à une infection focale, peut se généraliser lors d'un sepsis sévère. Ces troubles microcirculatoires pourront alors induire des dysfonctions d'organes.

Le sepsis induit des modifications phénotypiques de l'endothélium par plusieurs mécanismes. Au cours du sepsis, les cellules endothéliales subissent d'une part, des modifications des débits macro- et microcirculatoires associés à des modifications d'oxygénation et, d'autre part, l'effet de nombreux médiateurs libérés au cours du conflit pathogène-organisme incluant les espèces radicalaires de l'oxygène, les cytokines, le complément, les protéases

sériques. Il en résulte des modifications fonctionnelles et structurelles de l'endothélium (Fig. 1). Les modifications fonctionnelles provoquent une altération du tonus vasculaire, une augmentation de l'adhésion cellulaire (adhésion leucocytaire et plaquettaire), une augmentation de la perméabilité capillaire et un état procoagulant de l'endothélium. Les modifications structurelles aboutissent à un œdème cellulaire et à une fuite plasmatique du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel. Ces troubles microcirculatoires, s'ils persistent, pourront alors induire des dysfonctions d'organes.

Les espèces radicalaires jouent un rôle central dans la physiologie vasculaire et cellulaire. En particulier, ils ont un rôle majeur dans la survenue de la dysfonction endothéliale. Initialement, les espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) sont apparues comme étant des éléments possédant des effets toxiques directs capables de participer à l'apparition des lésions endothéliales lors des processus carcinologiques, de l'athérosclérose, de l'hypertension artérielle, de la maladie diabétique et des états de choc. Mais, les espèces radicalaires possèdent également des propriétés bénéfiques indispensables à l'homéostasie cellulaire. Actuellement, les travaux portant sur les ERO permettent d'affirmer qu'au-delà de l'effet toxique qu'elles peuvent avoir, elles ont également un rôle de second messenger dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

Les ERO et les espèces radicalaires de l'azote (ERN) les plus souvent impliquées en physiopathologie sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), l'oxyde nitrique ($^{\bullet}NO$) et le per-

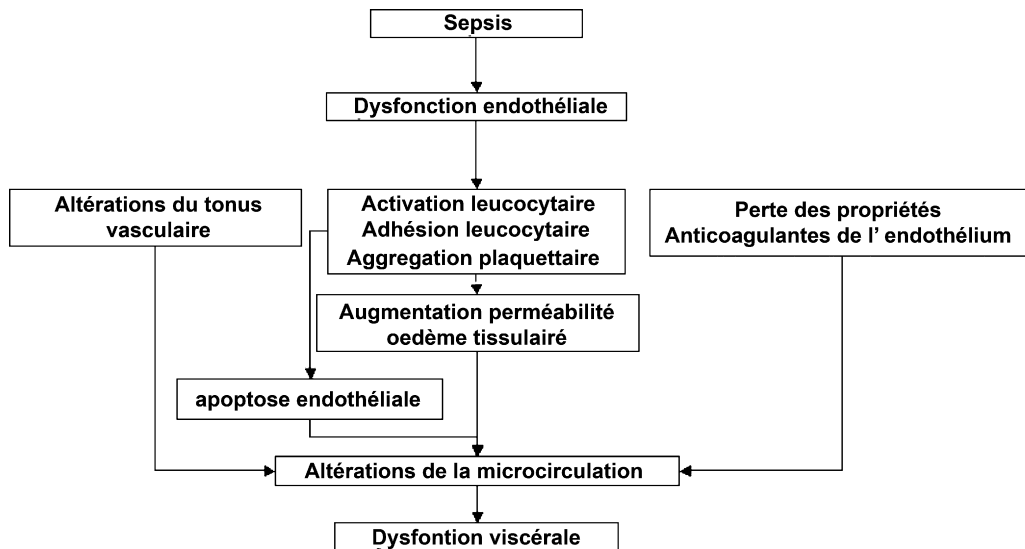
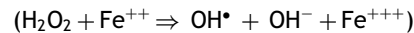


Figure 1 Schéma des principaux mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par le sepsis.

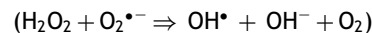
oxynitrite (ONOO⁻) (Fig. 2). L'anion superoxyde résulte de la réduction de l'oxygène par différentes oxydases, en particulier par les NADPH-oxydase microsomiales et plasmiques, la NADH-déshydrogénase mitochondriale (complexe I de la chaîne respiratoire) et par des composés de type quinones/semiquinones naturelles, ubiquinone de la chaîne respiratoire (complexe III de la chaîne respiratoire). Le NO^{*} est normalement produit au niveau de l'endothélium par la NO synthase (eNOS), mais lors des états inflammatoires, l'expression de la NOS inductible au niveau des macrophages et des cellules musculaires lisses contribue à une production massive de *NO.

Quand O₂^{*-} se trouve en présence de *NO, il peut rapidement interagir avec celui-ci pour donner une espèce radicalaire hautement réactive, le ONOO⁻ (Fig. 2). Celui-ci est un médiateur important de la peroxydation lipidique et de la nitration protéique. En l'absence de *NO immédiatement accessible, O₂^{*-} est rapidement transformé par la superoxyde dismutase (SOD) en une ERO plus stable, mais hautement diffusible, le H₂O₂. Cette ERO est ensuite

détoxifiée en H₂O soit par les catalases ou par la glutathione peroxidase (GSH-Px) (Fig. 2). Les effets de O₂^{*-} et du H₂O₂ sur la fonction vasculaire dépendent des quantités produites. Formés au niveau intracellulaire en faibles quantités, ils agissent comme des seconds messagers intracellulaires et modulent des réponses tels que la croissance vasculaire. Au cours d'un stress oxydatif, c'est-à-dire lors d'un déséquilibre de la balance entre la production de pro-oxydants et la défense antioxydante de l'organisme, ces ERO peuvent induire des lésions lipidiques, protéiques et de l'ADN. En effet, le H₂O₂ se transforme en radical hydroxyle (OH^{*}) par la réaction de Fenton :



ou celle ou cycle de Haber-Weiss :



en présence de métaux de transition tels que le fer et le cuivre. Le radical OH^{*} est la plus réactive des ERO en particulier, vis-à-vis des lipides membranaires en déclenchant la peroxydation lipidique.

Formation des radicaux libres lors du sepsis

Lors d'une infection, l'environnement cellulaire est extrêmement riche en facteurs inflammatoires notamment en ERO.

Les radicaux libres peuvent être formés par les leucocytes recrutés sur le foyer infectieux ou par la cellule endothéliale elle-même.

Lors de la réponse inflammatoire, il existe un phénomène classiquement appelé *oxygen burst* qui correspond à la libération massive de radicaux libres de l'oxygène par les polynucléaires neutrophiles (PNN). Ce phénomène a notamment été démontré in vitro sur des PNN en suspension. Lorsque les PNN sont activés par un facteur pro-inflammatoire, ils peuvent libérer jusqu'à 360 nanomol/h d'O₂^{*-}, alors que non stimulés cette production est quasi

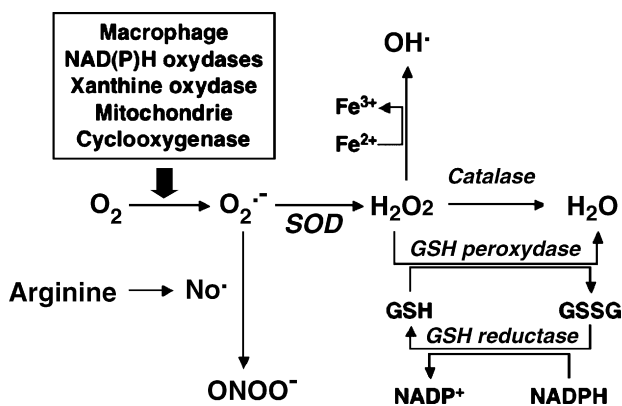


Figure 2 Schéma de formation et de régulation des espèces radicalaires. NO oxyde nitrique, anion superoxyde (O₂^{*-}), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), radical hydroxyle (OH^{*}), peroxynitrite (ONOO⁻), GSH glutathion.

nulle [1]. Par ailleurs, l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales favorise leur activation et les sensibilise à l'action de médiateurs pro-inflammatoires tel que le TNF- α . Cela entraîne une libération massive par les leucocytes de radicaux libres une à trois heures après leurs exposition [2].

Les cellules endothéliales produisent-elles aussi des radicaux libres grâce à l'action d'enzymes comme la NADPH-oxydase, les myéloperoxydases, la xanthine-oxydase et les complexes I et III de la chaîne respiratoire. Cette production peut aussi être assurée par la mitochondrie au niveau du complexe III. Lors d'une stimulation inflammatoire, il a été démontré in vitro que la cellule endothéliale produisait des radicaux libres en quantités significatives. Des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) produisent de manière significative de l'anion superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène lors d'une exposition à du TNF- α , de l'intéleukine-1 ou de l'interféron- γ . Cette production est dose dépendante [3,4]. Elle s'observe aussi en présence de substances vasoactive comme la bradykinine. Dans les cinq minutes qui suivent sa liaison à son récepteur, la bradykinine entraîne une production d'anion superoxyde par la cellule endothéliale [5]. Il a aussi été démontré que des HUVEC exposées à du plasma de patients en état de choc septique produisaient une quantité significativement plus importante de peroxyde d'hydrogène comparés à des cellules exposées à du plasma de volontaires sains. Cette production était positivement corrélée à la gravité des patients (SAPS II, SOFA score, mortalité en réanimation) [6]. Une production excessive de radicaux libres de l'oxygène s'observe aussi au cours des phénomènes d'ischémie reperfusion [7–9].

Rôle des radicaux libres dans l'altération du tonus vasculaire

Le sepsis induit des altérations macro- et microcirculatoires [10–12]. Il est en particulier responsable d'une altération de la vasorégulation et des altérations de la microcirculation avec une diminution de la perfusion capillaire. Les modifications fonctionnelles de la cellule endothéliale sont des phénomènes centraux de ces altérations [13].

De nombreux modèles de choc septique chez l'animal ont montré que le sepsis induit des altérations précoces de la microcirculation [10,14–16]. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette altération des débits microcirculatoires. Après injection d'*Escherichia coli* ou d'endotoxine, les artérioles de premier et de deuxième ordre se vasoconstrictent, alors que les artérioles plus distales de troisième et quatrième ordre sont vasodilatées. Cette vasoconstriction des artérioles les plus proximales limite le flux des globules rouges. Le tonus vasomoteur est régulé par la combinaison de mécanismes endothélium-dépendants et endothélium-indépendants. Les cellules endothéliales produisent des molécules vasoactives qui régulent le tonus vasculaire et contribuent au contrôle de la pression artérielle. Ces molécules comprennent des substances vasodilatatrices (le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline) et des substances vasoconstrictrices (l'endothéline, le thromboxane A2 et le facteur d'activation plaquettaire) [17,18]. Au cours du sepsis, la balance locale vasoconstricteurs–vasodilatateurs (NO et

prostacycline [PGI₂]) penche en faveur des médiateurs vasoconstricteurs. Ultérieurement, le développement de la réponse inflammatoire conduit à l'activation de la NO synthase (NOs) inductible et de la cyclo-oxygénase inductible au niveau des cellules musculaires qui compense le déficit en substance vasodilatatrice.

C'est en agissant sur la formation du NO que les ERO vont intervenir dans la genèse des troubles de la vasomotricité constatés lors du sepsis. Les radicaux libres de l'oxygène et notamment l'anion superoxyde vont modifier l'activité de la NOs qu'elle soit constitutive ou inductible. La NOs est une flavoenzyme calcium dépendante qui va produire du NO grâce à l'oxydation de la L-arginine par l'oxygène. L'augmentation intracytoplasmique de la production des radicaux libres peut entraîner un découplage de la NO synthase endothéliale (eNOs) aboutissant à la formation d'O₂^{•-} [19]. En effet, la NOs est une enzyme formée par un complexe homodimérique qui comporte un site avec une activité réductase et un site avec une activité oxydase. La formation du NO résulte de la succession de deux réactions :

- la première consiste en la formation d'oxygène moléculaire qui va aller hydroxyler le substrat guanidino-nitrogéné de la L-arginine formant ainsi le N^G-hydroxyl-L-arginine ;
- la seconde consiste en une oxydation du N^G-hydroxyl-L-arginine formant ainsi du NO et de la L-citrulline.

Ces deux réactions nécessitent la présence du substrat BH₄, en l'absence de celui-ci les électrons qui passent du site reductase vers le site oxygénase sont dérivés vers l'oxygène moléculaire pour former de l'O₂^{•-}. Lors de l'augmentation de la production d'ERO intracellulaire, il peut y avoir formation de peroxy-nitrique (ONOO⁻). Le peroxy-nitrique va oxyder le substrat BH₄ formant ainsi une molécule inactive (BH₂). La disparition de BH₄ va alors entraîner le « découplage » de la NOs. Une fois découplée la NOs forme de l'O₂^{•-} majorant ainsi le stress oxydatif préexistant [20–23].

Le découplage de la NOs est donc responsable de deux phénomènes : une perte de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium et une augmentation du stress oxydatif par la formation d'O₂^{•-}.

Ainsi, les ERO jouent donc un rôle central dans l'apparition des troubles vasomoteurs constatés au court du choc septique.

Rôle des radicaux libres dans l'adhésion leucocytaire

L'activation des cellules endothéliales par les médiateurs inflammatoires provoque une adhésion leucocytaire avec des troubles de la perméabilité. En effet, l'endothélium exprime à sa surface des molécules d'adhésion leucocytaire (E-sélectine, P-sélectine, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* [VCAM-1]) [24,25]. Les polynucléaires vont adhérer aux cellules endothéliales et produire des radicaux libres de l'oxygène et des protéases responsables de lésions endothéliales. Un certain nombre de données expérimentales semblent indiquer que les ERO jouent un rôle important dans la régulation de la production des molécules d'adhésions leucocytaires. La pro-

duction de VCAM et de *chemoattractant protein-1* (MCP-1) induite par le TNF- α est contrôlée par un mécanisme dépendant de la présence d'ERO [26]. En effet, cette production est inhibée par l'utilisation de substances antioxydantes ou l'inhibition de la NADPH-oxydase. La production de P-sélectine induite par TNF- α est-elle aussi sous la dépendance de la production d'ERO par la NADPH-oxydase et la xanthine-oxydase [27]. L'altération des cellules endothéliales provoque une perte de leurs propriétés structurales et membranaires aboutissant à un œdème cellulaire et à une fuite plasmatique du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel. Le rôle du TNF- α et de la thrombine a été clairement démontré dans la genèse de l'augmentation de la perméabilité endothéliale [28–30]. La constitution de ces œdèmes cellulaires endothéliaux et interstitiels provoque une diminution de la lumière capillaire et une augmentation des résistances hydrauliques capillaires (augmentation de la viscosité sanguine) qui contribuent à l'altération de la perfusion capillaire et au développement d'une hypoxie tissulaire [31]. La formation de l'œdème endothélial est intimement liée à la concentration de calcium intracellulaire. Les ERO vont agir en perturbant les mécanismes de régulation de la concentration de calcium intracellulaire. Ce phénomène est lié à l'action des radicaux libres à la fois sur les enzymes contrôlant l'influx intracellulaire de calcium dans la cellule comme la phospholipase C [32] et sur les enzymes qui contrôlent les flux de calcium intracellulaire comme la calcium-ATPase du reticulum endoplasmique [33].

Cet œdème interstitiel va majorer les phénomènes d'ischémie entraînant ainsi une augmentation de la production de radicaux libres pérennisant ainsi le cercle vicieux.

Rôle des radicaux libres dans l'activation des facteurs transcriptionnels

Les ERO vont jouer un rôle important dans la régulation de la voie d'activation des facteurs transcriptionnels et notamment dans la régulation de l'apoptose.

La modulation de l'activité NF- κ B par les radicaux libre de l'oxygène peut se faire soit directement, soit par l'intermédiaire des *mitogen-activated protein kinases* (MAP-kinases) ou par l'intermédiaire de la protéine kinase C (PKC).

Les radicaux libres de l'oxygène vont activer la PKC par trois mécanismes différents. Directement en oxydant le domaine de régulation entraînant une augmentation de la PKC indépendamment de la concentration intracellulaire de calcium [34]. Les radicaux libres vont aussi activer la PKC par l'intermédiaire de l'activation de la phospholipase C (PLC), de la phospholipase D (PLD) et de la phospholipase A₂ (PLA₂) qui vont agir sur l'activité de la PKC [35]. Enfin, les radicaux libres vont agir en phosphorylant les différentes isoformes de la PKC entraînant leur activation. Ainsi, il a été démontré que H₂O₂ était responsable de la phosphorylation des isoformes α , β et γ de la PKC entraînant leur activation.

L'activation des MAP kinases (ERK, JNK) peut se faire par l'intermédiaire de leur protéine régulatrice p21^{ras} qui est activée par les radicaux libres de l'oxygène [36]. Par ailleurs, les radicaux libres peuvent directement phosphoryler ERK1/2.

Les radicaux libres de l'oxygène vont agir sur l'activation du NF- κ B en diminuant les taux cellulaires de glutathion. En effet, lors d'une augmentation du stress oxydatif, il existe une mise en jeu des défenses antioxydantes et notamment du glutathion dont les taux sont diminués en cas de stress oxydant prolongé. Il a été montré que le GSH avait une action inhibitrice directe sur l'activation du NF- κ B par le TNF- α [37,38]. Le GSH va aussi moduler la formation de molécules d'adhésion (ICAM). Il peut donc directement agir sur la voie du NF- κ B, mais aussi sur les facteurs transcriptionnels résultant de son activation. Cette modulation du NF- κ B par le GSH va donc limiter la production de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-8, l'IL-1 et le NO et l'expression des gènes de l'inflammation.

Les variations du ratio glutathion (GSH)/glutathion dissulfide (GSSG) vont aussi agir sur l'*activator protein-1* (AP-1). Cette interaction a été démontrée sur différents types cellulaires. Il a notamment été montré que l'activation d'AP-1 par le LPS est inhibé par la N-acétyl-cystéine (précurseur de GSH) [39] et que la surexpression de la γ -glutamincystéine synthétase inhibait l'activation de AP-1 [40]. Le nombre de sites de liaisons à l'ADN d'AP-1 sont diminués chez les souris transgéniques surexprimant le gène de la glutathion peroxydase par rapport aux souris témoins au décours d'épreuves d'ischémie-réoxygénation [41].

Les radicaux libres vont donc activer les voies pro-apoptiques de façon directe et indirecte participant là aussi à la persistance de la dysfonction endothéliale.

Conclusions

L'endothélium est l'une des premières cibles de la réponse inflammatoire liée au sepsis. Les modifications du tonus vasculaire, l'adhésion leucocytaire et plaquettaire, les troubles de la perméabilité capillaire et un état procoagulant conduisent à une réduction du nombre de capillaires perfusés, une augmentation de l'hétérogénéité de la perfusion capillaire et une diminution des capacités tissulaires d'extraction en oxygène. De plus en plus d'arguments incitent à penser que l'altération de la microcirculation joue un rôle crucial dans la genèse des défaillances viscérales. Le fait que ces altérations de la microcirculation aient été constatées expérimentalement au niveau du foyer infectieux, mais également à distance de celui-ci plaide en faveur de leur rôle essentiel dans le développement du syndrome de défaillance multiviscérale. Ces dernières années, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été testées chez les patients en choc septique pour limiter la dysfonction endothéliale. En ciblant un paramètre ayant un rôle à plusieurs niveaux de la dysfonction endothéliale et donc en agissant sur la réponse pro-inflammatoire, en atténuant les interactions endothélium–leucocytes et l'apoptose endothéliale on pourrait peut-être obtenir des résultats cliniques significatifs. Les radicaux libres semblent répondre à cette description. Cependant, même si certaines études antagonisant les radicaux libres semblent montrer des résultats encourageant, il n'y a pas à l'heure actuelle, de preuve formelle d'un bénéfice à employer des antioxydants. Il s'agit là d'un nouveau challenge thérapeutique à visée endothéliale à explorer dans les années à venir.

Références

- [1] Tauber AI, Babior BM. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. *J Clin Invest* 1977;60(2):374–9.
- [2] Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 1987;80(6):1550–60.
- [3] Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986;137(10):3295–8.
- [4] Corda S, et al. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(6):762–8.
- [5] Holland JA, et al. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1990;143(1):21–5.
- [6] Huet O, et al. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. *Crit Care Med* 2007;35(3):821–6.
- [7] Therade-Matharan S, et al. Reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to reoxygenation after hypoxia and glucose depletion is mediated by ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(6):R1756–62.
- [8] Therade-Matharan S, et al. Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004.
- [9] Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988;263(3):1353–7.
- [10] Nakajima Y, et al. Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(8 Pt 1):1526–30.
- [11] De Backer D, et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(1):98–104.
- [12] Sakr Y, et al. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004;32(9):1825–31.
- [13] Vallet B. Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med* 2002;30(5 Suppl):S229–34.
- [14] Whitworth PW, et al. Hypoperfusion of the intestinal microcirculation without decreased cardiac output during live *Escherichia coli* sepsis in rats. *Circ Shock* 1989;27(2):111–22.
- [15] Garrison RN, et al. Microvascular changes explain the “two-hit” theory of multiple organ failure. *Ann Surg* 1998;227(6):851–60.
- [16] Tucker JJ, et al. Microvascular endothelial cell control of peripheral vascular resistance during sepsis. *Arch Surg* 1998;133(12):1335–42.
- [17] McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996;32(4):752–63.
- [18] Wanecek M, et al. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 2000;407(1–2):1–15.
- [19] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87(10):840–4.
- [20] Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 2003;37(2):121–7.
- [21] Laursen JB, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103(9):1282–8.
- [22] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia: mechanisms, pathophysiological importance, and therapeutic interventions. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(5):529–37.
- [23] Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(6):H2484–8.
- [24] Carlos TM, et al. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol* 1997;61(3):279–85.
- [25] Cines DB, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91(10):3527–61.
- [26] Chen XL, et al. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(2):573–80.
- [27] Takano M, et al. Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(5):H2054–61.
- [28] Ferro TJ, et al. Endothelial barrier dysfunction and p42 oxidation induced by TNF-alpha are mediated by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):L979–88.
- [29] Ferro T, et al. Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(6):L1107–17.
- [30] Tirupathi C, et al. Synergistic effects of tumor necrosis factor-alpha and thrombin in increasing endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(4):L958–68.
- [31] Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary “no-reflow”. *Shock* 1997;8(1):2–7.
- [32] Az-ma T, Saeki N, Yuge O. Cytosolic Ca²⁺ movements of endothelial cells exposed to reactive oxygen intermediates: role of hydroxyl radical-mediated redox alteration of cell-membrane Ca²⁺ channels. *Br J Pharmacol* 1999;126(6):1462–70.
- [33] Lee C, Okabe E. Hydroxyl radical-mediated reduction of Ca²⁺-ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Jpn J Pharmacol* 1995;67(1):21–8.
- [34] Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca²⁺-phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(17):6758–62.
- [35] Natarajan V, Scribner WM, Taher MM. 4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1993;15(4):365–75.
- [36] Lakshminarayanan V, et al. Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272(52):32910–8.
- [37] Hall AG. Glutathione and the regulation of cell death. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:199–203.
- [38] Brown LA. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol* 1994;266(2 Pt 1):L172–7.
- [39] Tanaka C, et al. Redox regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression mediated by NF kappa B and AP-1 in human astrocytoma U373 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232(2):568–73.
- [40] Manna SK, Kuo MT, Aggarwal BB. Overexpression of gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1. *Oncogene* 1999;18(30):4371–82.
- [41] Ishibashi N, et al. Inflammatory response and glutathione peroxidase in a model of stroke. *J Immunol* 2002;168(4):1926–33.