

Mgr Marta Aleksandrowicz

**„WPLYW HIPOOSMOLARNEJ HIPONATREMII
NA REGULACJĘ NAPIĘCIA TĘTNICY
ŚRODKOWEJ MÓZGU SZCZURA”**

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. Ewa Koźniewska – Kołodziejska

Pracownia Neurochirurgii Doświadczalnej
Zespołu Kliniczno – Badawczego Neurochirurgii
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Im. M. Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2014

Chciałabym złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Pani dr hab. Ewie Koźniewskiej-Kołodziejskiej za życzliwą pomoc, cenne rady i liczne wskazówki merytoryczne udzielone w trakcie realizacji niniejszej pracy.

Składam także podziękowania Panu Prof. dr hab. Krzysztofowi Dołowemu, kierownikowi Zakładu Fizyki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego za umożliwienie wykonania badań metodą patch-clamp oraz Pani dr Beacie Dworakowskiej za nieoceniony wkład w przeprowadzenie tych badań i pomoc w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników.

Badania finansowane ze środków projektu badawczego N401 190 32/3924 przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na lata 2007-2010 oraz z tematu statutowego Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	1
1. WSTĘP	4
1.1. WPROWADZENIE.....	4
1.2. FIZJOLOGICZNA REGULACJA NAPIĘCIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU	9
1.2.1. REGULACJA METABOLICZNA	10
1.2.2. REGULACJA CHEMICZNA	12
1.2.3. REGULACJA NAPIĘCIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU ZALEŻNA OD ZMIAN CIŚNIENIA PERFUZYJNEGO – ZJAWISKO AUTOREGULACJI	13
1.2.4. REGULACJA NAPIĘCIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU ZALEŻNA OD ŚRÓDBŁONKA	15
1.2.5. REGULACJA NERWOWA	19
1.3. KANAŁY POTASOWE W NACZYNIACH KRWIONOŚNYCH MÓZGU	21
2. CEL PRACY.....	25
3. MATERIAŁ I METODY	26
3.1. BADANIA NA IZOLOWANEJ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU SZCZURA	26
3.1.1. IZOLACJA TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU I JEJ PRZYGOTOWANIE DO BADAŃ W KOMORZE ARTERIOGRAFU	26
3.1.2. WYWOŁANIE HIPONATREMII	27
3.1.3. OZNACZANIE STĘŻENIA JONÓW SODU W OSOCZU ZWIERZĄT Z PRZEWLEKŁĄ HIPONATREMIĄ	28
3.1.4. BADANIA REAKTYWNOŚCI TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU	29
3.2. BADANIA NA MIOCYTACH IZOLOWANYCH Z TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU SZCZURA	31
3.2.1. IZOLACJA MIOCYTÓW Z TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU	31
3.2.2. BADANIE ELEKTROFIZJOLOGII KANAŁÓW BK _{Ca} ZA POMOCĄ	

TECHNIKI PATCH – CLAMP	32
3.3. SUBSTANCJE UŻYWANE W BADANIACH	33
3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	34
4. WYNIKI	35
4.1. OCENA FIZJOLOGICZNEGO STANU NACZYŃ UŻYTYCH DO DOŚWIADCZEŃ	35
4.2. WPLYW KRÓTKOTRWALEJ I PRZEWLEKLEJ HIPONATREMII NA AUTOREGULACJĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU ORAZ NA REGULACJĘ METABOLICZNĄ TEJ TĘTNICY I REGULACJĘ ZALEŻNĄ OD TLENKU AZOTU	36
4.3. WPLYW 8Br-cGMP NA ŚREDNICĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU W KRÓTKOTRWALEJ HIPONATREMII	41
4.4. UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH BK _{Ca} W ODPOWIEDZI TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU NA TLENEK AZOTU W KRÓTKOTRWALEJ HIPONATREMII	42
4.5. UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH W ODPOWIEDZI TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU NA KWASICĘ W KRÓTKOTRWALEJ HIPONATREMII	44
4.6. BADANIA ELEKTROFIZJOLOGII KANAŁÓW POTASOWYCH BK _{Ca} ZA POMOCĄ TECHNIKI PATCH – CLAMP	46
4.6.1. WPLYW KRÓTKOTRWALEJ HIPONATREMII NA PRZEWODNOŚĆ KANAŁÓW BK _{Ca} W KOMÓRKACH MIĘŚNI GŁADKICH TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU	46
4.6.2. WPLYW NS1619 NA AKTYWACJĘ KANAŁÓW BK _{Ca} W KOMÓRKACH MIĘŚNI GŁADKICH TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU W NORMONATREMII I W HIPONATREMII	47
5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	53
5. DYSKUSJA	54
6.1. UZASADNIENIE WYBORU OBIEKTU BADAŃ I UŻYTYCH METOD DOŚWIADCZALNYCH.....	54
6.2. WPLYW KRÓTKOTRWALEJ I PRZEWLEKLEJ HIPONATREMII NA AUTOREGULACJĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU ORAZ JEJ REGULACJĘ METABOLICZNĄ I REGULACJĘ ZALEŻNĄ OD TLENKU	

AZOTU.....	56
6.2.1. WPŁYW HIPONATREMII NA AUTOREGULACJĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU	57
5.2.2. WPŁYW HIPONATREMII NA REGULACJĘ METABOLICZNĄ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU.....	58
6.2.3. WPŁYW HIPONATREMII NA REGULACJĘ NAPIĘCIA TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU ZALEŻNĄ OD TLENKU AZOTU	61
6.3. UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH W MECHANIZMACH REGULUJĄCYCH NAPIĘCIE TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU W HIPONATREMII	64
6.4. MECHANIZMY ADAPTACYJNE	67
7. WNIOSKI	70
8. PIŚMIENNICTWO	71
9. STRESZCZENIE	87
9. a. ABSTRACT	91

WYKAZ SKRÓTÓW

AA	–	kwasy arachidonowe
Ach	–	acetylocholina
ASICs	–	kanały jonowe wykrywające kwasy
ADH	–	hormon antydiuretyczny (wazopresyna)
ADMA	–	<i>N, N</i> -dimetyl-L-arginina
ADP	–	adenozynodifosforan
AMP	–	adenozynomonofosforan
ANP	–	przedsionkowy peptyd natriuretyczny
4-AP	–	4-aminopirydyna
AQ2	–	akwaporyna-2
ATP	–	adenozyno-5'-trifosforan
AVP	–	wazopresyna argininowa
BK _{Ca}	–	kanały potasowe o dużej przewodności aktywowane jonami wapnia
BNP	–	mózgowy peptyd natriuretyczny
8Br-cGMP	–	8-Bromo-guanozyna 3'5' cykliczny monofosforan
cAMP	–	cykliczny adenzynomonofosforan
Ca _v	–	kanały wapniowe bramkowane potencjałem
cGMP	–	cykliczny guanozynomonofosforan
CGRP	–	peptyd związany z genem kalcytoniny
COX	–	cyklooksygenaza
COX-2	–	cyklooksygenaza typu 2
CNP	–	peptyd natriuretyczny typu C
CSW	–	mózgowy zespół utraty soli
EDHF	–	czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego
EDRF	–	czynnik rozkurczający pochodzenia śródbłonkowego
EDTA	–	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
EET	–	kwasy epoksyeikozatrienowe
EGTA	–	kwasy etylenoglikolo- <i>O-O'</i> -bis(2-aminoetylo)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctowy
EPOX	–	epoksygenaza
ET-1	–	endotelina typu 1

ET _A	–	receptor typu A endoteliny
ET _B	–	receptor typu B endoteliny
HEPES	–	kwasy 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo] etanosulfonowy
20-HETE	–	kwasy 20-hydroksyeikozatetraenowy
IK _{Ca}	–	kanały potasowe o średniej przewodności aktywowane jonami wapnia
K _{ATP}	–	kanały potasowe zależne od ATP
K _{Ca}	–	kanały potasowe aktywowane jonami wapnia
K _{DR}	–	opóźnione prostownicze kanały potasowe
K _{IR}	–	wewnątrzprostownicze kanały potasowe
K _V	–	kanały potasowe bramkowane potencjałem
L-NAME	–	ester metyloxy-nitro-L-argininy
L-NMMA	–	<i>N</i> -monometyl-L-arginina
L-NNA	–	<i>N</i> -nitro-L-arginina
LOX	–	lipooksygenaza
MCA	–	tętnica środkowa mózgu
MOPS	–	kwasy 3 – morfolinopropanosulfonowy
MOPS-PSS	–	sól fizjologiczna buforowana kwasem 3 – morfolinopropanosulfonowym
NMDA	–	kwasy <i>N</i> -metylo- <i>D</i> -asparaginowy
NO	–	tlenek azotu
NOS	–	syntaza tlenu azotu
eNOS	–	śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
iNOS	–	indukowalna syntaza tlenu azotu
nNOS	–	neuronalna syntaza tlenu azotu
NS 1619	–	1,3-dihydro-1-[2-hydroksy-5-(trifluorometylo) fenylo] -5 - (trifluorometylo)-2H-benzimidazol-2-on
PaCO ₂	–	ciśnienie parcjale dwutlenku węgla we krwi tętniczej
PaO ₂	–	ciśnienie parcjale tlenu we krwi tętniczej
PGI ₂	–	prostanglandyna I ₂ (prostacyklina)
PKA	–	kinaza białkowa A
PKG	–	kinaza białkowa G

SAC	–	kanały kationowe aktywowane rozciąganiem mięśni gładkich
RVD	–	regulacyjne zmniejszenie objętości komórki
SIADH	–	zespół niewłaściwego wydzielania hormonu antydiuretycznego
SK _{Ca}	–	kanały potasowe o małej przewodności aktywowane jonami wapnia
SNAP	–	S-nitroso-N-acetyl-DL-penicylamina
TEA ⁺	–	jon tetraetylamoniowy
VIP	–	wazoaktywny polipeptyd jelitowy
TXA ₂	–	tromboksan A ₂
V ₂ R	–	receptor wazopresyny typu 2 (nerkowy)

1. WSTĘP

1.1. WPROWADZENIE

Jon sodu jest głównym kationem przestrzeni zewnątrzkomórkowej odgrywającym istotną rolę w utrzymaniu równowagi wodno-elektrolitowej, osmotycznej i kwasowo-zasadowej. Zakres stężenia tego jonu w płynie zewnątrzkomórkowym w warunkach fizjologicznych wynosi 136-145 mM. Obniżenie stężenia jonu sodu poniżej 136 mM nazywane jest hiponatremią, zaś jego podwyższenie powyżej 145 mM hipernatremią [Fried i Palevsky, 1997]. Hiponatremia jest dość powszechnym zaburzeniem gospodarki wodno-elektrolitowej obserwowanym w warunkach szpitalnych. Dotyczy ona aż 28% pacjentów hospitalizowanych, 21% zgłaszających się do izby przyjęć i około 7% pacjentów ambulatoryjnych [Hawkins, 2003]. Hiponatremia diagnozowana jest w takich schorzeniach jak: niedoczynność tarczycy, zastoinowa niewydolność serca, marskość wątroby, zespół nerczycowy, nowotwory oraz choroby ośrodkowego układu nerwowego [Vaidya i wsp., 2010; Miller, 2006]. Grupę ryzyka stanowią także pacjenci, którym podawane są leki antydepresyjne, przeciwpadaczkowe i diuretyki pętlowe. Sporadycznie hiponatremia może się także rozwijać po zastosowaniu leków rutynowo używanych w praktyce klinicznej takich jak: leki przeciwnadciśnieniowe, antybiotyki oraz inhibitory pompy protonowej [Liamis i wsp., 2008].

Ponadto, do hiponatremii może dojść z przewodnienia, jak ma to miejsce w polidypsji u pacjentów psychiatrycznych lub u sportowców. Ten ostatni przypadek dotyczy w szczególności biegaczy długodystansowych, u których przedłużająca się aktywność fizyczna łączy się z utratą jonów sodu z potem, przy jednoczesnym dostarczeniu dużej ilości płynów hipotonicznych jakimi są napoje podawane im w celu wyrównania bilansu wodnego [Kormann i wsp., 2012]. Ryzyko rozwoju hiponatremii wzrasta także z wiekiem. U osób po 50 roku życia jest ono 2-krotnie większe w porównaniu do 30-latków, natomiast po 70 roku życia wzrasta aż 5-krotnie [Hawkins, 2003]. Hiponatremia jest jednak najbardziej niebezpieczna dla pacjentów neurochirurgicznych, u których diagnozowana jest często po krwawieniu podpajęczynówkowym, urazach mózgu, krwawieniu śródmózgowym oraz zapaleniu opon mózgowych [Rabinstei i Wijdics, 2003]. Zaburzenie to może wystąpić również u pacjentów po operacjach podwzgórza i tylnego płata przysadki, gdzie wytwarzany i

uwalniany jest hormon antydiuretyczny [Rabinstein i Wijdicks, 2003; Hasan i wsp., 1990].

Ze względu na starzenie się populacji, wzrost częstości chorób nowotworowych i cywilizacyjnych oraz coraz częstsze stosowanie leków przeciwdepresyjnych, wydaje się, że hiponatremia będzie problemem o coraz większym znaczeniu.

W patogenezie hiponatremii istotną rolę odgrywają podstawowe hormony biorące udział w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej takie jak: hormon antydiuretyczny (ADH) oraz peptydy natriuretyczne. Do tych ostatnich należą: przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP, ang. *atrial natriuretic peptide*) oraz peptydy natriuretyczne typu B (BNP, ang. *brain natriuretic peptide*) i C (CNP, ang. *C-type natriuretic peptide*) [Rabinstein i Wijdicks, 2003].

Nadmierne wydzielanie wazopresyny najczęściej obserwuje się w zespole niewłaściwego wydzielania hormonu antydiuretycznego (SIADH, ang. *syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion*). Oprócz SIADH, do wzrostu wydzielania ADH może dochodzić w warunkach: hipowolemii, obniżonego ciśnienia tętniczego krwi, bólu, stresu oraz u pacjentów przyjmujących leki takie jak: karbamazepina, klofibrat, chlorpropamid, opioidy, cyklofosfamid, haloperydol i amitryptylina [Yeates i wsp., 2004]. Nerkowe działanie wazopresyny związane jest z pobudzeniem jej receptora - V_2 w kanalikach dystalnych i cewkach zbiorczych nerek. Aktywacja tego receptora prowadzi do wzmożonej produkcji cAMP, pobudzenia kinazy białkowej A (PKA) i syntezy akwaporyny 2 (AQ2). Cząsteczki AQ2 są wbudowywane do błony komórkowej kanalików po stronie luminalnej, co zwiększa resorpcję wody [Treschan i Peters, 2006] i może prowadzić do hiponatremii z rozcieńczenia. Wśród peptydów natriuretycznych największą rolę w rozwoju hiponatremii odgrywa przedsionkowy peptyd natriuretyczny, który jest wydzielany z przedsionków serca w odpowiedzi na ich rozciągnięcie krwią powracającą do serca w okresie rozkurczu. W nerkach, ANP hamuje reabsorpcję jonów sodu i wody działając bezpośrednio na kanaliki zbiorcze oraz pośrednio przez hamowanie wydzielania aldosteronu. ANP, obok pozostałych peptydów natriuretycznych, bierze udział w patogenezie mózgowego zespołu utraty soli (CSW, ang. *cerebral salt wasting*). CSW charakteryzuje się nadmiernym wydalaniem jonów sodu z moczem, zwiększoną diurezą i zmniejszeniem zewnątrzkomórkowej objętości płynów ustrojowych. Hipowolemia może wtórnie prowadzić do wzmożonego wydzielania hormonu antydiuretycznego pomimo hamującego wpływu ANP na

uwalnianie ADH z tylnego płata przysadki [Rabinstein i Wijdicks, 2003; Coenraad i wsp., 2007].

Niezależnie od tego czy hiponatremia jest wywołana przez wazopresynę lub hormony natriuretyczne, jatrogennie czy polekowo, jej objawy są związane z zaburzeniami homeostazy ośrodkowego układu nerwowego. Obniżenie stężenia jonów sodu w surowicy prowadzi bowiem do wytworzenia gradientu osmotycznego, co powoduje przesunięcie wody do przestrzeni wewnątrznaczyniowej, a następnie do wnętrza komórek. Skutkiem tego jest hiposmotyczny obrzęk mózgu, prowadzący do wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego, a w skrajnych przypadkach do upośledzenia mikrokrążenia i objawów niedotlenienia mózgu. Wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego może prowadzić także do wgłobienia mózgu, którego pierwszą oznaką jest często zatrzymanie oddechu chorego [Ayus i wsp., 2006].

Objawy hiponatremii zależą od tempa obniżenia stężenia jonów Na^+ w osoczu. Do typowych objawów towarzyszących hiponatremii należą: ból głowy, ospałość, niepokój, nudności, wymioty, gorączka oraz dezorientacja. Poważniejsze objawy takie jak otępienie, śpiączka a nawet śmierć mogą pojawić się u pacjentów z ciężką, nagle pogarszającą się hiponatremią [Rabinstein, 2006].

Hiposmotyczny obrzęk komórek mózgu zapoczątkowuje odpowiedź obronną w postaci „regulacyjnego zmniejszenia objętości komórki” (RVD, ang. *regulatory volume decrease*). Proces ten polega na usuwaniu z komórek, w pierwszym rzędzie, jonów K^+ i Cl^- , a następnie organicznych substancji osmotycznie czynnych (idiogennych osmotolitów) takich jak tauryna, glicyna, glutamina, mioinozytol, sorbitol i kreatyna [Pasantés-Morales i wsp., 2006]. RVD w dużym stopniu zmniejsza obrzęk hiposmotyczny, ale jego skuteczność ujawnia się w pełni dopiero po upływie około 48 godzin od momentu powstania obrzęku. W związku z tym hiponatremia rozwijająca się w czasie krótszym niż 48 godzin, określana jako ostra lub krótkotrwała, jest związana z większym obrzękiem mózgu, poważniejszymi objawami i większym ryzykiem śmierci. Natomiast w hiponatremii rozwijającej się powoli, w czasie dłuższym niż 48 godzin, zwanej przewlekłą, RVD pozwala na skuteczne ograniczenie obrzęku mózgu. Dzięki temu objawy hiponatremii przewlekłej są łagodniejsze [Rabinstein, 2006; Pasantés-Morales i wsp., 2006].

Inną potencjalną, ale bardzo niebezpieczną konsekwencją hiponatremii jest demielinizacja struktur mostu, do której dochodzi w wyniku zbyt szybkiego wyrównania natremii. Szybkie wyrównanie osmolalności surowicy przed

znormalizowaniem poziomu idiogennych osmolitów może prowadzić do odwodnienia mózgu, gwałtownego zmniejszenia objętości komórek mózgu i w związku z tym mechanicznego rozerwania mieliny aksonów [Rabinstein, 2006; Verbalis i Gullans, 1991]. Objawy demielinizacji mostu pojawiają się po 2-3 dniach od momentu wyrównania stężenia jonów sodu. Należą do nich upośledzenie mowy, utrudnienie połykania i zaburzenia świadomości [Rabinstein, 2006].

Dotychczasowe badania dotyczące wpływu hiponatremii na ośrodkowy układ nerwowy koncentrowały się wokół zagadnień związanych z obrzękiem mózgu. Wiadomo jednak, że homeostaza ośrodkowego układu nerwowego w znacznej mierze zależy od prawidłowej funkcji naczyń krwionośnych mózgu. Nieliczne badania doświadczalne dotyczące wpływu hiponatremii na krążenie mózgowe dotyczyły mikrokrążenia i hiponatremii przewlekłej. Wykazano w nich, że przewlekła hiponatremia ma niekorzystny wpływ na mikrokrążenie mózgowe [Arieff i wsp., 1995]. W hiponatremii wywołanej za pomocą wazopresyny u samic szczurów zaobserwowano zmniejszenie przepływu krwi przez mózg oraz mózgowego zużycia tlenu [Koźniewska i wsp., 1995]. U zwierząt tych obserwowano także zmniejszony udział tlenku azotu (NO, ang. *nitric oxide*) i prostacykliny (PGI₂) w regulacji mikroprzepływu mózgowego w porównaniu do grupy kontrolnej [Koźniewska i wsp., 2001]. Co więcej, niezależnie od płci i obecności wazopresyny nie obserwowano zwiększenia mikroprzepływu w odpowiedzi na podanie acetylocholin, co sugeruje dysfunkcję śródbłonna naczyń. Prowadzono także badania nad wpływem obniżonej osmolarności na naczynia krwionośne mózgu i wyizolowane z nich komórki mięśni gładkich. Obniżenie osmolarności z 300 do 250 mOsmol/L powodowało skurcz tętnicy podstawnej mózgu szczura w wyniku depolaryzacji komórek mięśni gładkich i aktywacji bramkowanych napięciem kanałów Ca²⁺ [Welsh i wsp., 2000]. Jednocześnie, w badaniach przeprowadzonych nad wpływem obrzęku hipoosmotycznego na funkcje miocytów izolowanych z tętnicy podstawnej mózgu szczura wykazano, że w warunkach hipoosmotycznych dochodzi do zahamowania wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych K_{IR} ale nie obserwuje się zmian w przewodności opóźnionych prostowniczych kanałów potasowych K_{DR} [Wu i wsp., 2007]. Trudno jest ocenić jak te wyniki przekładają się na regulację napięcia naczyń krwionośnych mózgu, tym bardziej że w przytoczonych badaniach obniżano stężenie jonów Na⁺ do 90 mM. Tak niskie stężenie Na⁺ we krwi pacjentów stanowi poważne zagrożenie życia [Rabinstein, 2006].

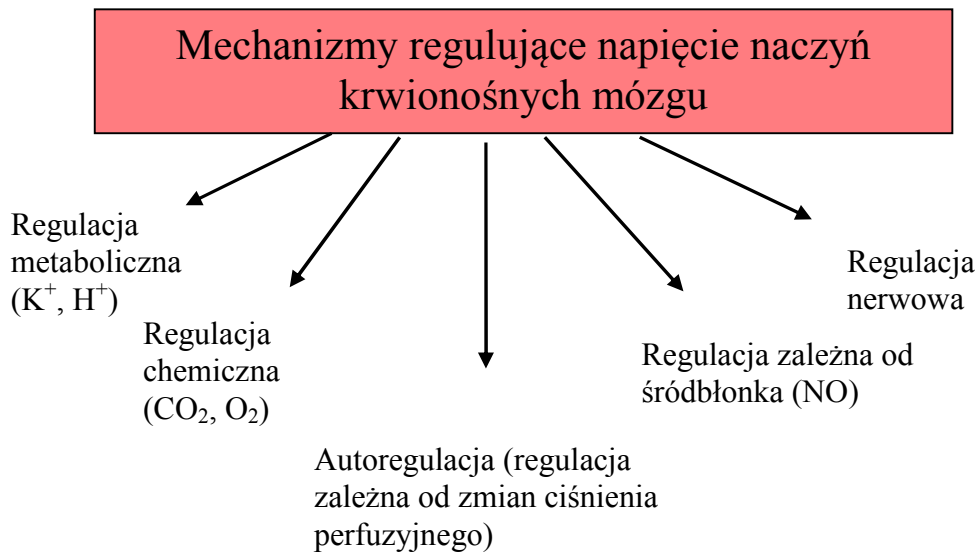
Brak w piśmiennictwie spójnych danych, na podstawie których można by określić jaki wpływ wywiera hiponatremia na regulację napięcia naczyń krwionośnych mózgu, a także istotny udział układu naczyniowego mózgu w wewnętrzczaszkowej homeostazie ciśnieniowo-objętościowej skłoniły mnie do podjęcia badań doświadczalnych stanowiących przedmiot tej pracy.

W celu oddzielenia wpływu hiponatremii na naczynia krwionośne mózgu od wpływu hormonów natriuretycznych i wazopresyny, które są niezbędne do wywołania hiponatremii doświadczalnej, wybrałam do swoich badań model hiponatremii *in vitro*.

Zanim przejdę do przedstawienia zagadnień bezpośrednio związanych z moimi badaniami, omówię podstawy fizjologicznej regulacji napięcia naczyń krwionośnych mózgu.

1.2. FIZJOLOGICZNA REGULACJA NAPIĘCIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU

Napięcie naczyń krwionośnych mózgu, decydujące o oporze naczyniowym oraz wielkości przepływu krwi w mikrokrążeniu jest zależne od: czynników metabolicznych, stężenia tlenu i dwutlenku węgla we krwi tętniczej, dokrewnej funkcji komórek śródbłonna, wielkości ciśnienia perfuzyjnego oraz mediatorów uwalnianych z zakończeń nerwowych w naczyniach krwionośnych mózgu (ryc. 1). Każdy z tych czynników modyfikuje napięcie naczyń krwionośnych, a przepływ krwi przez mózg w danym momencie jest skutkiem jednoczesnego oddziaływania wielu z nich. Niektóre z tych czynników mają wspólne szlaki biochemiczne na poziomie komórek mięśni gładkich. Przykładem tego jest rozszerzenie naczyń krwionośnych mózgu pod wpływem działania siły ścinającej (ang. *shear stress*) i hiperkapnii, w którym przynajmniej w części pośredniczy ten sam czynnik – tlenek azotu [White i wsp., 1999].



Ryc. 1. Zestawienie czynników biorących udział w regulacji napięcia naczyń krwionośnych mózgu.

1.2.1. Regulacja metaboliczna

Najważniejszy mechanizm regulujący przepływ krwi przez mózg jest związany z zapotrzebowaniem mózgu na dostarczane wraz z krwią substraty energetyczne - tlen i glukozę. Wzrost zapotrzebowania metabolicznego związany z pobudzeniem aktywności neuronalnej wymaga lokalnego rozszerzenia naczyń krwionośnych mózgu i wzrostu przepływu krwi. Regulacja metaboliczna (nazywana również przekrwieniem czynnościowym) definiowana jest więc jako zależność pomiędzy zapotrzebowaniem mózgu na tlen i glukozę, a objętością przepływającej krwi. Zwiększenie przepływu krwi przez mózg w czasie wzmożonej aktywności neuronalnej możliwe jest dzięki współdziałaniu neuronów, astrocytów i naczyń krwionośnych mózgu. Struktury te razem tworzą jednostkę nerwowo-naczyniową [Girouard i Iadecola, 2006].

Pomimo tego, że mózg posiada niewielkie rezerwy energii i wymaga ciągłego dostarczania glukozy i tlenu przez krew [Roy i Sherrington, 1890], obniżenie stężenia O_2 i glukozy w mózgu nie jest bezpośrednim czynnikiem prowadzącym do rozszerzenia naczyń mózgowych [Attwell i Iadecola, 2002]. Czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost przepływu krwi przez mózg w stanach zwiększonego zapotrzebowania mózgu na substraty energetyczne są: zwiększenie stężenia adenozyliny wytwarzanej podczas katabolizmu ATP, wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ i H^+ , a także tlenek azotu, tlenek węgla oraz pochodne kwasu arachidonowego o działaniu naczyniorozszerzającym takie jak prostaglandyny i kwas epoksyekoizatrienowy - EET [Girouard i Iadecola, 2006].

Wykazano, że zarówno obniżenie stężenia ATP w komórce jak i zwiększenie stężenia wspomnianej wyżej adenozyliny pochodzącej z rozpadu ATP prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych mózgu [Pelligrino i wsp., 1996]. W obu przypadkach dochodzi do otwarcia kanałów potasowych wrażliwych na ATP (K_{ATP}). Ponadto, adenozylina otwiera kanały potasowe aktywowane jonami Ca^{2+} (K_{Ca}), co również prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych [Di Tullio i wsp., 2004; Kleppisch i Nelson, 1995; Li i Cheung, 2000]. Następnymi czynnikami biorącymi udział w regulacji metabolicznej są jony K^+ i H^+ . W warunkach fizjologicznych aktywność neuronalna prowadzi do wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ do około 12 mM. Jednakże wzrost stężenia tych jonów już do 8-10 mM powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych mózgu *in vitro* i *in vivo*. Uwarunkowane jest to otwarciem wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych (K_{IR}) [Girouard i Iadecola,

2006]. Naczyniorozszerzający efekt zewnątrzkomórkowego wzrostu stężenia jonów H^+ związany jest natomiast z otwarciem kanałów potasowych o dużej przewodności (BK_{Ca}) aktywowanych przez Ca^{2+} oraz kanałów K_{ATP} [Lindauer i wsp., 2003]. Wykazano, że aktywacja tylko jednego z tych kanałów wystarczy do rozszerzenia tętnicy środkowej mózgu w odpowiedzi na obniżenie pH, a zahamowanie aktywności obu kanałów całkowicie znosi odpowiedź na kwasicę. Ponadto, rozszerzenie tętnicy środkowej mózgu w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów H^+ zależne jest od tlenku azotu uwalnianego z okołonaczyniowych nitrergicznych zakończeń nerwowych. Według Lindauer i wsp. [2001] w tę odpowiedź nie jest zaangażowany NO pochodzenia śródbłonkowego.

Wydaje się, że NO pochodzenia neuronalnego bierze również udział w rozszerzeniu wewnątrzmożgowych naczyń krwionośnych związanym z aktywacją zakończeń glutaminergicznych i receptora NMDA. W wyniku połączenia glutaminianu z tymi receptorami dochodzi do napływu jonów Ca^{2+} do komórki [Girouard i Iadecola, 2006]. Wzrost wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} aktywuje neuronalną syntazę NO, co prowadzi do zwiększenia wytwarzania NO i rozszerzenia naczyń. Wydaje się jednak, że NO odgrywa raczej rolę modulującą, niż pośredniczącą w rozszerzeniu mięśni gładkich związanym ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym. Jest to tzw. przyzwalająca (ang. *permissive*) rola tlenku azotu, co oznacza, że w obecności NO inne czynniki naczyniorozszerzające wykazują silniejsze działanie [Schuh-Hofer i wsp., 2001]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} powoduje także aktywację fosfolipazy A2 i produkcję kwasu arachidonowego (AA, ang. *arachidonic acid*). Wśród metabolitów kwasu arachidonowego największe znaczenie w regulacji metabolicznej mają prostanoidy zależne od aktywacji cyklooksigenazy a także EET, powstający w wyniku działania szlaku zależnego od epoksygenazy cytochromu P450. EET hiperpolaryzuje komórki mięśni gładkich poprzez otwieranie kanałów potasowych BK_{Ca} [Girouard i Iadecola, 2006].

Omawiając regulację metaboliczną krążenia mózgowego trudno nie wspomnieć o interesującej koncepcji wysuniętej przez Pellerin'a i Magistretti'ego w 1994 roku. Według tej koncepcji w przekrwieniu czynnościowym bierze udział mleczan uwalniany z astrocytów, które podczas aktywacji receptorów NMDA wytwarzają ATP w beztlenowych przemianach glukozy. Mleczan dyfunduje do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, z której jest pobierany przez neurony i może służyć w nich jako substrat do syntezy ATP w cyklu Krebsa. Zwiększenie stężenia mleczanu w przestrzeni

zewnątrzkomórkowej powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych i zwiększenie przepływu krwi w mikrokrażeniu [Pellerin i Magistretti, 1994; Pellerin i Magistretti, 2012].

1.2.2. Regulacja chemiczna

Regulacja ta dotyczy wpływu zmian stężenia tlenu (O_2) i dwutlenku węgla (CO_2) we krwi tętniczej na przepływ krwi przez mózg. Obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu we krwi tętniczej (PaO_2) poniżej 50 mmHg powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych mózgu, wystarczające do dwukrotnego zwiększenia przepływu krwi przez mózg. Wzrost PaO_2 prowadzi natomiast do skurczu tych naczyń [Johnston i wsp., 2003]. Jest to jednak efekt stosunkowo niewielki. Badania doświadczalne wykazały, że oddychanie 85-100 % tlenem prowadzące do podwyższenia PaO_2 do 300 – 350 mmHg powoduje zmniejszenie przepływu mózgowego jedynie o 13% w porównaniu z wartością kontrolną, mierzoną przy fizjologicznym PaO_2 wynoszącym 90 mmHg [Kety i Schmidt, 1948]. Zwiększenie przepływu krwi przez mózg w warunkach hipoksji związane jest z obniżeniem poziomu ATP i otwarciem kanałów K_{ATP} w mięśniach gładkich [Taguchi i wsp., 1994]. Ponadto, niedotlenienie prowadzi do zwiększenia produkcji tlenu azotu i adenozyliny, co również powoduje rozszerzenie naczyń [Golanov i Reis, 1997]. W warunkach przewlekłego niedotlenienia może dojść do zwiększenia przepływu mózgowego dzięki pobudzeniu angiogenezy i zwiększeniu gęstości naczyń włosowatych w mózgu [Xu i Lamanna, 2006].

Zmiany ciśnienia parcjalnego we krwi tętniczej drugiego z gazów oddechowych - CO_2 również wywierają wpływ na napięcie ściany naczyń krwionośnych mózgu. Wzrost ciśnienia parcjalnego CO_2 we krwi tętniczej ($PaCO_2$) powyżej 40 mmHg (hiperkapnia) i w rezultacie spadek zewnątrzkomórkowego pH powoduje rozszerzenie naczyń mózgowych i wzrost przepływu krwi przez mózg. Natomiast zmniejszenie $PaCO_2$ poniżej tego poziomu (hipokapnia) prowadzi do skurczu naczyń i zmniejszenia przepływu krwi przez mózg [Reivich, 1964]. Silne działanie dwutlenku węgla rozszerzające naczynia krwionośne wykazano w badaniu, w którym inhalacja 5% CO_2 powodowała wzrost przepływu krwi przez mózg do 50%, a inhalacja 7% CO_2 prowadziła do 100% wzrostu przepływu krwi [Kety i Schmidt, 1948]. Główny mechanizm odpowiedzialny za rozszerzenie naczyń podczas hiperkapnii wydaje się być związany z wpływem zwiększenia zewnątrzkomórkowego stężenia H^+ na mięśnie

gładkie naczyń krwionośnych. Jony H^+ mogą bezpośrednio aktywować kanały potasowe w mięśniach gładkich prowadząc do ich hiperpolaryzacji lub mogą indukować uwalnianie naczyniorozszerzających prostaglandyn, adenozyliny lub NO z neuronów, gleju i naczyń krwionośnych [Iadecola, 1992; Pickard i Mackenzie, 1973]. Szczególnie istotna wydaje się być rola NO. Wykazano, że odpowiedź na kwasice oddechową jest osłabiona w wyniku działania nieselektywnych inhibitorów syntazy NO [Iadecola i wsp., 1994]. Bardziej szczegółowe badania pokazały, że odpowiedź naczyń krwionośnych mikrokrażenia mózgu na wzrost $PaCO_2$ jest zachowana po uszkodzeniu śródbłonna [Wang i wsp. 1994]. Wskazuje to na istotną rolę nNOS w tej odpowiedzi, podobnie jak ma to miejsce w kwasicy metabolicznej. Tym bardziej, że w kolejnej pracy Wang i wsp. [1995] wykazali, że po zastosowaniu selektywnego inhibitora nNOS – 7-nitroindazolu odpowiedź mikrokronaczyń mózgu na kwasicę zmniejszyła się o 60 %. Nie wydaje się zatem, aby rozszerzenie naczyń krwionośnych mózgu w odpowiedzi na wzrost $PaCO_2$ było zależne od śródbłonna.

1.2.3. Regulacja napięcia naczyń krwionośnych mózgu zależna od zmian ciśnienia perfuzyjnego – zjawisko autoregulacji

Autoregulacja przepływu krwi przez mózg to zdolność naczyń krwionośnych mózgu do utrzymania względnie stałego przepływu krwi, pomimo zmian ciśnienia perfuzyjnego. Autoregulacja jest obecna w wielu obszarach naczyniowych, ale w szczególności dobrze jest rozwinięta w mózgu. Aby utrzymać stały przepływ krwi przez mózg w warunkach zmian ciśnienia perfuzyjnego, naczynia rozszerzają się gdy to ciśnienie obniża się i ulegają skurczeniu gdy ciśnienie perfuzyjne rośnie. Przepływ krwi przez mózg jest relatywnie stały przy zmianach ciśnienia perfuzyjnego w zakresie od 50 do 150 mmHg. Poniżej i powyżej tej wartości autoregulacja zanika, a przepływ krwi zmienia się proporcjonalnie do zmian ciśnienia perfuzyjnego zgodnie z prawem Poiseuille'a [Paulson i wsp., 1990]. Obniżenie ciśnienia perfuzyjnego poniżej dolnej granicy autoregulacji może spowodować niedotlenienie mózgu jeżeli na skutek zmniejszenia przepływu krwi dojdzie do zmniejszenia transportu tlenu do komórek mózgu. Zmniejszenie przepływu krwi jest bowiem kompensowane poprzez zwiększenie ekstrakcji tlenu z krwi. Maksymalna ekstrakcja tlenu jest osiągnięta przy ciśnieniu tętniczym około 40 mmHg, poniżej tego poziomu mogą pojawić się kliniczne objawy niedokrwienia [Mesh i Gewertz, 1990; Iadecola, 1998].

Mechanizm autoregulacji nie jest do końca poznany. Wśród wielu hipotez wyjaśniających to zjawisko, najbardziej rozpowszechnione są hipoteza metaboliczna i miogenna. Pierwsza z nich zakłada, że zmniejszenie przepływu krwi w momencie zmniejszenia ciśnienia perfuzyjnego prowadzi do zwiększenia stężenia (w wyniku zmniejszenia tempa wypłukiwania) czynników naczyniorozszerzających pochodzenia metabolicznego - jonów K^+ , H^+ , adenozyiny a także CO_2 w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [Paulson i wsp., 1990]. Umożliwia to powrót przepływu krwi do poziomu sprzed obniżenia ciśnienia perfuzyjnego. Podobnie, w momencie zwiększenia ciśnienia perfuzyjnego zwiększa się tempo wypłukiwania wymienionych wyżej czynników metabolicznych, co prowadzi do zmniejszenia ich stężenia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, skurczu naczyń krwionośnych i zmniejszenia przepływu krwi do poziomu sprzed zmiany ciśnienia perfuzyjnego. Za teorią metaboliczną przemawia fakt, że autoregulacja ujawnia się po około 5 min od momentu zmiany ciśnienia perfuzyjnego [Paulson i wsp., 1990].

Druga z hipotez - miogenna, sformułowana przez Baylissa, zakłada, że mechanizm autoregulacji zależny jest od właściwości mięśni gładkich, które spełniają funkcję mechanoreceptora. Według tej hipotezy rozciągnięcie mięśni gładkich ściany naczyniowej wywołane wzrostem ciśnienia perfuzyjnego pobudza te mięśnie do skurczu i pozwala na utrzymanie przepływu krwi na niezmiennym poziomie pomimo wzrostu ciśnienia perfuzyjnego. Podobnie, zmniejszenie ciśnienia perfuzyjnego i mniejsze rozciągnięcie mięśni gładkich prowadzi do rozszerzenia naczyń [Bayliss, 1902].

Wyniki badań ostatnich 20 lat dostarczają argumentów na poparcie hipotezy Bayliss'a. Po pierwsze, w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych wykazano obecność specjalnego typu kanałów kationowych aktywowanych rozciąganiem mięśni gładkich (ang. *stretch-activated channels*, SAC) [Davis i wsp., 1992]. Otwarcie tych kanałów pod wpływem zwiększenia ciśnienia wewnątrznaczyniowego prowadzi do wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórce i do skurczu mięśni gładkich. Ponadto, depolaryzacja komórek mięśni gładkich związana z napływem jonów Ca^{2+} przez kanały SAC może prowadzić do aktywacji kanałów wapniowych zależnych od potencjału [McCarron i wsp., 1997]. Wydaje się, że w tą mechanotransdukcję zaangażowany jest szlak kinazy białka Rho. Gokina i wsp. wykazali, że zastosowanie selektywnego inhibitora kinazy RhoA (Y-27632) hamuje wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w odpowiedzi

na zwiększenie ciśnienia napędowego w mózgowych tętnicach szczura [Gokina i wsp., 2005].

Depolaryzacja błony komórkowej związana ze zwiększeniem ciśnienia wewnątrznaczyniowego powoduje także wzrost częstotliwości rozbłysków i fal wapniowych [Jaggar, 2001]. Rozbłyski wapniowe (ang. *calcium sparks*) są spowodowane chwilowym, lokalnym wzrostem stężenia jonów wapnia uwalnianych z siateczki sarkoplazmatycznej w związku z otwarciem kanałów rianodynowych. W przeciwieństwie do jonów wapnia napływających do komórki przez kanały wapniowe bramkowane napięciem, nie mają one znaczącego wpływu na wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce. Uważa się, że pod ich wpływem dochodzi do otwarcia znajdujących się w sąsiedztwie siateczki sarkoplazmatycznej kanałów BK_{Ca} co prowadzi do hiperpolaryzacji i hamowania skurczu mięśni gładkich. Natomiast fale wapniowe (ang. *calcium waves*) stanowiące cykliczne wahania stężenia jonów wapnia w komórce wydają się nasilać skurcz mięśni. Według Mufti i wsp. [2010] fale wapniowe wzmagają skurcz naczyń w odpowiedzi na wzrost ciśnienia wewnątrznaczyniowego poprzez zwiększenie fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny [Mufti i wsp., 2010; Knot i Nelson, 1995; Knot i Nelson, 1998; Zhong i wsp., 2010].

1.2.4. Regulacja napięcia naczyń krwionośnych mózgu zależna od śródbłónka

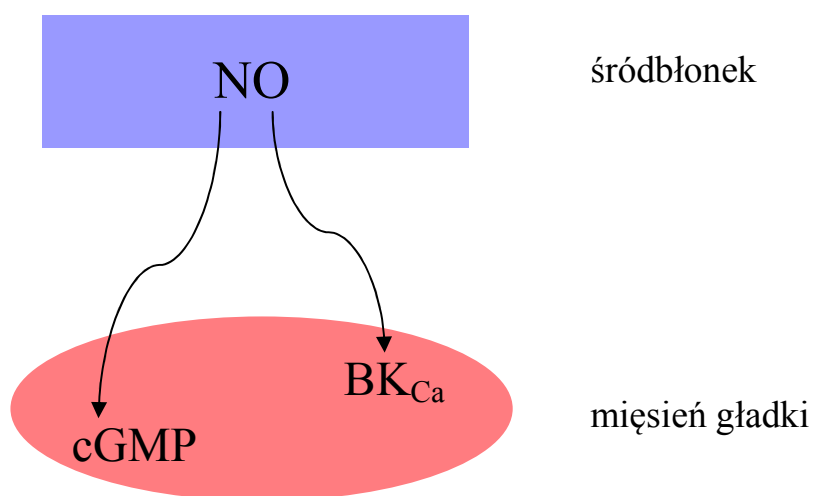
Śródbłonek odgrywa istotną rolę w regulacji przepływu krwi przez mózg. Uwalnia on czynniki o działaniu rozszerzającym lub zwężającym naczyń krwionośnych [Andresen i wsp., 2006]. W warunkach fizjologicznych wpływ śródbłónka na napięcie mięśni gładkich naczyń polega przede wszystkim na wydzielaniu związków naczyniorozszerzających takich jak: tlenek azotu, prostacyklina oraz czynnik EDHF (ang. *endothelium-derived hyperpolarization factor*). Niewątpliwie najważniejszym z tych czynników jest tlenek azotu początkowo określany jako czynnik EDRF [ang. *endothelium-derived relaxing factor*] [Palmer i wsp., 1987]. Podstawowym bodźcem pobudzającym uwalnianie NO z komórek śródbłónka jest napięcie ścinania, stanowiące siłę powstającą pod wpływem ruchu przepływającej krwi i oddziałującą bezpośrednio na wewnętrzną stronę ściany naczyniowej. Ponadto, wiele substancji humoralnych takich jak: acetylocholina, bradykinina, ATP, ADP, substancja P oraz agonista receptora adrenergicznego posiadających receptory zarówno w mięśniach gładkich jak i

w śródbłonku, rozszerza mózgowe naczynia krwionośne w wyniku pobudzenia uwalniania NO ze śródbłonka.

Tlenek azotu powstaje z L-argininy przy udziale syntazy tlenu azotu (NOS). Wyróżnia się trzy izoformy NOS: wspomnianą wcześniej syntazę neuronalną (nNOS lub NOS I), indukowaną (iNOS lub NOS II) oraz śródbłonkową (eNOS lub NOS III). W komórkach śródbłonka eNOS jest zlokalizowana głównie w kaweolach, których białkiem budującym jest kaweolina-1 [Andresen i wsp., 2006]. Związanie eNOS z tym białkiem powoduje zahamowanie produkcji NO. Aktywność syntazy NO w śródbłonku, a także syntazy neuronalnej, zlokalizowanej w neuronach i nerwach okołonaczyniowych jest zależna od stężenia jonów wapnia w komórce [Knowles i Moncada, 1994]. Kompleks jonów wapnia z kalmoduliną aktywuje eNOS poprzez rozerwanie jej połączenia z kaweoliną. W przeciwieństwie do eNOS i nNOS, których geny ulegają ekspresji konstytutywnie, iNOS jest indukowana w stanach zapalnych i generuje stosunkowo dużo tlenu azotu w porównaniu do pozostałych syntaz. Mechanizm aktywacji tej izoformy nie jest zależny od Ca^{2+} [Faraci i Heistad, 1998]. Aktywność syntaz konstytutywnych NO hamowana jest przez analogi L-argininy: *N*-monometyl-L-argininę (L-NMMA), *N*-nitro-L-argininę (L-NNA), metylowy ester *N*-nitro-L-argininy (L-NAME) i *N, N*-dimetyl-L-argininę (ADMA) [Faraci i Heistad, 1998]. Inhibitory te obniżają przepływ krwi przez mózg, wskazując, że toniczne uwalnianie NO odgrywa ważną rolę w regulacji podstawowego napięcia naczyń krwionośnych [Koźniewska i wsp., 1992; Iadecola i wsp., 1994].

Podstawowym mechanizmem prowadzącym do rozszerzenia tętnic i tętniczek mózgowych pod wpływem NO jest aktywacja cytozolowej cykazy guanylowej. Cykazy guanylowa katalizuje powstanie 3'5' cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP) warunkującego rozkurcz naczyń na drodze zależnej od kinazy białkowej G (PKG). Kinaza ta fosforyluje i moduluje aktywność białek enzymatycznych zależnych od stężenia jonów Ca^{2+} takich jak kinaza i fosfataza lekkich łańcuchów miozyny [Faraci i Sobey, 1999]. Ostatecznie aktywacja PKG prowadzi do zmniejszenia wrażliwości białek kurczliwych na jony Ca^{2+} i do zmniejszenia siły skurczu komórek mięśni gładkich [Yu i wsp., 2002; Sun i wsp., 2000; Andresen i wsp., 2006]. W tętnicy środkowej mózgu w odpowiedzi mięśni gładkich na NO obok cGMP zaangażowane są także kanały potasowe o dużej przewodności aktywowane jonami Ca^{2+} (BK_{Ca}) (ryc. 2). Oba mechanizmy uczestniczą w odpowiedzi mięśni gładkich na NO w porównywalnym stopniu i działają niezależnie od siebie. W badaniach Yu i wsp. [2002] wykazano, że

zablokowanie cykazy guanylowej nie ma wpływu na zdolność aktywacji BK_{Ca} przez NO. Równocześnie odpowiedź na analog cGMP nie była zmieniona przez inhibitor kanałów BK_{Ca} [Yu i wsp., 2002; Sun i wsp., 2000]. Wciąż niejasne jest jednak w jaki sposób tlenek azotu aktywuje kanały BK_{Ca}. Niektórzy badacze sugerują, że jest to działanie bezpośrednie [Mistry i Garland, 1998]. Bardziej prawdopodobne wydaje się jednak, że mechanizm ten związany jest z obniżeniem poziomu kwasu 20-hydroksyeikozatetraenowego (20-HETE), który fizjologicznie hamuje aktywność kanałów BK_{Ca}. NO wiążąc się z hemem w enzymach rodziny P-450 4A, hamuje aktywność ω-hydroksylazy - enzymu katalizującego powstanie 20-HETE z kwasu arachidonowego. Obniżenie stężenia 20-HETE prowadzi do zniesienia hamowania kanałów potasowych BK_{Ca} i rozkurczu mięśni gładkich. Mechanizm ten opisany pierwotnie w krążeniu nerkowym, występuje także w tętnicy środkowej mózgu szczura [Alonso-Galicia i wsp., 1998; Sun i wsp., 2000].



Ryc. 2. Czynniki odpowiedzialne za rozkurcz tętnicy środkowej mózgu pod wpływem tlenu azotu. NO – tlenek azotu; BK_{Ca} – kanał potasowy o dużej przewodności aktywowany jonami wapnia; cGMP – cykliczny guanozynomonofosforan.

W regulacji przepływu krwi przez mózg uczestniczą także pochodne kwasu arachidonowego powstające w szlaku przemian zależnych od cyklooksygenazy 1 i 2. Niektóre z tych związków rozszerzają naczynia krwionośne mózgu. Do tej grupy należą prostaglandyny takie jak: prostacyklina (PGI₂), prostaglandyna E₂ oraz prostaglandyna D₂. Skurcz naczyń wywołują natomiast: prostaglandyna F_{2α} i tromboksan A₂ (TXA₂)

[Andresen i wsp., 2006]. Spośród metabolitów powstałych w wyniku działania COX naczyniorozszerzające prostacyklina (PGI_2) i prostaglandyna E_2 (PGE_2) dominują w śródbłonku w warunkach fizjologicznych [Bogatcheva i wsp., 2005], przy czym PGI_2 wydaje się być najważniejszym prostanoidem w naczyniach krwionośnych mózgu. W mięśniach gładkich aktywuje ona cyklazę adenylanową poprzez receptor sprzężony z białkiem G, co prowadzi do wzrostu poziomu cyklicznego AMP i aktywacji kinazy białkowej A. Aktywacja kinazy białkowej A powoduje zaś otwarcie kanałów potasowych i hiperpolaryzację mięśni gładkich naczyń krwionośnych [Andresen i wsp., 2006].

Pomimo dominującej roli NO, w śródbłonku oprócz prostanoidów istnieje inny jeszcze czynnik, który prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych mózgu. Czynnik ten został określony jako czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego – EDHF (*ang. endothelium derived hyperpolarizing factor*) [Golding i wsp., 2002]. Uważa się, że czynnikiem EDHF może być wspomniany poprzednio EET. Ponadto, wśród kandydatów na EDHF wymienia się: kanały potasowe, niskooporowe połączenia szczelinowe między śródbłonkiem a warstwą mięśni gładkich ściany naczynia (*ang. myoendothelial junctions*) lub nadtlenek wodoru [Bryan i wsp., 2005]. W tętnicy środkowej mózgu szczura rozszerzenie zależne od EDHF wymaga wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w śródbłonku. Wzrost stężenia Ca^{2+} w tych komórkach prowadzi do aktywacji kanałów potasowych K_{Ca} i hiperpolaryzacji komórek śródbłonka (rozdział 1.3.). Nie jest ostatecznie wyjaśnione w jaki sposób hiperpolaryzacja śródbłonka prowadzi do hiperpolaryzacji mięśni gładkich. Najbardziej prawdopodobne wydaje się bezpośrednie przekazanie tej zmiany potencjału na sąsiednie komórki przez wspomniane wyżej połączenia mioendotelialne. Główną rolą czynnika EDHF w regulacji krążenia mózgowego jest kompensacja działania NO. Udział EDHF w utrzymaniu właściwego napięcia naczyń mózgowych wzrasta po udarach i urazach mózgu, w wyniku których dochodzi do zmniejszenia biodostępności NO. Zatem w sytuacjach patologicznych, pobudzenie mechanizmów związanych z EDHF może kompensować zaburzenia szlaku eNOS-NO i umożliwić utrzymanie prawidłowego przepływu krwi przez mózg [Andresen i wsp., 2006].

Obok czynników rozszerzających naczynia, śródbłonek uwalnia także peptyd o działaniu naczyniokurczącym – endotelinę (ET-1). ET-1 działa poprzez dwa typy receptorów błonowych: ET_A i ET_B . Receptor ET_A znajduje się w mięśniach gładkich naczyń. Jego pobudzenie prowadzi do skurczu naczyń. Natomiast pobudzenie receptora

ET_B znajdującego się w śródbłonku powoduje rozszerzenie naczyń. Tak więc, działanie ET-1 na naczynia krwionośne jest wypadkową jej wpływu na receptory ET_A w mięśniach gładkich oraz na receptory ET_B w śródbłonku. W warunkach fizjologicznych naczyniokurczący wpływ ET-1 jest maskowany jej działaniem na śródbłonek, z którego uwalniane są pod jej wpływem PGI₂ i NO [Peterson i wsp., 2011, Faraci i Heistad, 1998]. Podanie blokerów receptora endoteliny nie powoduje wzrostu przepływu krwi przez mózg. Wydaje się więc, że endotelina nie bierze udziału w kształtowaniu przepływu krwi przez mózg w warunkach fizjologicznych, ale może odgrywać ważną rolę w warunkach patologicznych, np. w okresie hipoperfuzji po niedokrwieniu mózgu [Stenman i wsp., 2002; Vatter i wsp., 2011]. Zwłaszcza, że po niedokrwieniu mózgu dochodzi do dysfunkcji śródbłonka. tzn. istnieją warunki, w których może ujawnić się bezpośrednie kurczące działanie ET-1 na mięśnie gładkie. Taki skurcz może być wzmocniony w związku z ekspresją receptora ET_B w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych mózgu w okresie reperfuzji po niedokrwieniu [Stenman i wsp., 2002; Maddahi i Edvinsson, 2008].

1.2.5. Regulacja nerwowa

Naczynia krwionośne mózgu są unerwione przez włókna nerwowe pochodzące z ośrodków zewnątrz- oraz wewnątrzmoźgowych. Źródłem unerwienia zewnętrznego (ang. *extrinsic*) są zwoje układu autonomicznego (zarówno współczulne - zwoje szyjny górny i gwiaździsty jak i przywspółczulne - zwoje klinowo podniebienny i uszny) oraz zwój trójdzielny. Włókna nerwowe pochodzące z tych zwojów kończą się w przydance dużych tętnic i tętniczek podstawy i powierzchni mózgu [Hamel, 2006; D'Angelo i wsp., 1997; Handa i wsp., 1990]. Po wnikięciu do mózgu naczynia krwionośne stopniowo tracą to zewnętrzne unerwienie. Wewnątrzmoźgowe naczynia mikrokrążenia unerwione są bezpośrednio przez wypustki okolicznych neuronów mózgu. Z tego względu ten typ unerwienia nazywany jest wewnętrznym (ang. *intrinsic*).

W warunkach fizjologicznych unerwienie autonomiczne naczyń nie ma znaczącego wpływu na przepływ krwi i opór naczyniowy w krążeniu mózgowym [Edvinsson i wsp., 1990; Faraci i Heistad, 1990]. Transmitterami zakończeń współczulnych są noradrenalina i neuropeptyd Y [Baffi i wsp., 1992]. Stymulacja układu współczulnego powoduje skurcz dużych naczyń krwionośnych mózgu, jednakże przepływ krwi nie obniża się, ponieważ skurcz tych naczyń jest równoważony przez

rozszerzenie tętniczek wewnątrzmożgowych [Baumbach i Heistad, 1983]. Wydaje się, że główną rolą unerwienia współczulnego jest działanie ochronne polegające na utrzymaniu przepływu krwi przez mózg na stałym poziomie w warunkach neurogennego nadciśnienia tętniczego. Wykazano bowiem, że zwiększenie napięcia współczulnego prowadzi do przesunięcia górnej granicy autoregulacji przepływu mózgowego w kierunku wyższych wartości ciśnienia [Lincoln, 1995; Faraci i Heistad, 1990].

Włókna nerwowe przywspółczulne uwalniają neuroprzekaźniki takie jak: wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), acetylocholinę i NO [Goadsby i wsp., 1996; Hara i wsp., 1985]. VIP i acetylocholina, podobnie jak dyskutowany wyżej NO, wywierają działanie rozszerzające na naczynia krwionośne mózgu [Hamel, 2006]. Jak wspomniałam wyżej, unerwienie przywspółczulne nie odgrywa roli w regulacji mózgowego przepływu krwi w warunkach fizjologicznych. Według niektórych autorów pobudzenie zwoju klinowo-podniebiennego prowadzi do rozszerzenia naczyń i zwiększenia mózgowego przepływu krwi jednak fizjologiczne znaczenie tych obserwacji nie jest wyjaśnione [Talman i wsp., 2007].

Włókna pochodzące ze zwoju trójdzielnego również uwalniają neuroprzekaźniki o działaniu naczyniorozszerzającym: substancję P, neurokininę A oraz peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP – ang. *calcitonin gene-related peptide*) a aktywacja tych włókien prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych mózgu. Wydaje się, że to unikalne unerwienie czuciowe naczyń mózgowych może mieć znaczenie w powstawaniu migrenowych bólów głowy [Lassen i wsp., 2002; Weber i wsp., 1996].

Rola wewnętrznego unerwienia naczyń krwionośnych mózgu została najdokładniej zbadana w korze mózgowej. Tętniczki wewnątrzmożgowe i mikronaczynia kory mózgowej posiadają unerwienie cholinergiczne pochodzące z jądra podstawnego przodomózgowia, serotoninergiczne pochodzące z jąder szwu oraz noradrenergiczne, którego źródłem jest jądro miejsca sinawego [Bleys i Cowen, 2001; Cohen i wsp., 1997]. Pobudzenie wyżej wymienionych struktur w warunkach doświadczalnych może prowadzić do wzrostu lub zmniejszenia przepływu krwi w korze mózgowej w zależności od typu pobudzanego receptora i jego lokalizacji. Na podstawie badań doświadczalnych ustalono bowiem, że włókna nerwowe pochodzące z tych struktur mają zakończenia nie tylko w naczyniach krwionośnych ale także na astrocytach tzn. unerwiają jednostki nerwowo-naczyniowe. Komediatores w niektórych z tych zakończeń może być tlenek azotu. Taka sytuacja ma miejsce w

przypadku zakończeń pochodzących z przedniej części przodomózgowia gdzie obok acetylocholino syntetyzowany jest także NO [Tong i Hamel, 2000; Hamel, 2006]. Wykazano, że wzrost mikroprzepływu w korze mózgowej obserwowany w czasie stymulacji przedniej części przodomózgowia u zwierząt doświadczalnych jest znoszony zarówno po zablokowaniu specyficznego receptora muskarynowego jak i po blokadzie aktywności nNOS [Hamel, 2006]. NO pochodzenia neuronalnego uczestniczy także w zwiększeniu przepływu korowego związanego z lokalną aktywacją glutamatergicznych receptorów NMDA. Komórkowe mechanizmy tych lokalnych zmian przepływu krwi związanych z lokalnym pobudzeniem neuronów nie są dotychczas poznane. Przypuszcza się jednak, że zmiany przepływu są raczej związane z bezpośrednim działaniem neuroprzekaźników na jednostkę nerwowo-naczyniową a nie z wpływem opisanych wyżej czynników metabolicznych.

1.3. KANAŁY POTASOWE W NACZYNIACH KRWIONOŚNYCH MÓZGU

Wspólnym mechanizmem większości z opisanych procesów regulujących przepływ krwi przez mózg jest modulacja aktywności kanałów potasowych błony komórkowej mięśni gładkich i/lub śródbłonna. Kanały te odgrywają istotną rolę w regulacji potencjału błonowego komórek mięśni gładkich i w związku z tym napięcia naczyń krwionośnych. Potencjał błonowy jest czynnikiem decydującym o czynności skurczowej komórek. Kontroluje on napływ jonów wapnia do komórek oraz ich uwalnianie z siateczki śródplazmatycznej, stanowiącej wewnątrzkomórkowy magazyn Ca^{2+} . W komórkach mięśni gładkich naczyń wartość potencjału równowagi dla jonów potasu jest bardziej elektroujemna (-84mV) niż wielkość potencjału spoczynkowego tych komórek, również w naczyniach krwionośnych mózgu (od -40 do -70mV) [Faraci i Heistad, 1998; Baranowska i wsp., 2007]. Zmiany potencjału już o kilka miliwoltów powodują znaczne zmiany w napięciu naczyń. Otwarcie kanałów potasowych prowadzi do wypływu jonów K^+ i hiperpolaryzacji komórek mięśni gładkich. Hiperpolaryzacja zamyka kanały wapniowe bramkowane napięciem, powodując zahamowanie napływu jonów Ca^{2+} i w efekcie rozkurcz naczynia [Standem i Quayle, 1998; Kitazono i wsp., 1995]. Zastosowanie inhibitorów kanałów potasowych prowadzi natomiast do depolaryzacji błony komórkowej i skurczu naczynia [Faraci i Heistad, 1998]. W naczyniach mózgowych zidentyfikowano przynajmniej cztery typy kanałów

potasowych. Są to kanały bramkowane potencjałem – K_V , kanały aktywowane jonami wapnia – K_{Ca} , kanały zależne od ATP – K_{ATP} oraz kanały wewnętrzzrostownicze – K_{IR} (Kitazono i wsp., 1995). Według Lindauer i wsp. [2003] w środkowej tętnicy mózgu w warunkach spoczynkowych przy pH wynoszącym 7,4 tylko kanały K_{Ca} są aktywne i biorą udział w utrzymaniu napięcia podstawowego naczyń, podczas gdy kanały K_{ATP} , K_{IR} oraz K_V są wyciszone.

Wśród kanałów potasowych aktywowanych jonami wapnia (K_{Ca}) wyróżnia się kanały o dużej – BK_{Ca} , średniej – IK_{Ca} i małej – SK_{Ca} przewodności [Faraci i Heistad, 1998]. Kanały BK_{Ca} są aktywowane przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , a ich aktywność wzrasta wraz z depolaryzacją błony komórkowej [Ko i wsp., 2008]. Aktywacja tych kanałów prowadzi do wypływu jonów K^+ na zewnątrz komórki i jej hiperpolaryzacji. W naczyniach krwionośnych mózgu kanały BK_{Ca} są obecne w mięśniach gładkich. W innych łożyskach naczyniowych m.in. w aorcie szczura [Marchenko i Sage, 1996] i królika [Rusko i wsp., 1992] oraz w tętnicy płucnej szczura [Vang i wsp., 2010] występują one także w śródbłonku. Kanał BK_{Ca} ma budowę tetrameryczną. Składa się z podjednostek: α , które formują kanał i podjednostek β , które są wrażliwa na stężenie jonów Ca^{2+} w komórce i pełnią funkcję regulującą [Nelson i Quayle, 1995]. Powszechnie używanym farmakologicznym aktywatorem kanałów BK_{Ca} jest związek NS1619. Wydaje się, że NS1619 powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych mózgu w wyniku uwalniania jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów i/lub bezpośredniej aktywacji tego kanału [Holland i wsp., 1996]. Farmakologicznie aktywność kanałów BK_{Ca} blokowana jest natomiast przez jon tetraetylamoniowy (TEA^+), charybdotoksynę, iberiotoksynę i paksylinę, przy czym najbardziej selektywnymi inhibitorami są paksylina i iberiotoksyna. Inhibitory te powodują skurcz tętnic mózgowych, ale mają niewielki wpływ na tętniczki, co oznacza, że kanały te regulują napięcie podstawowe w dużych naczyniach [Faraci i Heistad, 1998, Ledoux i wsp., 2006].

Kanały BK_{Ca} pełnią funkcję buforującą ograniczając skurcz naczyń pod wpływem rozciągania ich ścian, depolaryzacji mięśni gładkich, wzrostu poziomu jonów wapnia w komórce, działania agonistów oraz w warunkach wzrostu ciśnienia perfuzyjnego [Ledoux i wsp., 2006; Jaggar, 2001]. Ponadto, jak wspomniałam wcześniej, kanały BK_{Ca} biorą udział w odpowiedzi mięśni gładkich środkowej tętnicy mózgu szczura na kwasinę [Lindauer i wsp., 2003].

Do otwarcia tych kanałów dochodzi nie tylko pod wpływem NO i EET, ale także w

odpowiedzi na inne czynniki rozszerzające naczynia np. tlenek węgla [Faraci i Heistad, 1998]. Aktywność kanałów BK_{Ca} w krążeniu mózgowym hamowana jest przez kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy [Sun i wsp., 2000].

Kanały potasowe aktywowane jonami wapnia o małym - SK_{Ca} i średnim przewodnictwie - IK_{Ca} występują w krążeniu mózgowym jedynie w komórkach śródbłonna. Kanały te nie są wrażliwe na zmiany potencjału błonowego, a na jony wapnia związane z kalmoduliną. Ich aktywacja w śródbłonku prowadzi do hiperpolaryzacji tych komórek. Ponadto biorą one udział w rozszerzeniu naczyń mózgowych zależnym od czynnika EDHF. Zahamowanie aktywności kanałów IK_{Ca} i SK_{Ca} przez charybdotoksynę lub apaminę znosi rozszerzenie dużych naczyń krwionośnych mózgu w odpowiedzi na EDHF, ale nie ma wpływu na ich napięcie podstawowe [Cipolla i wsp., 2009; Ledoux i wsp., 2006].

Depolaryzacją błony komórkowej są otwierane także kanały K_V . Podobnie jak kanały BK_{Ca} utrzymują one potencjał spoczynkowy komórki poprzez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego. Selektywnym antagonistą kanałów K_V jest 4-aminopirydyna (4-AP). Ich aktywność hamują także jony TEA^+ i glibenklamid podane w wysokich stężeniach. Niewiele wiadomo o funkcji kanałów K_V w krążeniu mózgowym, jednakże uważa się, że mogą one brać udział w odpowiedzi naczyń na zmiany ciśnienia tętniczego [Faraci i Heistad, 1998]. Ponadto, aktywność tych kanałów wzrasta w kwasicy wewnątrzkomórkowej co sugeruje, że mogą one uczestniczyć w rozszerzeniu naczyń mózgowych w odpowiedzi na kwasicę i hiperkapnię [Bonnet i wsp., 1991].

W odpowiedzi na hiperpolaryzację błony komórkowej otwierane są natomiast kanały wewnętrzprostownicze - K_{IR} . Odgrywają one rolę w utrzymaniu potencjału spoczynkowego błony komórkowej w szczególności w naczyniach o małej średnicy, w których obserwuje się większe zagęszczenie tych kanałów [Ko i wsp., 2008; Quayle i wsp., 1997]. Kanały K_{IR} odgrywają rolę w rozszerzeniu naczyń mózgowych w odpowiedzi na wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ [Faraci i Heistad, 1998].

Ostatnim rodzajem kanałów zidentyfikowanych w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych mózgu są, wspomniane powyżej, kanały potasowe zależne od ATP. Ich gęstość w błonie komórek mięśni gładkich różni się w zależności od rozmiaru naczyń, a także obszaru mózgu, z którego te naczynia pochodzą [Faraci i Heistad, 1998]. Kanały te są wrażliwe na wewnątrzkomórkowe stężenie ATP, którego wzrost powoduje ich

zamykanie, a obniżenie skutkuje ich otwarciem. Zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP występujące w stanach zaburzeń metabolicznych, np. podczas niedotlenienia prowadzi do otwarcia kanałów K_{ATP} , wypływu jonów K^+ z komórki i hiperpolaryzacji, co w konsekwencji zmniejsza wnikanie do komórki jonów Ca^{2+} [Quayle i wsp., 1997; Baranowska i wsp., 2007]. Tak więc aktywność K_{ATP} odzwierciedla metaboliczny stan komórki [Kitazano i wsp., 1995]. Kanały te biorą także udział w autoregulacji naczyń mózgowych w niedociśnieniu [Ko i wsp., 2008]. Szczególnie ważny wydaje się być udział kanałów K_{ATP} w odpowiedzi naczyń krwionośnych mózgu na zakwaszenie. Otwarcie tych kanałów pod wpływem obniżenia zewnątrzkomórkowego pH wydaje się odgrywać istotną rolę w rozszerzeniu mózgowych naczyń krwionośnych [Horiuchi i wsp., 2002; Lindauer i wsp., 2003].

Do badania roli kanałów K_{ATP} w naczyniach mózgowych powszechnie stosowany jest ich inhibitor – glibenklamid. Natomiast ich aktywatorami są pinacidil, kromakalim i aprikalim. Kanały te są także aktywowane przez czynniki endogenne takie jak: EDHF, wazoaktywny peptyd jelitowy, peptyd związany z genem kalcytoniny, adrenomedullina, prostacyklina, peptydy opioidowe, noradrenalina, cAMP i adenozyzna [Faraci i Heistad, 1998]. Pomimo tego, że kanały K_{ATP} biorą udział w rozszerzeniu naczyń krwionośnych mózgu w odpowiedzi na wiele czynników naczynioaktywnych, nie wywierają one wpływu na napięcie spoczynkowe naczyń krążenia mózgowego. Według Faraci i Heistad'a [1998], podanie ich inhibitora nie zmienia napięcia ani w tętnicy podstawnej ani w tętniczkach krążenia mózgowego.

2. CEL PRACY

Celem podjętych badań było:

1. Sprawdzenie jaki jest wpływ krótkotrwałej i przewlekłej hiponatremii na regulację napięcia tętnicy środkowej mózgu szczura, a w szczególności na:
 - autoregulację
 - odpowiedź naczynia na wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ i H^+
 - regulację zależną od NO
2. Wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia regulacji napięcia tętnicy środkowej mózgu szczura w krótkotrwałej hiponatremii.

3. MATERIAŁ I METODY

Badania były prowadzone na 211 tętnicach środkowych mózgu (MCA, *ang. middle cerebral artery*) dorosłych szczurów samców stada Wistar (waga 250-300g, n= 140). Zwierzęta pochodziły ze Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Na przeprowadzenie badań uzyskałam zgodę nr 52/2011 IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

3.1. BADANIA NA IZLOWANEJ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU SZCZURA

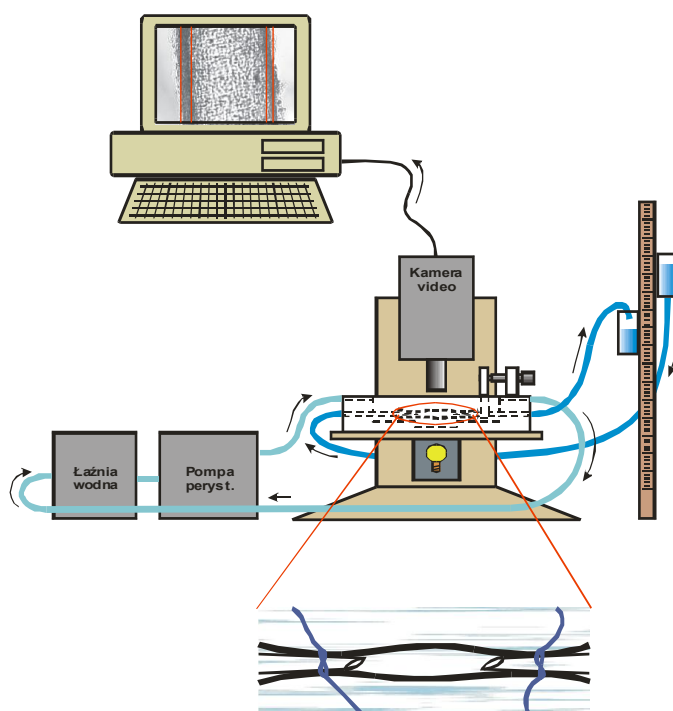
3.1.1. Izolacja tętnicy środkowej mózgu i jej przygotowanie do badań w komorze arteriografu

Zwierzęta były usypiane izofluranem, a następnie dekapitowane. Po wyjęciu z czaszki, mózg był umieszczany w soli fizjologicznej (PSS, *ang. physiological salt solution*) o temperaturze 4°C buforowanej kwasem 3-morfolino- propanosulfonowym (MOPS) z dodatkiem 1% dializowanej albuminy wołowej. Skład buforu (podany w mM) oznaczanego w dalszej części pracy jako MOPS-PSS był następujący: MOPS – 3,0; NaCl – 144,0; KCl – 3,0; CaCl₂ – 2,5; MgSO₄ – 1,5; NaH₂PO₄ – 1,21; EDTA – 0,02; pirogronian – 2,0; glukoza – 5,0. MCA izolowałam z mózgu począwszy od kręgu Willisa, a następnie delikatnie oczyszczałam z tkanek przylegających. Tak przygotowane naczynie przenoszone było do komory arteriografu wypełnionej MOPS-PSS o temperaturze 4°C z dodatkiem 1% albuminy wołowej. Tętnica była mocowana na szklanej kapilarze za pomocą nici nylonowych 10-0 i delikatnie przepłukiwana MOPS-PSS z dodatkiem 1% albuminy wołowej zgodnie z fizjologicznym kierunkiem przepływu krwi. Umożliwiło to dokładne usunięcie krwi z naczynia. Wolny koniec naczynia przymocowywałam do drugiej kapilary. Komorę arteriografu umieszczałam na stoliku odwróconego mikroskopu świetlnego (CKX41, Olympus). Naczynie było perfundowane MOPS-PSS z dodatkiem 1% albuminy wołowej w tempie 100 µl/min pod stałym ciśnieniem hydrostatycznym wynoszącym 80 mmHg. Płyn zewnątrznaczyniowy (MOPS-PSS bez albuminy) wymieniany był w tempie 20 ml/min za pomocą pompy perystaltycznej (typ PP2B-15, ZALIMP lub Masterflex, Cole Parmer). Temperatura płynu zewnątrz- i wewnątrznaczyniowego utrzymywana była

termostatycznie na poziomie 37°C, a pH wynosiło 7,4. Badane były jednocześnie lewa i prawa MCA.

Reaktywność naczyń była rejestrowana za pomocą toru wizyjnego złożonego z kamery i monitora telewizyjnego (ryc. 3). Średnicę naczynia mierzyłam manualnie na ekranie monitora, oraz za pomocą programu graficznego

Podczas 1-godzinnej stabilizacji MCA nabierała napięcia miogennego, co przejawiało się jej skurczem o ok. 30% - 40%. Następnie naczynie poddawane było testowi reaktywności na wzrost stężenia jonów K^+ z 3 mM do 20 mM w płynie zewnątrznaczyniowym. Podczas tej fazy MCA rozszerzała się przynajmniej o 20% średnicy wyjściowej. Naczynia nie spełniające tych kryteriów były odrzucane.



Ryc. 3. Schemat zestawu doświadczalnego.

3.1.2. Wywołanie hiponatremii

Krótkotrwałą hiponatremia była wywoływana *in vitro* poprzez obniżenie stężenia jonów sodu ze 144 mM do 120 mM w płynie zewnątrz- i wewnątrznaczyniowym. Badanie regulacji napięcia MCA rozpoczynałam po upływie 1 godziny od wywołania hiponatremii. Grupę kontrolną stanowiły naczynia umieszczone w buforze zawierającym 144 mM Na^+ .

Hiponatremia przewlekła była wywoływana *in vivo* przez 3,5 dnia przy użyciu pomp osmotycznych (mini-osmotic pump model 2002, ALZET, U.S.A.) oraz płynnej karmy dla gryzoni (AIN -76; Bio-Serv, NJ, U.S.A.). Karmienie zwierząt płynną karmą (75 mL; 1 kcal/mL/dobę) rozpoczynałam 2 dni przed wywołaniem hiponatremii w celu przyzwyczajenia ich do tej karmy. W tym czasie miały one dostęp do pitnej wody. Pompę osmotyczną implantowałam podskórną w okolicach karku w znieczuleniu wodzianem chlorału. Pompa uwalniała wazopresynę w tempie 2,4 $\mu\text{g}/24\text{h}$. Począwszy od następnego dnia po implantacji pompy, zwierzęta były karmione karmą AIN-76 z dodatkiem 14% glukozy, w ilości 50mL/24h. Po 3,5 dnia od momentu wywołania hiponatremii zwierzęta dekapitowałam i pobierałam tętnice środkowe mózgu do badania ich reaktywności oraz próbki krwi do pomiaru stężenia jonów Na^+ w osoczu. Tętnice umieszczane były w buforze MOPS_PSS o stężeniu jonów Na^+ wynoszącym 120 mM i perfundowane buforem zawierającym 120 mM Na^+ . Jest to stężenie zbliżone do tego w jakim naczynia przebywały podczas wywoływania hiponatremii *in vivo*. Grupą kontrolną dla hiponatremii przewlekłej stanowiły te same naczynia, które były kontrolą dla hiponatremii krótkotrwałej. Decyzja o nie prowadzeniu osobnej kontroli z wszczepionymi pompami osmotycznymi bez peptydu została podjęta na podstawie wyników badań pilotażowych. Badania te przeprowadziłam na 6 środkowych tętnicach mózgu pobranych od szczurów, którym wszczepiono na 3,5 dnia pompy osmotyczne wypełnione wodą do iniekcji. Wykazałam w nich, że te naczynia przechodzą pomyślnie kryteria włączenia do badań tzn. kurczą się prawidłowo podczas zwiększenia ciśnienia wewnątrznaczyniowego do 80 mmHg i odpowiadają prawidłowo na test KCl oraz na podanie NO-zależnej acetylocholino. Przyjęcie na tej podstawie założenia, że samo wszczepienie pompy nie wpływa na charakterystykę naczyń umożliwiło zmniejszenie liczby użytych zwierząt i obniżenie kosztów badań.

3.1.3. Oznaczanie stężenia jonów sodu w osoczu zwierząt z przewlekłą hiponatremią

Krew pobrana do heparynizowanych probówek eppendorfa była wirowana przez 10 min przy 3000xg w temperaturze pokojowej. Zebrane osocze było mrożone i przechowywane w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. W celu oznaczenia natremii, osocze było rozmrażane i rozcieńczane w wodzie destylowanej w stosunku 1:200. Stężenie jonów Na^+ mierzyłam za pomocą fotometru płomieniowego (Model PFP7&PFP7/C, JENWAY). Badany

roztwór był zasysany z probówki przy użyciu sprężonego powietrza i rozpylany do płomienia gazowego. Atomy sodu w płomieniu przechodzą w stan wzbudzenia. Podczas powrotu ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego atom sodu emituje promieniowanie o ściśle określonej długości fali. Na podstawie intensywności promieniowania można określić ilość pierwiastka w badanej próbce. Stężenie jonów Na^+ w osoczu odczytywałam na podstawie uprzednio przygotowanej krzywej wzorcowej. Zakres otrzymanych wartości stężeń Na^+ zawierał się w przedziale 116 mM – 122 mM.

3.1.4. Badania reaktywności tętnicy środkowej mózgu

Przeprowadziłam IV serie badań:

Seria I obejmowała badania mające na celu ustalenie odpowiedzi MCA na: zmiany ciśnienia perfuzyjnego (autoregulacja), wzrost stężenia jonów H^+ i K^+ w przestrzeni zewnątrznaczyniowej, podanie acetylocholinę (10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M), podanie inhibitora syntazy tlenku azotu – L-NAME (estr metylowy-nitro-L-argininy, 10^{-5}M) i donora tlenku azotu - SNAP (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicylamina, 10^{-5}M) w normonatremii oraz w krótkotrwałej i przewlekłej hiponatremii.

Autoregulacja była badana poprzez obniżenie ciśnienia wewnątrznaczyniowego z 80 mmHg do 20 mmHg, a następnie powolne podnoszenie go do 40 mmHg, 60 mmHg, 80 mmHg i 100 mmHg. Analogicznie postępowałam w końcowej fazie doświadczenia z autoregulacją, w której za pomocą 1mM EGTA usuwane były jony Ca^{2+} w celu wyznaczenia maksymalnej średnicy MCA przy każdym z badanych poziomów ciśnienia. Średnica naczynia mierzona była po 10 min stabilizacji na danym poziomie ciśnienia. Jej zmiana była wyrażana jako procent maksymalnego rozszerzenia przy każdym z badanych poziomów ciśnienia, według wzoru $D_{\text{Ca}}/D_{0\text{Ca}} \times 100$, gdzie D_{Ca} i $D_{0\text{Ca}}$ oznaczają średnice mierzone odpowiednio w obecności oraz bez jonów Ca^{2+} w buforze (Jimenez-Altayo i wsp., 2007).

Odpowiedź MCA na acetylocholinę była badana 15 min po jej podaniu do wnętrza naczynia w dawkach: 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4}M . Następnie jony Ca^{2+} były usuwane z buforu za pomocą 1 mM EGTA. Odpowiedź MCA na acetylocholinę była wyrażana jako procent maksymalnego rozszerzenia tej tętnicy według wzoru $(D_{\text{Ach}} - D_{\text{baseline}})/(D_{\text{max}} - D_{\text{baseline}}) \times 100\%$, gdzie D_{baseline} , D_{Ach} i D_{max} oznaczają średnice mierzone odpowiednio w warunkach podstawowych, po podaniu Ach oraz w środowisku bezwapniowym.

Kwasica była wywoływana poprzez dodanie do zewnątrznaczyniowego buforu 2,5 % HCl, aby zredukować pH z 7,4 do 7,0.

Hiperkalemię uzyskiwałam poprzez podwyższenie stężenia jonów K^+ z 3 mM do 20 mM w przestrzeni zewnątrznaczyniowej. Średnica MCA w odpowiedzi na wzrost stężenia tych jonów jak również podanie pozostałych substancji w tej oraz w następnych seriach mierzona była po 15 min (z wyjątkiem L-NAME i paksyliny, których wpływ na średnicę MCA był mierzony po 30 min).

Następne 3 serie doświadczeń miały na celu wyjaśnienie podłoża zaburzeń regulacji MCA obserwowanych w serii I w krótkotrwałej hiponatremii.

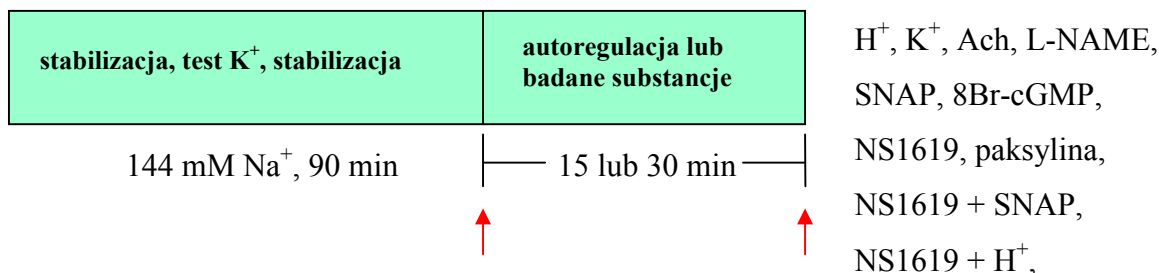
Seria II obejmowała badanie odpowiedzi MCA na podanie 8Br-cGMP ($10^{-5}M$) - analogu cGMP przechodzącego przez błony komórkowe w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii.

W **serii III** badana była zależność napięcia podstawowego MCA od aktywności kanałów potasowych BK_{Ca} i udział tych kanałów w odpowiedzi mięśni gładkich MCA na tlenek azotu w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii. W celu zablokowania lub pobudzenia kanałów BK_{Ca} podawane były odpowiednio ich inhibitor – paksylina ($10^{-6}M$) lub aktywator - NS1619 ($10^{-5}M$). Badana była także odpowiedź tych kanałów na podanie donora NO - SNAPu na tle NS1619 w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii.

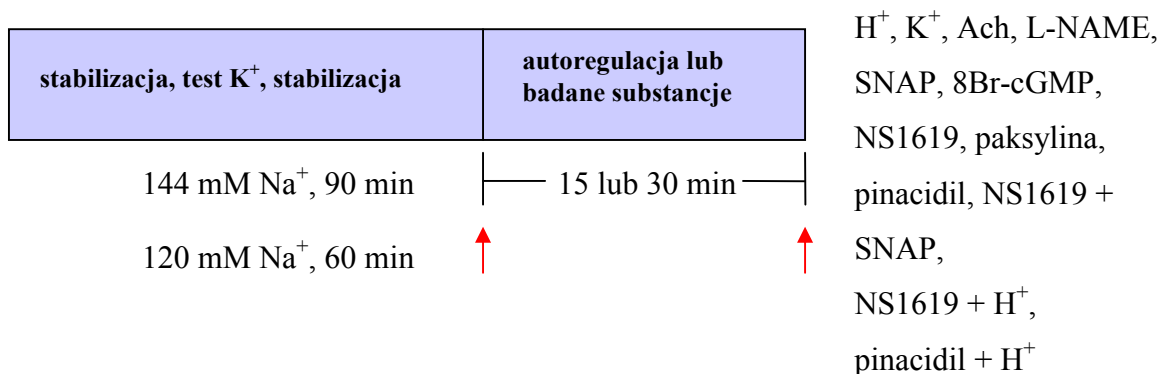
Seria IV miała na celu zbadanie czy brak odpowiedzi MCA na kwasicę jest związany ze zmniejszeniem aktywności kanałów potasowych BK_{Ca} i K_{ATP} w krótkotrwałej hiponatremii. W tej serii badałam odpowiedź MCA na wzrost stężenia jonów H^+ na tle aktywatora kanałów BK_{Ca} – NS1619 ($10^{-5}M$) lub aktywatora kanałów K_{ATP} – pinacidilu ($10^{-5}M$) w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii.

Schemat badań przeprowadzonych w normonatremii oraz w krótkotrwałej i przewlekłej hiponatremii jest przedstawiony na ryc. 4.

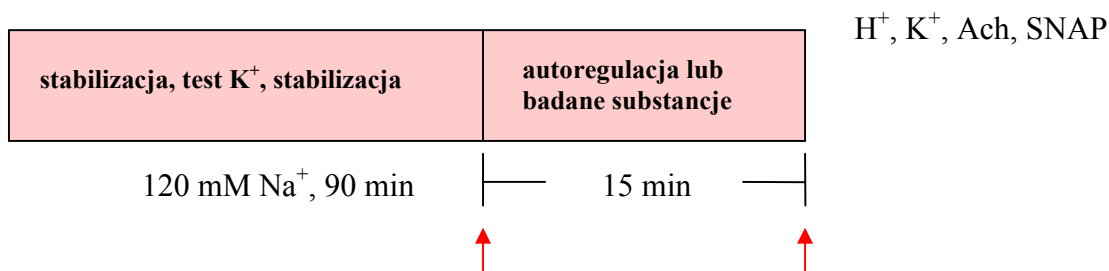
Normonatremia



Hiponatremia krótkotrwała



Hiponatremia przewlekła



Ryc. 4. Schemat badań reaktywności MCA. Strzałka ↑ oznacza moment pomiaru średnicy

3.2. BADANIA NA MIOCYTACH IZOLOWANYCH Z TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU SZCZURA

3.2.1. Izolacja miocytów z tętnicy środkowej mózgu

Szczury znieczulone izofluranem były dekapitowane. Mózg po wyjeciu z czaszki umieszczalam w buforze o temperaturze 4°C i następującym składzie (w mM): NaCl 136; HEPES 10; KCl 5,6; NaHCO₃ 4,17; CaCl₂ 2,6; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 0,44; Na₂HPO₄ 0,42; pH 7,4. Następnie, izolowana była MCA w sposób analogiczny do opisanego uprzednio. Wyizolowane naczynia umieszczalam na 10 min w płynie o składzie

różniącym się od podanego wyżej stężeniem jonów Ca^{2+} (0,1 mM zamiast 2,6 mM). Potem MCA były poddane dwustopniowemu trawieniu. W pierwszym etapie naczyńia były przenoszone do buforu o temperaturze 37°C i niskim stężeniu jonów Ca^{2+} z dodatkiem papainy 18U/mM, ditioerytriolu (2mg/ml) i albuminy (1mg/ml). Tętnice były trawione w tych warunkach przez 20 min. W drugim etapie trawienia, po dwukrotnym wypłukaniu poprzedniego enzymu, MCA była przenoszona do świeżego buforu z dodatkiem kolagenazy typu F (1,5 mg/ml), hialuronidazy typu I-S (1mg/ml) i albuminy (1mg/ml). Tętnice były trawione przez 10 min w temperaturze 37°C . Po tym czasie, po dwukrotnym wypłukaniu enzymów trawiennych tętnice były przenoszone do świeżego buforu o niskim stężeniu jonów Ca^{2+} z dodatkiem albuminy (1mg/ml). Aby uzyskać pojedyncze komórki mięśni gładkich rozdrabniałam tętnice za pomocą pipety pasterowskiej. Komórki były przechowywane w temperaturze 4°C i użyte do doświadczeń w ciągu 8 godzin.

3.2.2. Badanie elektrofizjologii kanałów BK_{Ca} za pomocą techniki patch-clamp

Prądy BK_{Ca} w komórkach mięśni gładkich MCA badane były metodą *patch-clamp* w konfiguracji *whole-cell*. Metoda ta polega na mierzeniu natężenia prądów jonowych przepływających jednocześnie przez wszystkie otwarte kanały jonowe izolowanego fragmentu (ang. *patch*) błony komórkowej. W celu izolacji fragmentu błony komórkowej, szklaną pipetą o średnicy około 1 μm dotyka się błony komórkowej, a następnie obniża się ciśnienie w pipecie, co powoduje powstanie połączenia pomiędzy czubkiem pipety a błoną komórkową o oporności elektrycznej rzędu gigaomów. Po uzyskaniu odpowiedniej oporności przerywa się błonę komórkową za pomocą zwiększenia ciśnienia w pipecie. Po przerwaniu błony miocytu wewnątrz komórki bezpośrednio kontaktuje się z roztworem wewnątrz pipety, w którym znajduje się elektroda służąca do pomiaru prądu. Prąd mierzony był dla potencjałów zmienianych skokowo co 20 mV w zakresie od -40 mV do +60 mV, przykładanych do błony przez 1 sekundę [Holland i wsp., 1996]. Pipety wykorzystane w eksperymentach wykonane zostały z borokrzemowych kapilar Clarka (Warner Instruments) o zewnętrznej średnicy 1,2 mm. Do wyciągnięcia cienkiego końca pipety używana była wyciągarka Narishige, PP-830. Pipety były opalane za pomocą mikrokuźni Narishige, MF-830. Ich oporność po wypełnieniu płynem o składzie podanym poniżej, wynosiła 3-

7 M Ω . Do rejestracji prądów jonowych były używane dwie elektrody chlorosrebrowe, z których jedna umieszczona była wewnątrz pipety a druga zanurzona w roztworze, w którym znajdowały się komórki. Elektrody podłączone były do wzmacniacza (Axopatch 200B Axon Instruments). Dane ze wzmacniacza filtrowane były filtrem dolnoprzepustowym 1000 Hz i przesyłane za pośrednictwem konwertera analogowo-cyfrowego (DigiData 1200 Series Axon Instruments) bezpośrednio do komputera. Do rejestracji prądów jonowych wykorzystany był program Clampex 7 w pakiecie pClamp 7 (Axon Instruments). Płyn zewnątrzkomórkowy zawierał (w mM): NaCl 144,0; glukoza 10,0; HEPES 10,0; KCl 6,0; MgCl₂ 1,0; CaCl₂ 1,8 (pH 7,4 miareczkowane było za pomocą NaOH). W serii, w której badałam wpływ hiponatremii na kanały BK_{Ca} w płynie zewnątrzkomórkowym obniżone zostało stężenie jonów sodu ze 144 mM do 120 mM. Roztwór w pipecie zawierał (w mM): KCl 140,0; HEPES 10,0; MgCl₂ 0,5; EGTA 5,0 (pH 7,2 miareczkowane było przy użyciu KOH). Komórki umieszczone w buforze izolacyjnym były wylewane na pokryte poli-L-lizyną szalki o średnicy 3,5 cm (BD – Biosciences), w których znajdował się płyn zewnątrzkomórkowy zawierający odpowiednio albo 144 mM Na⁺ (normonatremia) albo 120 mM Na⁺ (hiponatremia). W przypadku serii kontrolnej po otrzymaniu konfiguracji *whole-cell* komórki stabilizowały się przez 5 min, a następnie podawany był aktywator kanałów BK_{Ca} NS1619 (10⁻⁶ lub 10⁻⁵) przez 5 min. Rejestracja prądów była dokonywana po 1 min oraz po 5 min. Zapisy prądów były prowadzone w programie pCLAMP8. W serii, w której badałam wpływ hiponatremii na prądy BK_{Ca}, miocyty przed przebiciem błony komórkowej były inkubowane przez 1 godz. w buforze zawierającym jony Na⁺ w stężeniu 120 mM. Po uzyskaniu konfiguracji *whole-cell* komórki stabilizowały się przez 5 min, a następnie podawany był NS1619 analogicznie jak w serii kontrolnej. Eksperymenty były wykonywane w temperaturze pokojowej.

3.3. SUBSTANCJE UŻYWANE W BADANIACH

Obok odczynników użytych do przygotowania buforów do badań stosowane były następujące substancje:

- Acetylocholina: 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M; Sigma Aldrich
- S-nitrozo-N-acetyl-DL-penicylamina (SNAP, donor NO): 10⁻⁵ M; Sigma Aldrich

- Ester metylowy-nitro-L-argininy (L-NAME, inhibitor syntazy NO): 10^{-5} M; Sigma Aldrich
- 8-Bromo-guanozyno 3'5' cykliczny monofosforan (8Br-cGMP, analog cGMP): 10^{-5} M; Fluka
- NS1619 (aktywator kanałów potasowych BK_{Ca}): 10^{-5} M; Sigma Aldrich
- Paksylina (selektywny inhibitor kanałów potasowych BK_{Ca}): 10^{-6} M; Sigma Aldrich
- Pinacidil (inhibitor kanałów potasowych K_{ATP}): 10^{-5} M; Sigma Aldrich

Składniki buforu oraz substancje takie jak acetylocholina, L-NAME, SNAP, 8Br-cGMP rozpuszczane były bezpośrednio w wodzie filtrowanej za pomocą destylarki Milli-Q Plus Ultra Pure Water (MILLIPORE). Do sporządzania buforów do techniki *patch-clamp* używałam wody do iniekcji. NS 1619, pinacidil i paksylinę rozpuszczane były w etanolu i dodawane do buforu. Końcowe stężenie etanolu w buforze wynosiło 0,1 %. Etanol o tym stężeniu nie wpływał ani na zapis aktywności kanałów BK_{Ca}, ani na średnicę MCA, co zostało potwierdzone w dodatkowej serii badań. Natomiast niższe stężenia etanolu (0,01 do 0,075%) powodują, według danych piśmiennictwa, hamowanie kanałów potasowych K_{ATP} (Rosenblum i wsp., 2001b).

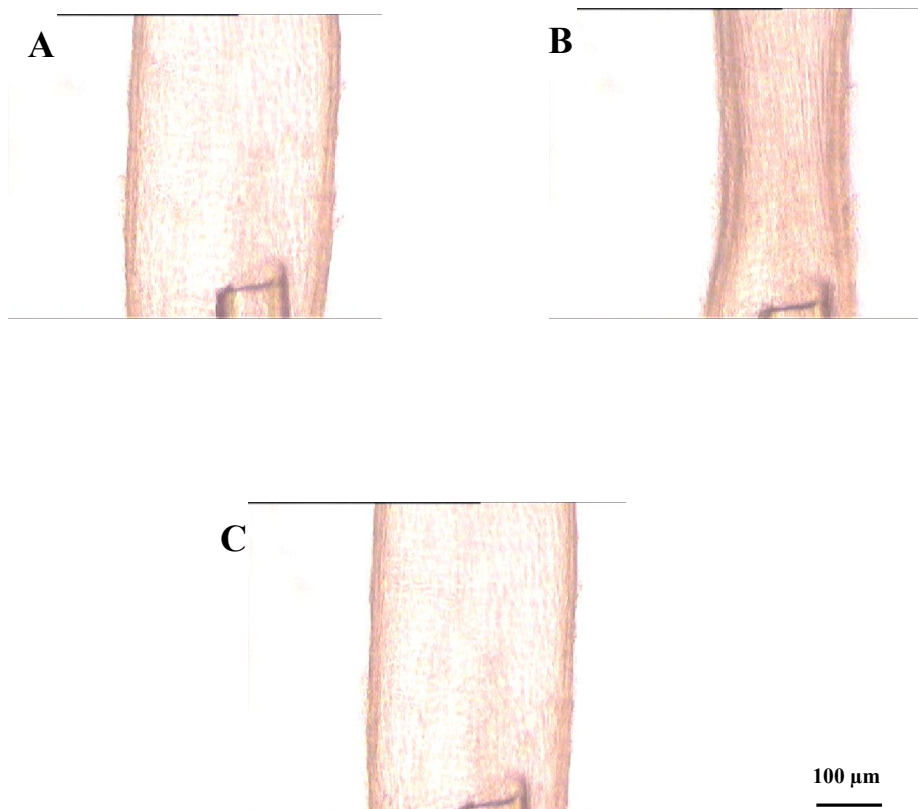
3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Wyniki pomiarów są przedstawione jako wartości średnie \pm błąd standardowy średniej (S.E.M). Do porównania pojedynczych wyników w obrębie grupy używany był test t Studenta dla prób zależnych. Natomiast do porównania wyników między grupami test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Po uprzednim sprawdzeniu jednorodności wariancji (test Levene'a) do dalszych porównań używany był test Tukey'a. Prawdopodobieństwo nie przekraczające wartości $p < 0,05$ uznawałam za istotne statystycznie. Liczba naczyń użytych do badań reaktywności wynosiła od 5 do 8 w grupie. W badaniach techniką *patch-clamp* liczba komórek wynosiła od 4 do 5 w grupie.

4. WYNIKI

4.1 OCENA FIZJOLOGICZNEGO STANU NACZYŃ UŻYTYCH DO DOŚWIADCZEŃ

Po 1-godzinnej stabilizacji w warunkach kontrolnych (144 mM Na⁺ wewnątrz- i na zewnątrz naczyń) MCA nabierały napięcia, co przejawiało się zmniejszeniem ich średnicy ze 257±3 μm do 179±3 μm (30±1%; p<0,001; n=70) w stosunku do średnicy wyjściowej. Następnym testem sprawdzającym funkcje mięśni gładkich badanego naczynia było poddanie go testowi na wzrost zewnątrznaczyniowego stężenia jonów K⁺. Zwiększenie tego stężenia do 20 mM prowadziło do rozszerzenia naczyń średnio o 29±3%; p<0,005; n= 33 (Ryc. 5).



Ryc. 5 Zdjęcia MCA z mikroskopu świetlnego przedstawiające: A – wyjściową szerokość MCA przed nabraniem napięcia miogennego, B – szerokość MCA po nabraniu napięcia miogennego, C – odpowiedź MCA na wzrost zewnątrznaczyniowego stężenia K⁺ do 20 mM.

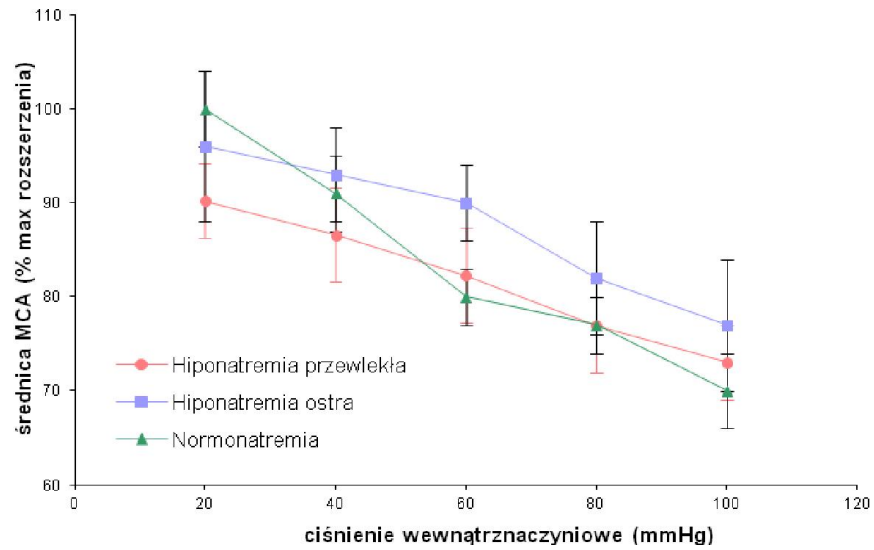
Godzinę po obniżeniu stężenia jonów sodu wewnątrz i na zewnątrz naczynia ze 144 do 120 mM MCA ulegały statystycznie istotnemu rozszerzeniu o $21\pm 2\%$ (ze $170\pm 4\mu\text{m}$ do $205\pm 5\mu\text{m}$; $p<0,001$; $n=36$) w stosunku do średnicy w warunkach kontrolnych.

W serii z hiponatremią przewlekłą, podczas stabilizacji w buforze zawierającym 120 mM Na^+ , MCA poddane działaniu ciśnienia wewnątrznaczyniowego na poziomie 80 mmHg ulegały skurczowi podobnie jak w normonatremii. Po 1-godzinnej stabilizacji w tych warunkach średnica MCA zmniejszała się ze $255\pm 3\mu\text{m}$ do $173\pm 4\mu\text{m}$ ($32\pm 1\%$; $p<0,001$; $n=40$).

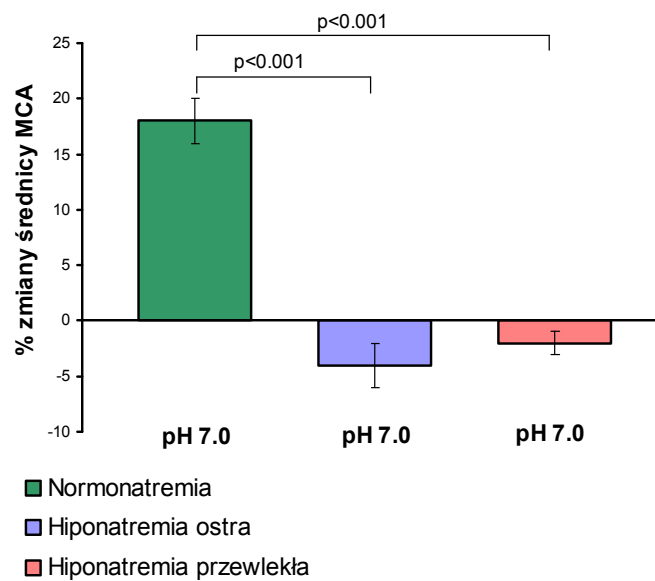
4.2. WPLYW KRÓTKOTRWAŁEJ I PRZEWLEKŁEJ HIPONATREMII NA AUTOREGULACJĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU ORAZ JEJ REGULACJĘ METABOLICZNĄ I REGULACJĘ ZALEŻNĄ OD TLENKU AZOTU

Podczas badania odpowiedzi miogennej w środowisku zawierającym jony wapnia naczynia kurczyły się wraz ze wzrostem ciśnienia perfuzyjnego zarówno w normonatremii jak i w hiponatremii krótkotrwałej i przewlekłej. Natomiast w warunkach bezwapniowych naczynia rozszerzały się wraz ze wzrostem ciśnienia perfuzyjnego. Średnice MCA mierzone w obecności jonów Ca^{2+} przedstawione zostały dla każdego poziomu ciśnienia perfuzyjnego jako procent maksymalnego rozszerzenia (środowisko bezwapniowe) naczynia. Analiza statystyczna krzywych zależności ciśnienie perfuzyjne-średnica naczynia w normonatremii oraz w krótkotrwałej i przewlekłej hiponatremii nie wykazała istotnych różnic. Oznacza to, że odpowiedź miogenna jest zachowana w obu rodzajach hiponatremii (ryc. 6).

Zarówno w hiponatremii krótkotrwałej jak i w przewlekłej upośledzona była natomiast odpowiedź MCA na kwasinę. Zewnątrznaczyniowe obniżenie pH z 7,4 do 7,0 powodowało rozszerzenie naczynia ze $160\pm 8\mu\text{m}$ do $188\pm 9\mu\text{m}$ ($18\pm 2\%$; $p<0,001$) w normonatremii. Takiego efektu nie obserwowałam ani w hiponatremii krótkotrwałej, w której naczynie kurczyło się o $4\pm 2\%$ ($p<0,01$), ani w hiponatremii przewlekłej, w której skurcz MCA o $2\pm 1\%$ nie był istotny statystycznie (ryc. 7).



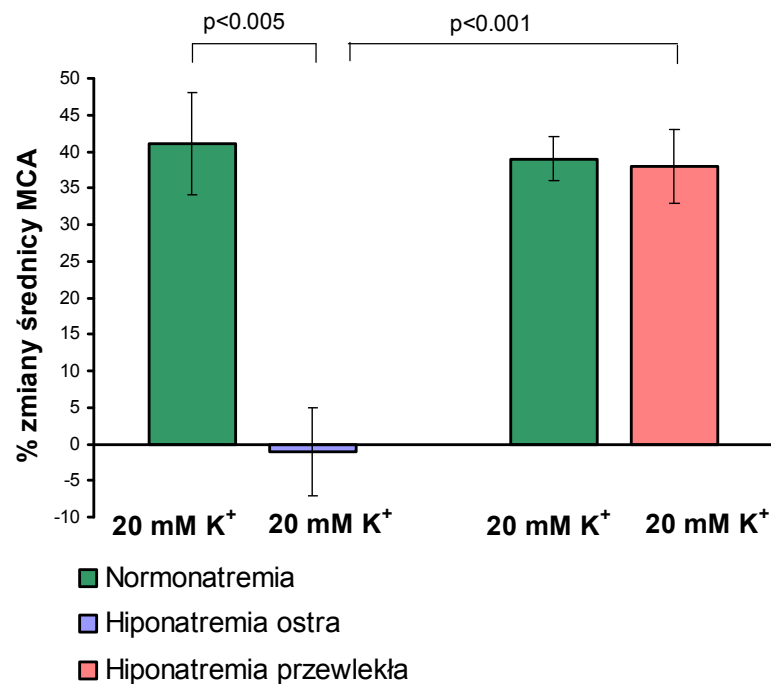
Ryc. 6. Wpływ wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkiowego na średnicę MCA w normonatremii (n=6) oraz w hiponatremii krótkotrwałej (n=6) i w przewlekłej (n=6). Punkty na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.



Ryc. 7. Wpływ obniżenia pH z 7,4 do 7,0 w płynie zewnątrzczaszkiowym na średnicę MCA w normonatremii (n=6) oraz w hiponatremii krótkotrwałej (n=6) i przewlekłej (n=5). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

Kolejnym badanym czynnikiem biorącym udział w regulacji napięcia naczyń krwionośnych mózgu były jony K^+ . Wzrost stężenia jonów K^+ z 3 mM do 20 mM w

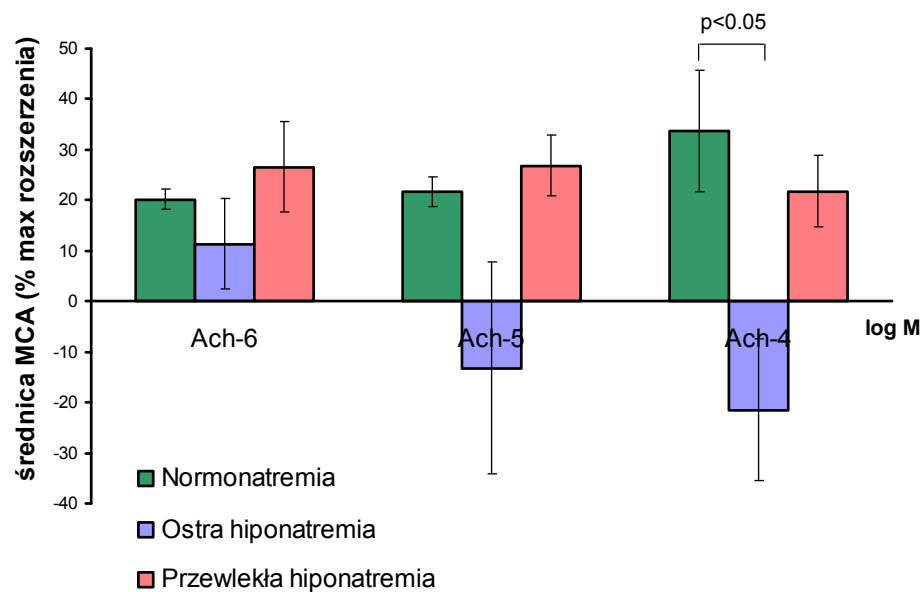
płynie zewnątrznaczyniowym prowadził do statystycznie istotnego rozszerzenia MCA w normonatremii o $39 \pm 3\%$ (ze $171 \pm 4 \mu\text{m}$ do $237 \pm 5 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) w przypadku naczyń stabilizowanych przez 1 godzinę w warunkach ciśnienia wewnątrznaczyniowego zwiększonego do poziomu 80 mmHg (wynik ten stanowił kontrolę dla hiponatremii przewlekłej) oraz o $41 \pm 7\%$ (ze $182 \pm 6 \mu\text{m}$ do $256 \pm 11 \mu\text{m}$; $p < 0,005$) w przypadku naczyń po 2-godzinnym okresie stabilizacji (wynik ten stanowił kontrolę dla hiponatremii krótkotrwałej). Nie obserwowałam statystycznie istotnej różnicy między tymi grupami. W hiponatremii przewlekłej wzrost stężenia jonów K^+ do 20 mM powodował, tak jak w normonatremii, rozszerzenie naczynia o $38 \pm 5\%$ ($p < 0,005$). W hiponatremii krótkotrwałej odpowiedź MCA na hiperkalemię była zniesiona (ryc. 8).



Ryc. 8. Wpływ zwiększenia stężenia jonów K^+ z 3 mM do 20 mM w płynie zewnątrznaczyniowym na średnicę MCA w normonatremii ($n=40$) oraz w hiponatremii krótkotrwałej ($n=6$) i przewlekłej ($n=19$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

W hiponatremii krótkotrwałej zaburzona jest także odpowiedź MCA na podanie acetylocholiny użytej do sprawdzania funkcji śródbłonna (naczyniorozszerzające działanie ACh jest uwarunkowane wydzielaniem NO z tej warstwy naczynia). Acetylocholina we wszystkich zastosowanych stężeniach (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M) prowadziła

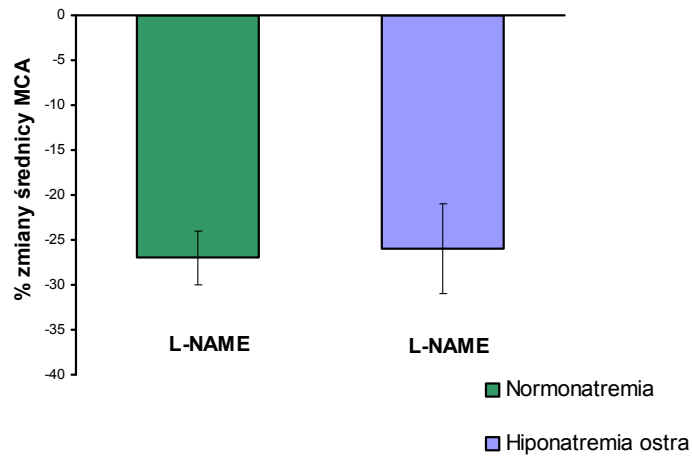
do rozszerzenia MCA w normonatremii i w hiponatremii przewlekłej (ryc.9). W hiponatremii krótkotrwałej, ACh podana w stężeniu, przy którym obserwowałam największe rozszerzenie MCA w normonatremii, wywoływała statystycznie istotny skurcz MCA o $21 \pm 10\%$ ($p < 0,05$). Po podaniu tego związku w niższych dawkach obserwowałam zmniejszenie odpowiedzi MCA w porównaniu z odpowiedzią w normonatremii i hiponatremii przewlekłej, ale wyniki nie osiągały istotności statystycznej ze względu na duży rozrzut wartości.



Ryc. 9. Odpowiedź MCA na acetylocholinę (Ach^{-4} , Ach^{-5} , Ach^{-6} M) w warunkach normonatremii ($n=20$) oraz hiponatremii krótkotrwałej ($n=22$) i przewlekłej ($n=15$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

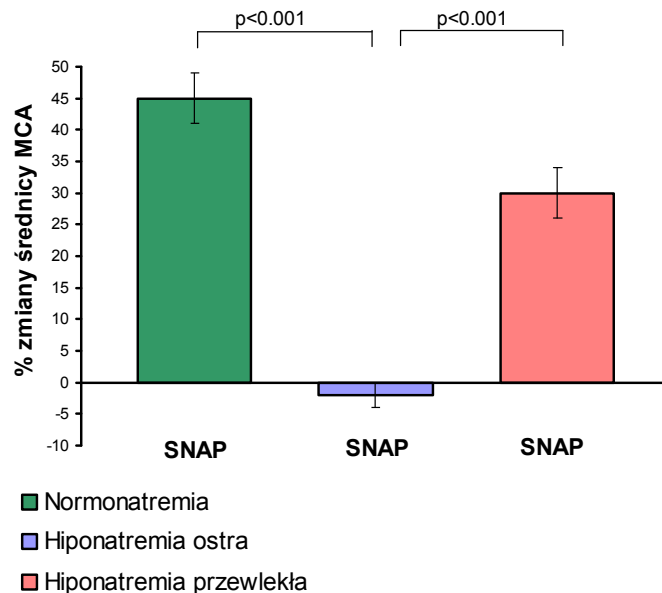
Zaskakującym wynikiem w zestawieniu z brakiem rozszerzenia MCA po podaniu acetylocholiny jest zachowanie prawidłowej odpowiedzi tego naczynia na zablokowanie syntazy tlenu azotu w krótkotrwałej hiponatremii (ryc. 10). Podanie L-NAME prowadziło do skurczu MCA o $27 \pm 3\%$ ($p < 0,05$) w normonatremii oraz o $26 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) w krótkotrwałej hiponatremii.

Te obserwacje sugerują, że w krótkotrwałej hiponatremii dochodzi do zaburzenia funkcji mięśni gładkich w ścianie tętnicy środkowej mózgu a nie, jak można by sądzić na podstawie braku rozszerzenia MCA w odpowiedzi na ACh, dysfunkcji komórek śródbłonna.



Ryc. 10. Wpływ inhibitora syntazy NO (L-NAME, 10^{-5} M) na średnicę MCA w normonatremii (n=8) i krótkotrwałej hiponatremii (n=5). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

W celu potwierdzenia hipotezy o zaburzeniu funkcji mięśni gładkich MCA w krótkotrwałej hiponatremii, podałam egzogenny NO w postaci donora tlenku azotu - S-nitroso-N-acetyl-DL-penicylaminy (SNAP, 10^{-5} M).



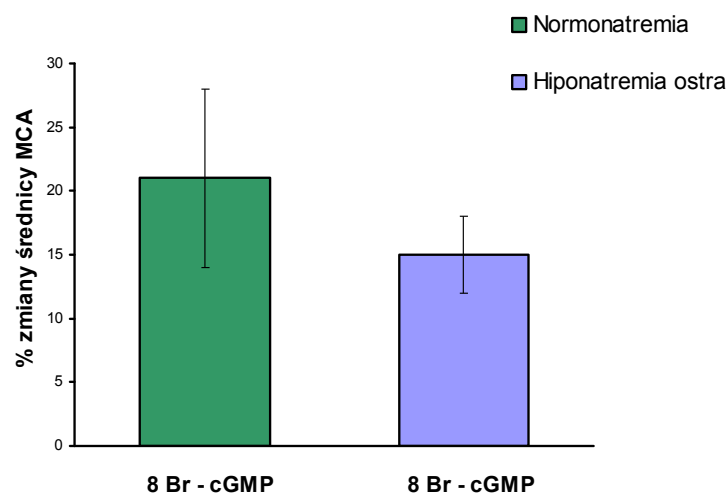
Ryc. 11. Wpływ donora NO - S-nitroso-N-acetyl-DL-penicylaminy (SNAP, 10^{-5} M) na średnicę MCA w normonatremii (n=5) oraz w hiponatremii krótkotrwałej (n=5) i przewlekłej (n=6). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

Podanie SNAP prowadziło do rozszerzenia MCA o $43\pm 4\%$ (ze $143\pm 15\mu\text{m}$ do $205\pm 16\mu\text{m}$; $p<0,001$) w normonatremii oraz o $30\pm 4\%$ (ze $168\pm 10\mu\text{m}$ do $219\pm 13\mu\text{m}$; $p<0,005$) w hiponatremii przewlekłej (ryc. 11). Donor NO nie wywarł natomiast wpływu na średnicę MCA w hiponatremii krótkotrwałej, co może stanowić potwierdzenie postawionej wyżej hipotezy o zaburzeniu funkcji komórek mięśni gładkich.

Z opisanych dotychczas badań wynika, że krótkotrwała hiponatremia powoduje upośledzenie reaktywności MCA w znacznie większym stopniu niż hiponatremia przewlekła. Z tego względu, w dalszej części badań skupiłam się na wyjaśnieniu podłoża zaburzeń obserwowanych w hiponatremii krótkotrwałej.

4.3. WPLYW 8Br-cGMP NA ŚREDNICĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU W KRÓTKOTRWAŁEJ HIPONATREMII

Potencjalną przyczyną opisanych wyżej zaburzeń regulacji MCA w krótkotrwałej hiponatremii mogłaby być upośledzona odpowiedź tej tętnicy na cGMP, który jest jednym z wewnątrzkomórkowych pośredników w działaniu NO na mięśnie gładkie. W celu sprawdzenia tej koncepcji podałam 8Br-cGMP – analog cGMP charakteryzujący się dobrą penetracją błon komórkowych.



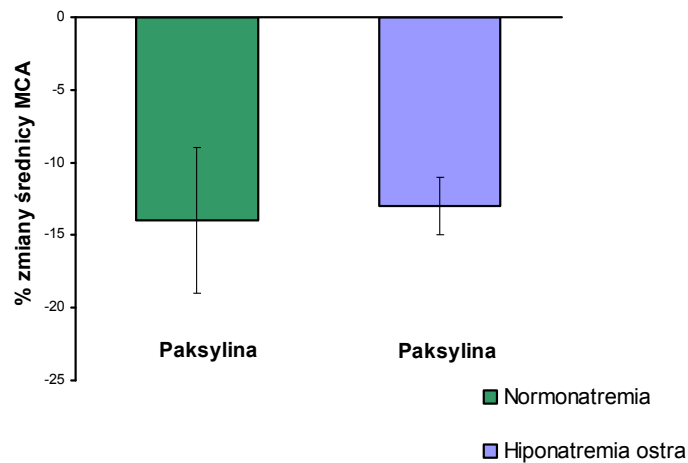
Ryc. 12. Odpowiedź MCA na analog cGMP przechodzący przez błony komórkowe (8Br-cGMP, 10^{-5}M) w normonatremii ($n=5$) i w krótkotrwałej hiponatremii ($n=5$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

Odpowiedź MCA na 8Br-cGMP w krótkotrwałej hiponatremii polegała na rozszerzeniu MCA o $15 \pm 3\%$ ($p < 0,05$) podobnie jak w normonatremii (rozszerzenie MCA o $21 \pm 7\%$, $p < 0,01$), co wskazuje, że w krótkotrwałej hiponatremii nie dochodzi do upośledzenia odpowiedzi MCA na cGMP (ryc.12).

4.4. UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH BK_{Ca} W ODPOWIEDZI TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU NA TLENEK AZOTU W KRÓTKOTRWAŁEJ HIPONATREMII

Działanie NO na mięśnie gładkie w tętnicy środkowej mózgu odbywa się dwutorowo: za pośrednictwem cGMP oraz w mechanizmie niezależnej od cGMP bezpośredniej aktywacji kanałów potasowych BK_{Ca} .

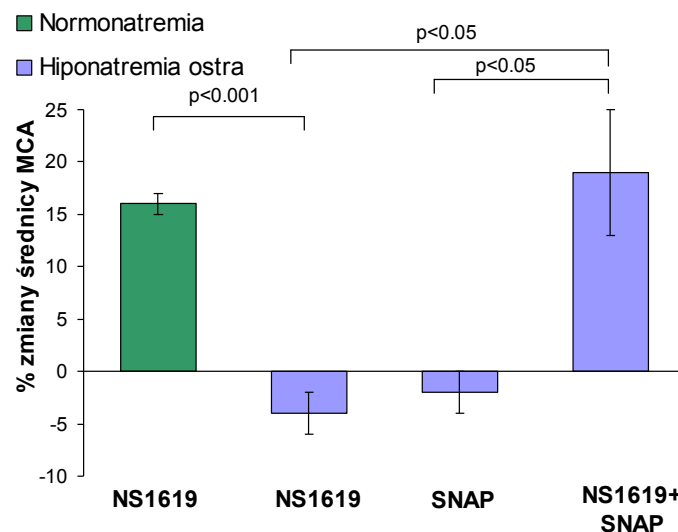
W związku z tym, alternatywną przyczyną braku rozszerzenia MCA po podaniu acetylocholino lub SNAP w krótkotrwałej hiponatremii może być dysfunkcja kanałów BK_{Ca} w mięśniach gładkich ściany MCA. Udział tych kanałów w utrzymaniu napięcia MCA został sprawdzony czynnościowo przy użyciu ich selektywnego inhibitora – paksyliny ($10^{-6}M$, $n=5$).



Ryc. 13. Odpowiedź MCA na inhibitor kanałów potasowych o dużej przewodności aktywowanych jonami Ca^{2+} (BK_{Ca}) – paksyliny ($10^{-6}M$) w normonatremii ($n=5$) oraz w krótkotrwałej hiponatremii ($n=6$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

Po 30 min od momentu dodania paksyliny do buforu zewnątrznaczyniowego zaobserwowałam skurcz MCA zarówno w normonatremii (zwiększenie o $14 \pm 5\%$, ze $135 \pm 6 \mu\text{m}$ do $116 \pm 5 \mu\text{m}$; $p < 0,05$) jak i w krótkotrwałej hiponatremii (zwiększenie o $13 \pm 2\%$, ze $195 \pm 9 \mu\text{m}$ do $170 \pm 8 \mu\text{m}$; $p < 0,05$). Wskazuje to na obecność kanałów BK_{Ca} oraz ich porównywalny, toniczny wpływ na średnicę MCA w obu przypadkach (ryc. 13).

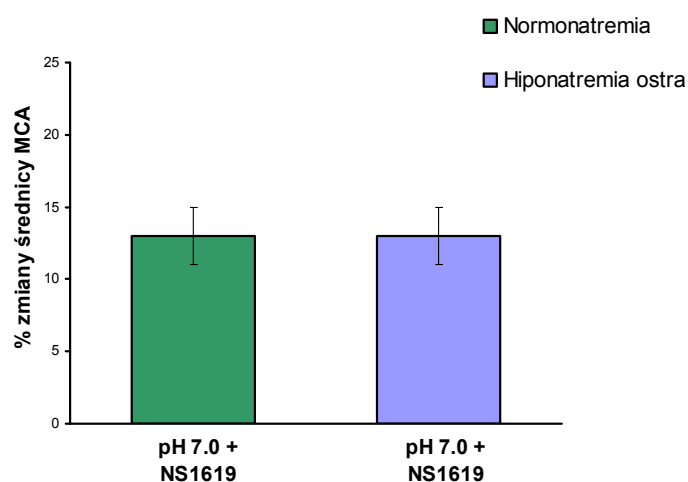
Jednakże aktywator tych kanałów - NS1619 wywołujący rozszerzenie MCA w normonatremii o $16 \pm 1\%$ (ze $148 \pm 16 \mu\text{m}$ do $172 \pm 21 \mu\text{m}$; $p < 0,001$), nie wywierał wpływu na średnicę tego naczynia w krótkotrwałej hiponatremii (ryc. 14). Wynik ten może świadczyć o bliżej nieokreślonej dysfunkcji tych kanałów, a najprawdopodobniej o zmniejszeniu ich wrażliwości na agonistów. Sugestia ta została potwierdzona w następnym doświadczeniu, w którym aktywator tych kanałów podany wraz z donorem NO spowodował rozszerzenie MCA o $19 \pm 6\%$ ($p < 0,05$; co oznacza, że obecność dodatkowego agonisty kanału BK_{Ca} umożliwiła odpowiedź MCA na NO (ryc.14).



Ryc. 14. Wpływ aktywatora kanałów potasowych BK_{Ca} (NS1619, 10^{-5}M) na średnicę MCA w normonatremii ($n=5$) i hiponatremii krótkotrwałej ($n=5$) oraz donora NO na tle NS1619 w hiponatremii krótkotrwałej ($n=7$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

4.5. UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH W ODPOWIEDZI TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU NA KWASICĘ W KRÓTKOTRWAŁEJ HIPONATREMII

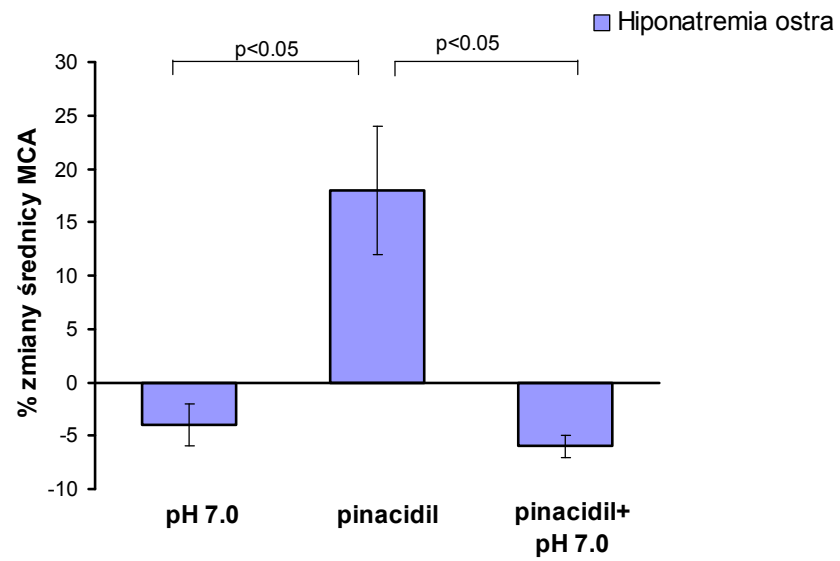
W serii IV została zbadana przyczyna zniesienia odpowiedzi MCA na kwasicę w krótkotrwałej hiponatremii. Według piśmiennictwa rozszerzenie MCA w odpowiedzi na obniżenie pH z 7,4 do 7,0 jest związane z otwarciem kanałów BK_{Ca} i/lub kanałów K_{ATP} [Lindauer i wsp., 2003]. Jedną z przyczyn upośledzonej odpowiedzi MCA na kwasicę w krótkotrwałej hiponatremii mogłoby być zmniejszenie wrażliwości jednego bądź obu wyżej wymienionych kanałów potasowych na agonistów. Sugestię tą wydaje się potwierdzać fakt, że poprzednie serie badań istotnie wskazują na zmniejszenie tej wrażliwości w krótkotrwałej hiponatremii. Podanie aktywatora kanału BK_{Ca} spowodowało przywrócenie odpowiedzi MCA na kwasicę w krótkotrwałej hiponatremii (rozszerzenie o $13 \pm 2\%$; $p < 0,005$). Wynik ten był porównywalny do wyniku z serii kontrolnej, w której po obniżeniu pH do 7,0 na tle aktywatora kanału BK_{Ca} w normonatremii obserwowaliśmy rozszerzenie MCA także o $13 \pm 2\%$; $p < 0,001$ (ryc. 15).



Ryc. 15. Odpowiedź MCA na obniżenie pH do 7,0 na tle aktywatora kanałów potasowych BK_{Ca} ($10^{-5}M$) w normonatremii ($n=5$) i w krótkotrwałej hiponatremii ($n=5$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

Natomiast obniżenie pH z 7,4 do 7,0 na tle aktywatora kanału K_{ATP} – pinacidilu ($10^{-5}M$) nie przywróciło odpowiedzi na kwasicę i w dalszym ciągu obserwowaliśmy skurcz naczyń o $6 \pm 1\%$ ($p < 0,01$), co wskazuje, że przyczyna braku odpowiedzi MCA

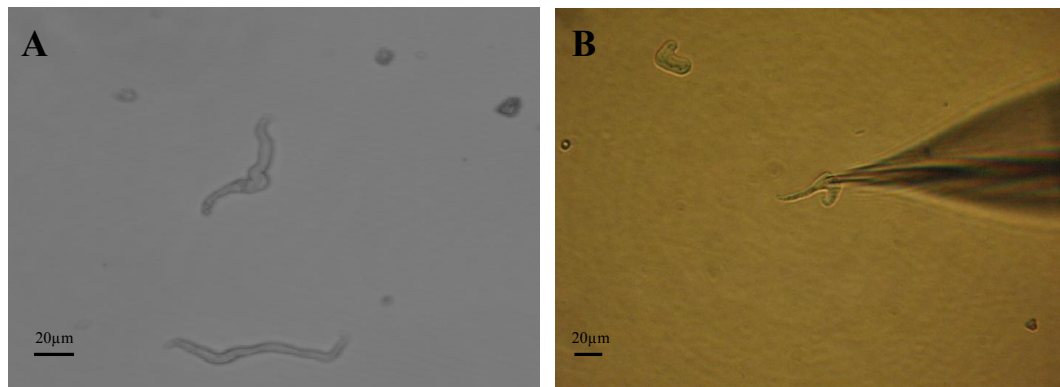
na kwasie w hiponatremii nie jest związana ze zmniejszeniem wrażliwości tych kanałów na agonistów (ryc. 16).



Ryc. 16. Wpływ aktywatora kanałów K_{ATP} – pinacidilu ($n=5$, $10^{-5}M$) oraz obniżenia pH do 7,0 na tle tego aktywatora na średnicę MCA w krótkotrwałej hiponatremii ($n=5$). Słupki na wykresie obrazują wartości średnie \pm S.E.M.

4.6. BADANIA ELEKTROFIZJOLOGII KANAŁÓW POTASOWYCH BK_{Ca} ZA POMOCĄ TECHNIKI PATCH - CLAMP

Badania aktywności kanałów BK_{Ca} w normonatremii i hiponatremii zostały wykonane na świeżo izolowanych komórkach mięśniówki gładkiej tętnicy środkowej mózgu szczura. Badania te były prowadzone za pomocą techniki *patch-clamp*, w konfiguracji *whole-cell*. Długość miocytów wynosiła ok. 75µm. Pojemność elektryczna błony komórkowej, która odpowiada wielkości komórki wynosiła średnio 9±0,8 pF, liczba badanych komórek n=13. Do eksperymentów były wybierane tylko komórki o wydłużonym kształcie (ryc.17).

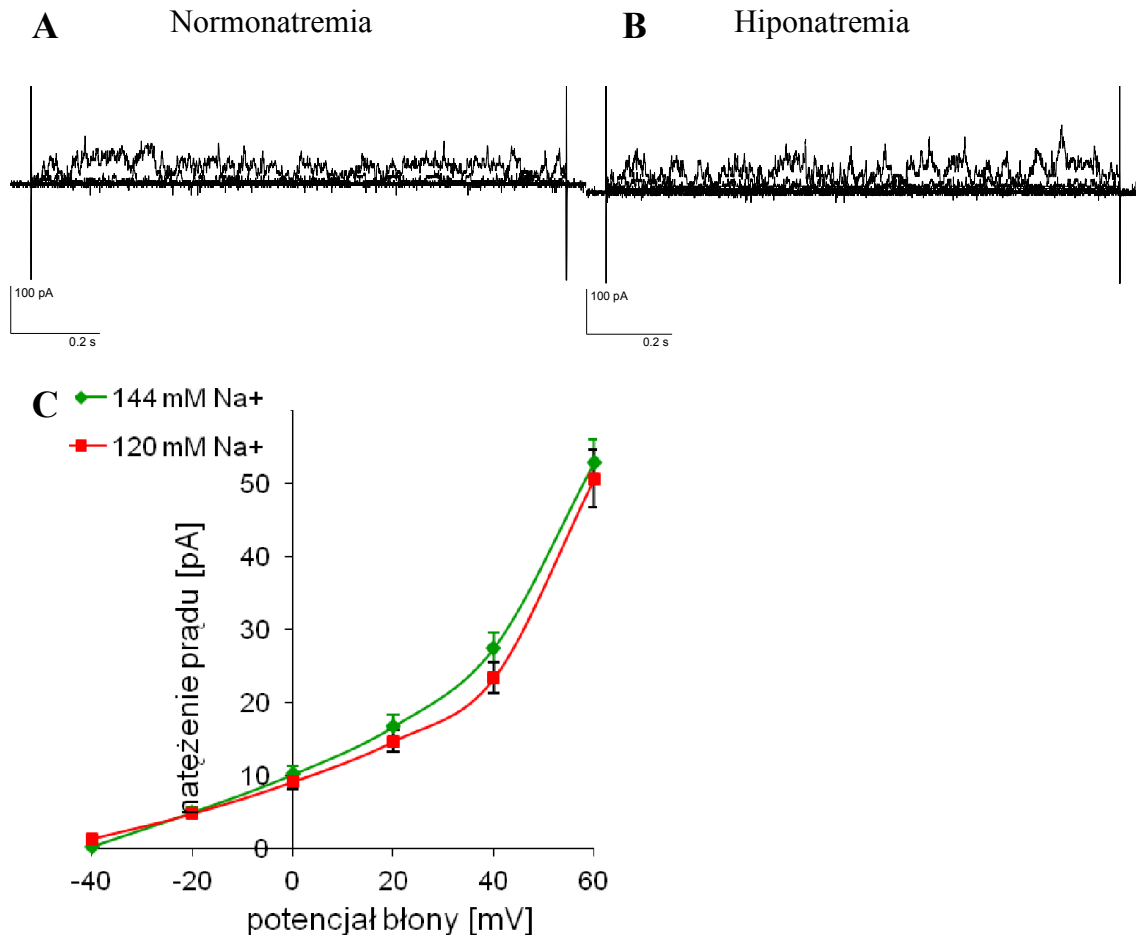


Ryc. 17. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego przedstawiające: A - izolowane komórki mięśniówki gładkiej MCA, B - komórkę miocytu połączoną ze szklaną pipetą w eksperymencie *patch-clamp*.

4.6.1. Wpływ krótkotrwałej hiponatremii na przewodność kanałów BK_{Ca} w komórkach mięśni gładkich tętnicy środkowej mózgu

W tej części pracy badałam, czy obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Na⁺ do poziomu 120 mM przez okres 1 godziny ma wpływ na przewodność kanału potasowego BK_{Ca}. Prąd mierzony był dla potencjałów od -40 mV do +60 mV z potencjałem zmienianym co 20 mV.

Obniżenie stężenia jonów Na⁺ do 120 mM w płynie zewnątrzkomórkowym nie zmieniło przewodności kanału BK_{Ca} przy żadnym z badanych potencjałów błonowych (ryc.18).



Ryc. 18. Reprezentatywny zapis prądów potasowych kanału BK_{Ca} w normonatremii (A) i w hiponatremii (B), oraz zależność natężenia prądów potasowych od potencjału błonowego (C) w normonatremii (144 mM Na⁺) i w hiponatremii (120 mM Na⁺). Liczba komórek n=18. Wartości liczbowe na krzywej C są przedstawione jako średnie ± S.E.M.

4.6.2. Wpływ NS1619 na aktywację kanałów BK_{Ca} w komórkach mięśni gładkich tętnicy środkowej mózgu w normonatremii i w hiponatremii

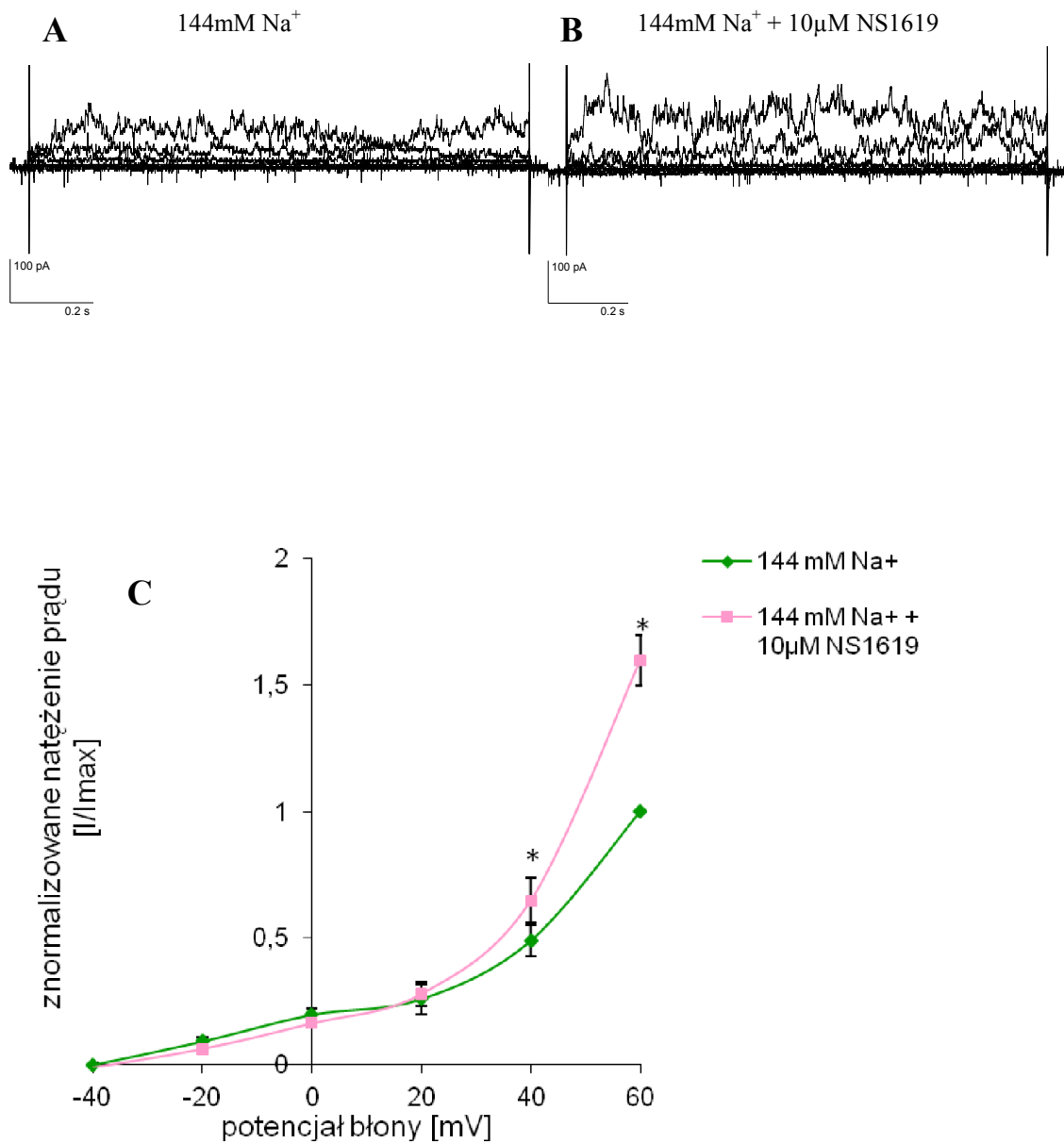
W tej części pracy badałam wpływ NS1619 podanego w dwóch dawkach 1 μM i 10 μM. Natężenie prądów kanału BK_{Ca} było mierzone po 1 oraz po 5 min od momentu podania aktywatora. Ze względu na brak zależnych od czasu różnic w aktywacji kanału, do analizy wybrałam natężenie prądów mierzonych po 1 min od podania aktywatora.

NS1619 podany w wyższej dawce, tzn. takiej jaką stosowałam do badania naczyń izolowanych, spowodował aktywację kanału w normonatremii począwszy od 40mV (ryc. 19). Takiej aktywacji nie zaobserwowałam w hiponatremii, ani przy 40mV, ani przy 60mV (ryc. 20). Wynik ten potwierdza postulowaną w tej pracy hipotezę o zmniejszeniu wrażliwości kanału BK_{Ca} na agonistów w krótkotrwałej hiponatremii i wyjaśnia możliwą przyczynę upośledzonej odpowiedzi izolowanej MCA na NS1619, NO i obniżenie pH do 7,0.

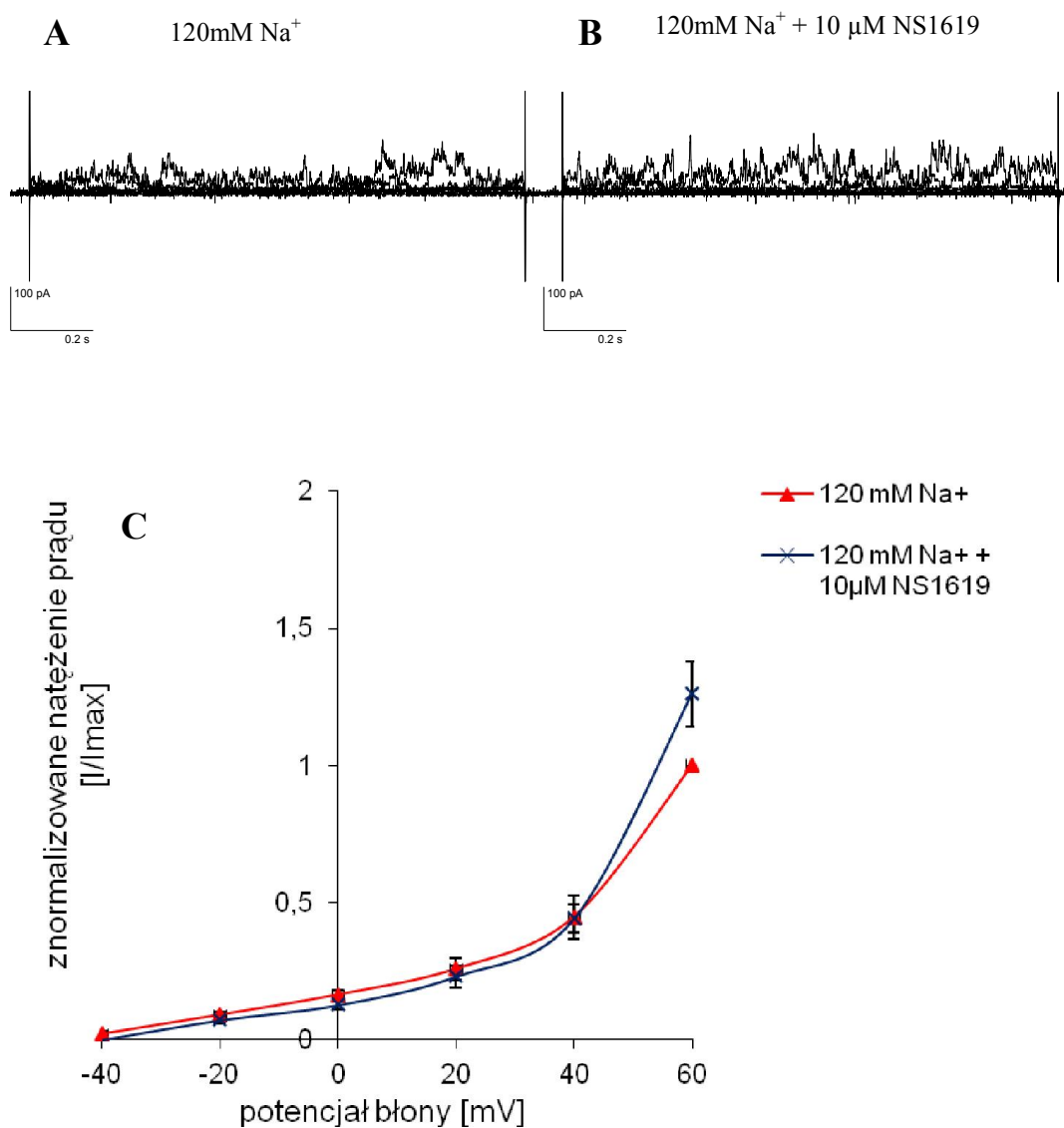
Ponieważ postulowana przeze mnie hipoteza o obniżonej wrażliwości kanału BK_{Ca} na agonistów okazała się prawdziwa, postanowiłam sprawdzić jak ten kanał zareaguje na niższą dawkę aktywatora tzn. 1µM. NS1619 podany w tej dawce nie pobudził kanału BK_{Ca} ani w normonatremii ani w hiponatremii (ryc.21 i 22).

Prądy potasowe przedstawione na krzywych C na ryc. 19-22 zostały znormalizowane do maksymalnego prądu mierzonego w danej komórce przed podaniem aktywatora kanału. Z tego powodu dla wartości obrazujących natężenie prądu potasowego przy potencjale błonowym 60 mV przed podaniem NS1619 na tych rycinach nie są zaznaczone błędy standardowe.

Normalizację prądów stosuje się w celu ominięcia zmiennej związanej z różną wielkością komórek i ilością kanałów.

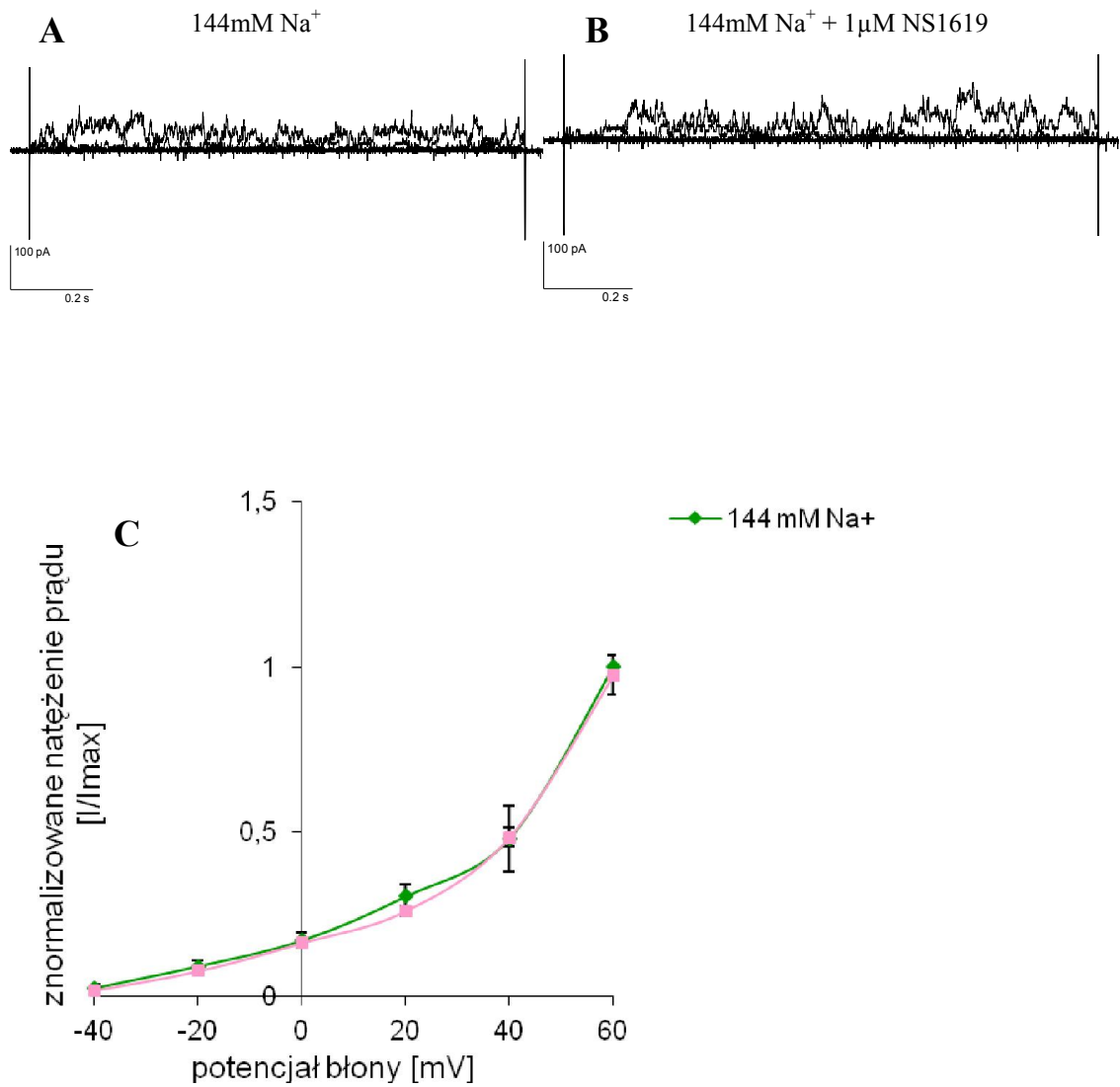


Ryc. 19. Reprezentatywny zapis prądów potasowych kanału BK_{Ca} w normonatremii przed podaniem NS1619 (A) i po podaniu 10 μM NS1619 (B), oraz zależność natężenia prądów potasowych od potencjału błonowego w obu przypadkach (C). Liczba komórek n=5. Wartości liczbowe na krzywej C są przedstawione jako średnie ± S.E.M. Symbol * oznacza istotność statystyczną różnic pomiędzy krzywymi na poziomie p < 0,05.



Ryc. 20. Reprezentacyjny zapis prądów potasowych kanału BK_{Ca} w hiponatremii przed podaniem NS1619 (A) i po podaniu 10 μM NS1619 (B), oraz zależność natężenia prądów potasowych od potencjału błonowego w obu przypadkach (C). Wartości liczbowe na krzywej C są przedstawione jako średnie ± S.E.M.

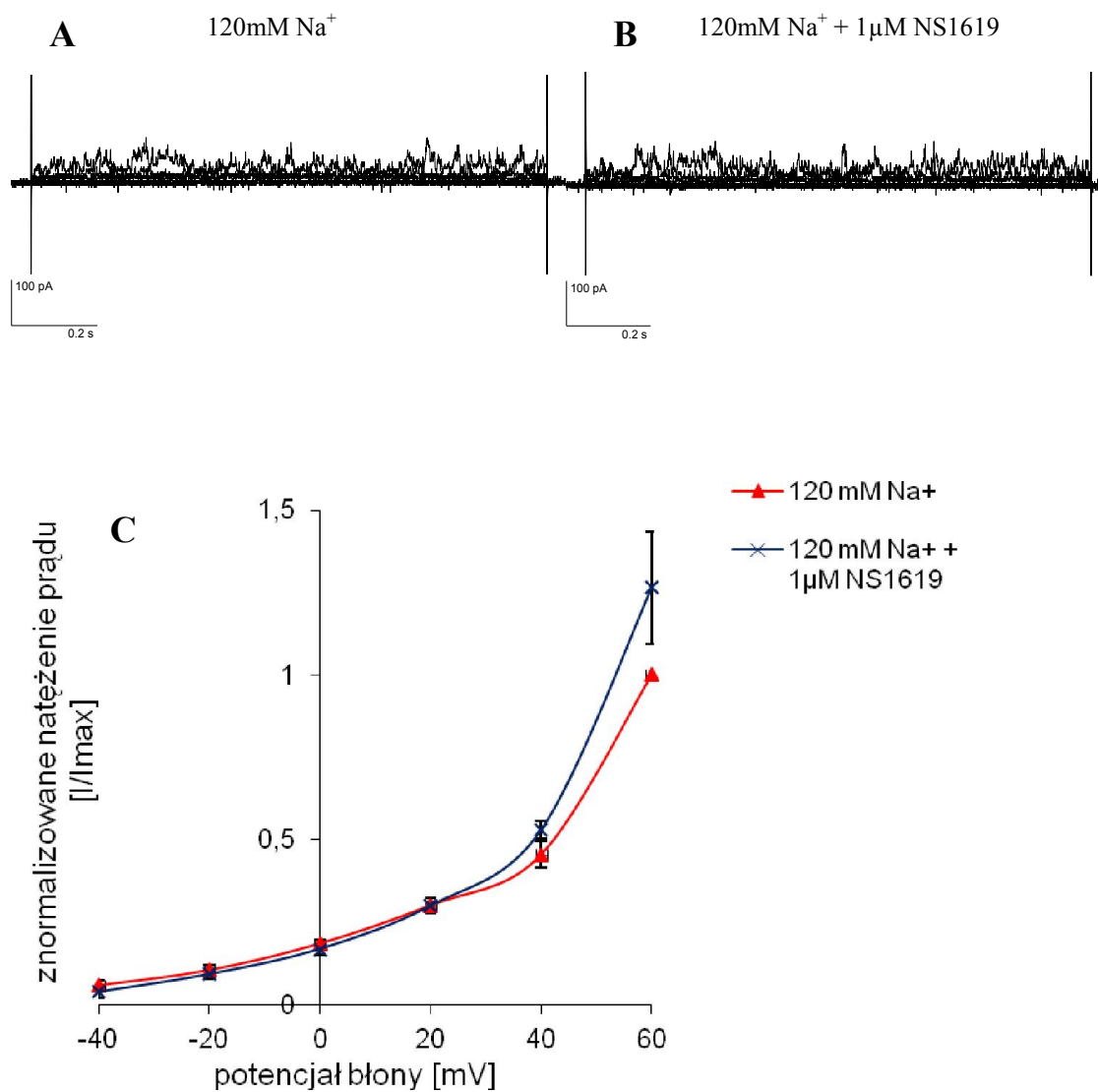
Liczba komórek n=4.



Ryc. 21. Reprezentatywny zapis prądów potasowych kanału BK_{Ca} w normonatremii przed podaniem NS1619 (A) i po podaniu 1 μM NS1619 (B), oraz zależność natężenia prądów potasowych od potencjału błonowego w obu przypadkach (C).

Wartości liczbowe na krzywej C są przedstawione jako średnie ± S.E.M.

Liczba komórek n=5.



Ryc. 22. Reprezentatywny zapis prądów potasowych kanału BK_{Ca} w hiponatremii przed podaniem NS1619 (A) i po podaniu 1 μM NS1619 (B), oraz zależność natężenia prądów potasowych od potencjału błonowego w obu przypadkach (C). Wartości liczbowe na krzywej C są przedstawione jako średnie ± S.E.M. Liczba komórek n=4.

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Uzyskałam następujące wyniki:

1. Zależność średnicy naczynia od ciśnienia perfuzyjnego (autoregulacja) jest zachowana zarówno w krótkotrwałej jak i w przewlekłej hiponatremii.
2. Krótkotrwała hiponatremia zaburza odpowiedź MCA na czynniki biorące udział w regulacji metabolicznej takie jak: zewnątrznaczyniowy wzrost stężenia jonów K^+ i H^+ .
3. Krótkotrwała hiponatremia zaburza odpowiedź MCA na acetylocholinę oraz donor NO.
4. W przewlekłej hiponatremii obserwuje się zniesienie odpowiedzi MCA na zewnątrznaczyniowy wzrost stężenia jonów H^+ przy zachowaniu odpowiedzi na zewnątrznaczyniowy wzrost stężenia jonów K^+ oraz na acetylocholinę i donor NO.
5. W hiponatremii krótkotrwałej nie dochodzi do upośledzenia odpowiedzi MCA na cGMP.
6. Aktywator kanałów BK_{Ca} przywraca odpowiedź MCA na kwasinę, oraz donor NO w krótkotrwałej hiponatremii.

6. DYSKUSJA

6.1. UZASADNIENIE WYBORU OBIEKTU BADAŃ I UŻYTYCH METOD DOŚWIADCZALNYCH

Badania były prowadzone na izolowanej tętnicy środkowej mózgu szczura i na komórkach mięśni gładkich izolowanych z tej tętnicy. Tętnica ta została wybrana do badań, ponieważ jest naczyniem oporowym i bierze udział w regulacji mózgowego przepływu krwi [Faraci i Heistad, 1990]. Ponadto, na naczyniu tym jest zlokalizowanych około 20-43% wszystkich tętniaków wewnątrzczaszkowych, co plasuje tę tętnicę na drugim bądź trzecim miejscu, co do częstości ich występowania [Liebert i wsp., 1999]. Pęknięcie tętniaków prowadzi do krwawienia podpajęczynówkowego, po którym, jak już wspomniałam we wstępie często rozwija się hiponatremia.

Użycie do badań kaniulowanych i perfundowanych naczyń izolowanych jest korzystne ponieważ umożliwia eliminację wpływu otaczających tkanek, przede wszystkim neuronów i astrocytów. Jednocześnie taki układ pozwala na symulację warunków panujących *in vivo*. Podniesienie wewnątrznaczyniowego ciśnienia do poziomu 80 mmHg i powolna perfuzja zapewnia odpowiednie napięcie ściany i działanie siły ścinającej [Bryan i wsp., 2001; Andresen i wsp., 2006]. Nienaruszona warstwa przydanki pozwala na uwalnianie neuroprzekaźników i neuromodulatorów z okołonaczyniowych zakończeń nerwowych [Ignacio i wsp., 1997]. Innymi zaletami użytej metody jest łatwy pomiar średnicy naczynia, utrzymanie warstwy śródbłonka w stanie nieuszkodzonym oraz możliwość podawania badanych substancji zarówno wewnątrznaczyniowo jak i zewnątrznaczyniowo [Schubert, 2004].

Naczynia umieszczałam w roztworze soli fizjologicznej buforowanej MOPS o stężeniu 3 mM, ponieważ większe stężenie MOPS utrudnia wytworzenie napięcia miogennego po podniesieniu wewnątrznaczyniowego ciśnienia do poziomu 80 mmHg [Altura i wsp., 1980]. MOPS umożliwia utrzymanie pH buforu. Alternatywnie, do perfuzji naczyń izolowanych stosuje się płyny nasycone karbogenem (95% O₂ i 5% CO₂) zawierające bufor NaHCO₃. Taka mieszanina gazów wytwarza niefizjologicznie wysokie ciśnienie parcjalne tlenu i w niektórych przypadkach należy ją modyfikować [Schubert, 2004]. Dodanie 1% albuminy do płynu

wewnątrznaczyniowego umożliwiło utrzymanie ciśnienia onkotycznego i zapewniło integralność komórek śródbłonna i przestrzeni wewnątrznaczyniowej [Lindauer i wsp., 2001].

Następną zaletą użytej metody jest możliwość badania wpływu hiponatremii na regulację MCA niezależnie od wazopresyny i peptydów natriuretycznych, które są niezbędne do jej indukcji *in vivo* [Koźniewska i wsp., 1995; Verbalis, 1993]. Mają one wpływ na napięcie naczyń krwionośnych mózgu, co mogłoby skomplikować interpretację wyników [Suzuki i wsp., 1994; Woodard i Rosado, 2008].

W tym kontekście komentarza wymaga także metoda wywołania hiponatremii przewlekłej. Hiponatremię przewlekłą wywoływałam za pomocą pompy osmotycznej (ALZET model 2002, U.S.A.) oraz płynnej diety (AIN -76; Bio-Serv, NJ, U.S.A.) według metody Verbalisa [1993]. Pożądane stężenie uwalnianej wazopresyny uzyskałam metodą prób i błędów, tak by końcowe stężenie sodu w osoczu badanych zwierząt było bliskie 120 mM. Ta metoda została wybrana ponieważ nie powodowała ona śmiertelności zwierząt w przeciwieństwie do hiponatremii przewlekłej wywołanej jej za pomocą iniekcji z wazopresyny argininowej i hipotonicznego roztworu glukozy [Ayus i wsp., 1985]. Stężenie wazopresyny w osoczu szczurów pod koniec wywoływania hiponatremii przewlekłej wynosi około 15 pg/ml [Verbalis, 1993]. Jest to stężenie nie wywołujące efektu presyjnego ani zmiany napięcia naczyń krążenia mózgowego w normonatremii [Koźniewska i wsp., 1987; Suzuki i wsp., 1994].

Z niepublikowanych badań własnych wiadomo również, że wazopresyna w tym stężeniu nie wywiera wpływu na średnicę MCA w hiponatremii krótkotrwałej. Jednocześnie, wyniki otrzymane w mojej pracy doktorskiej wskazują, że hiponatremia przewlekła wpływa na regulację MCA w znacznie mniejszym stopniu niż hiponatremia krótkotrwała. Na tej podstawie można przyjąć, że wazopresyna dodana w stężeniu 15 pg/ml do buforu, w którym *in vitro* były badane MCA pobrane od zwierząt z przewlekłą hiponatremią, nie wywiera wpływu na ich średnicę. Trudno byłoby natomiast odnieść wyniki badań reaktywności tych naczyń w buforze zawierającym wazopresynę do wyników uzyskanych w normonatremii lub hiponatremii krótkotrwałej. W związku z powyższym wazopresyna została pominięta w składzie buforu używanego podczas badania reaktywności MCA w hiponatremii przewlekłej *in vitro*.

Badania prądów kanału BK_{Ca} zostały wykonane za pomocą techniki *patch-clamp* w konfiguracji *whole-cell* na komórkach mięśniówki gładkiej świeżo wyizolowanych z MCA. Konfiguracja ta została wybrana ze względu na możliwość

wymiany płynu zewnątrzkomórkowego. Roztwory do badań aktywności kanałów BK_{Ca} zawierały HEPES, a nie jak w przypadku badań reaktywności naczyń MOPS. Roztwory buforowane HEPES są standardowo używane do techniki patch-clamp i nie znalazłam żadnej publikacji, w której opisane byłoby stosowanie MOPS [Holland i wsp., 1996; Welsh i wsp., 2000; Zhang i wsp., 2010].

Poziom hiponatremii w moich badaniach - obniżenie stężenia jonów sodu do 120 mM w przestrzeni zewnątrz- i wewnątrznaczyniowej - został wybrany na podstawie doniesień piśmiennictwa. Takie stężenie jonów sodu w osoczu obserwowane jest u pacjentów neurochirurgicznych, u których w przebiegu choroby rozwinęła się hiponatremia [Rabinstein i Wijdicks, 2003].

6.2. WPLYW KRÓTKOTRWAŁEJ I PRZEWLEKŁEJ HIPONATREMII NA AUTOREGULACJĘ TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU ORAZ JEJ REGULACJĘ METABOLICZNĄ I REGULACJĘ ZALEŻNĄ OD TLENKU AZOTU

Dyskusję uzyskanych wyników utrudnia fakt, że w większości dostępnych badań dotyczących wpływu hiponatremii na naczynia krwionośne stężenie sodu obniżane jest poniżej 90 mM, bądź badany jest wpływ tylko hipoosmolarności, bez uwzględnienia stężenia jonów Na^+ . W moich badaniach w wyniku obniżenia stężenia jonów sodu do 120 mM uzyskuje się hipoosmolarność MOPS-PSS rzędu 268 ± 5 mOsm/ kgH₂O. Niewiele takich badań jest także prowadzonych na naczyniach krwionośnych mózgu, a w szczególności na tętnicy środkowej mózgu. Mimo to, starałam się unikać porównań uzyskanych przez mnie wyników z wynikami badań prowadzonych na naczyniach pochodzących z innych obszarów krążenia. Wiadomo bowiem, że nawet pomiędzy poszczególnymi naczyniami w krążeniu mózgowym istnieją różnice w mechanizmach regulujących ich napięcie [Yu i wsp., 2002]. Niekiedy jednak zmuszona byłam odwoływać się do publikacji, w których opisane są badania prowadzone na naczyniach bądź komórkach z innych narządów.

6.2.1. Wpływ hiponatremii na autoregulację tętnicy środkowej mózgu

Pierwszym z badanych przeze mnie mechanizmów regulujących napięcie MCA była autoregulacja. Najważniejszą jej funkcją jest utrzymanie napięcia miogenego naczyń krwionośnych mózgu i w związku z tym prawidłowego przepływu krwi przez mózg w warunkach zmian ciśnienia perfuzyjnego [Bayliss, 1902]. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że odpowiedź miogenna MCA jest zachowana zarówno w krótkotrwałej jak i w przewlekłej hiponatremii. W obu przypadkach obserwowałam skurcz MCA wraz ze wzrostem ciśnienia wewnątrznaczyniowego i wyniki te nie różniły się statystycznie od serii kontrolnej w normonatremii. Z danych dostępnych w piśmiennictwie wynika, że odpowiedź miogenna jest zależna zarówno od opóźnionych prostowniczych kanałów K_{DR} , które należą do kanałów potasowych bramkowanych napięciem [Chen i wsp., 2006], jak i od kanałów wapniowych Ca_v również bramkowanych napięciem [Welsh i wsp., 2000]. Aktywacja tych ostatnich pod wpływem wzrostu ciśnienia wewnątrznaczyniowego prowadzi do wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórce [McCarron i wsp., 1997]. Hiponatremia także powoduje wzrost stężenia Ca^{2+} w komórkach mięśni gładkich [Welsh i wsp., 2000]. Zatem ważny wydaje się mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, który odpowiedzialny jest za zapobieganie nadmiernemu skurczowi naczynia w takich warunkach. Za taki mechanizm obok wyżej wspomnianych kanałów K_v odpowiedzialne są także kanały BK_{Ca} [Jaggar, 2001]. Z moich badań wynika, że hiponatremia nie wywiera wpływu na przewodność kanału BK_{Ca} . Z danych piśmiennictwa wynika, że obniżenie stężenia jonów Na^+ nawet do 90 mM nie powoduje zahamowania prądów potasowych kanału K_{DR} w miocytach tętnicy podstawnej mózgu [Wu i wsp., 2007], co wyjaśniałoby prawidłową odpowiedź naczynia na zmiany ciśnienia perfuzyjnego w warunkach hiponatremii. Nie zaobserwowano także zaburzeń regulacji miogennej tylnej tętnicy mózgu szczura w warunkach całkowitego usunięcia sodu z przestrzeni zewnątrznaczyniowej [Nelson i wsp., 1997]. Pozostałe badania dotyczące tych zagadnień prowadzone na naczyniowych pozamózgowych także wskazują na brak wpływu zewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ na autoregulację [Wang i wsp., 2008; Watanabe i wsp., 1996]. Zatem badania przedstawione w tej pracy są zgodne z danymi dostępnymi w piśmiennictwie i wskazują, że hiponatremia niezależnie od czasu jej trwania nie ma wpływu na odpowiedź miogenną tętnicy środkowej mózgu.

6.2.2. Wpływ hiponatremii na regulację metaboliczną tętnicy środkowej mózgu

Średnica naczyń krwionośnych mózgu i przepływ krwi przez mózg są zależne w dużej mierze od zewnątrznaczyniowego stężenia jonów K^+ i H^+ [Dietrich i Dacey, 1994; Kitazano i wsp., 1995]. W tej pracy badany był wpływ wzrostu stężenia obu jonów w przestrzeni zewnątrznaczyniowej na reaktywność MCA zarówno w hiponatremii krótkotrwałej jak i przewlekłej. W obu przypadkach dochodziło do zniesienia odpowiedzi fizjologicznej tzn. rozszerzenia naczyń, które obserwowałam w normonatremii. Z danych dostępnych w piśmiennictwie wynika, że w warunkach fizjologicznych obniżenie pH do 7,0 powoduje rozszerzenie MCA szczura w stopniu podobnym do obserwowanego przez mnie w normonatremii [Lindauer i wsp., 2001].

Obniżenie pH do 7,0 uzyskałam poprzez dodanie HCl do buforu MOPS-PSS, ponieważ nie zawiera on jonów wodorowęglanowych i CO_2 . W warunkach *in vivo* zmiany w zewnątrzkomórkowym pH są związane ze zmianami stężenia CO_2 i/lub HCO_3^- . Czynniki te mają istotny wpływ na napięcie naczyń krwionośnych mózgu. Jednakże wykazano, że zmiany w stężeniu CO_2 przy utrzymaniu zewnątrzkomórkowego pH mają niewielki wpływ na napięcie naczyń krwionośnych mózgu zarówno *in vivo* [Kontos i wsp., 1977] jak i *in vitro* [Toda i wsp., 1989]. Wyniki te sugerują, że odpowiedź naczyń krwionośnych mózgu na zmiany stężenia CO_2 jest związana przede wszystkim ze wzrostem stężenia jonów wodoru w przestrzeni zewnątrznaczyniowej.

W celu przedyskutowania przyczyn braku odpowiedzi MCA na kwasicę w hiponatremii należy przypomnieć, w jaki sposób obniżenie pH wpływa na średnicę naczyń krwionośnych mózgu w normie. Rozszerzenie tych naczyń w kwasicy uwarunkowane jest obecnością NO [Lindauer i wsp., 2001; Horiuchi i wsp., 2002]. Według Lindauer i wsp. [2001] zablokowanie syntazy NO znosi odpowiedź MCA na zewnątrznaczyniowe obniżenie pH do 7,0. Istotne jest jednak źródło NO. Usunięcie śródbłonna –podstawowego źródła NO w naczyniach krwionośnych mózgu nie miało wpływu na ich odpowiedź na kwasicę oddechową i metaboliczną [Toda i wsp., 1989; Yu i wsp., 1994], podczas gdy odnerwienie naczyń znosiło tą odpowiedź. Także Lindauer postuluje udział NO pochodzącego z okołonaczyniowych zakończeń nerwowych w rozszerzeniu MCA w odpowiedzi na obniżenie pH. Istotne jest także jak informacja o wzroście stężenia jonów H^+ jest przekładana na rozszerzenie naczyń.

Wydaje się, że ważną rolę odgrywają tutaj kanały potasowe modulowane zarówno przez NO jak i jony H^+ [Lindauer i wsp., 2001].

Odpowiedź MCA na kwasicę zależna jest od kanałów potasowych K_{ATP} oraz K_{Ca} . W piśmiennictwie często używana jest nazwa K_{Ca} , ale w rzeczywistości są to kanały BK_{Ca} , ponieważ tylko ten podtyp kanałów potasowych zależnych od stężenia jonów wapnia jest obecny w mięśniach gładkich w krążeniu mózgowym. Pozostałe typy kanałów K_{Ca} , czyli IK_{Ca} i SK_{Ca} obecne są w śródbłonku [Faraci i Heistad, 1998; Cipolla i wsp., 2009]. Zablokowanie kanału BK_{Ca} znacząco redukuje odpowiedź MCA na kwasicę, podczas gdy zablokowanie obu kanałów całkowicie ją znosi [Lindauer i wsp., 2003]. Wykazano, że przewodność kanału BK_{Ca} zależna jest od NO produkowanego przez nerwy okołonaczyniowe. Wydaje się, że także kanał K_{ATP} modulowany jest przez tlenek azotu. W naczyniach, w których neuronalny NO odgrywa mniejszą rolę, funkcja kanałów K_{ATP} jest mniej zależna bądź całkowicie niezależna od NO. Natomiast w naczyniach, w których unerwienie nitregiczne jest bogatsze, tak jak w MCA, przynajmniej część przewodności tego kanału zależna jest od NO [Lindauer i wsp., 2003]. Ostatnio wykazano także, że do aktywacji kanałów BK_{Ca} w kwasicy dochodzi w wyniku uwalniania jonów Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych [Dabertrand i wsp., 2012].

W oparciu o cytowane wyniki, brak odpowiedzi MCA na kwasicę w hiponatremii można tłumaczyć albo dysfunkcją kanałów potasowych BK_{Ca} i/lub K_{ATP} , albo zmniejszeniem uwalniania NO z nerwów okołonaczyniowych. Udział aktywacji wymienionych kanałów potasowych w odpowiedzi MCA szczura na obniżenie pH z 7,4 do 7,0 sugerują, jak wspomniałam we wstępie, wyniki uzyskane przez Lindauer i wsp. [Lindauer i wsp., 2001; Lindauer i wsp., 2003]. Natomiast zmniejszenie uwalniania NO z zakończeń nerwowych w MCA jako przyczyna braku jej reaktywności na kwasicę w krótkotrwałej hiponatremii wydaje się mało prawdopodobne wzięwszy pod uwagę brak różnic między normo- i hiponatremią w odpowiedzi tej tętnicy na zablokowanie konstytutywnych syntaz NO.

W związku z tym postanowiłam sprawdzić udział obu typów kanałów potasowych w odpowiedzi MCA na kwasicę w hiponatremii. Podanie aktywatora kanału K_{ATP} pinacidilu, spowodowało rozszerzenie MCA w krótkotrwałej hiponatremii. Wynik ten był porównywalny do działania tego aktywatora w warunkach podstawowych opisywanego przez innych autorów [Lindauer i wsp., 2003], co wskazuje na prawidłową wrażliwość tego kanału w krótkotrwałej hiponatremii. Także

podanie pinacidilu na tle obniżonego pH do 7,0 nie przywróciło odpowiedzi na kwasicę w krótkotrwałej hiponatremii, co wskazuje, że zaburzona odpowiedź MCA na kwasicę w hiponatremii nie jest związana z potencjalną zmianą charakterystyki tego kanału. Natomiast podanie aktywatora kanału BK_{Ca} na tle obniżonego pH przywróciło rozszerzenie MCA w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów H⁺ w przestrzeni zewnątrznaczyniowej. Zatem można przypuszczać, że brak odpowiedzi MCA na obniżenie pH do 7,0 spowodowane było dysfunkcją kanału BK_{Ca}, a dokładniej, jak wykazałam w doświadczeniach wykonanych za pomocą techniki *patch-clamp*, z obniżeniem jego wrażliwości na agonistów. Więcej rozważań na ten temat zawiera dalsza część dyskusji dotycząca udziału kanałów potasowych w regulacji napięcia MCA w hiponatremii (rozdział 6.3, str. 64).

Warto wspomnieć, że w cytowanej wyżej pracy Lindauer i wsp. badając udział kanałów potasowych w odpowiedzi MCA na kwasicę przedstawili hipotezę, że zaburzenia aktywności kanału BK_{Ca} mogą być kompensowane przez kanał K_{ATP} i odwrotnie. Wyniki moich badań wskazują, że taka kompensacja nie ma miejsca w hiponatremii. Skurcz MCA w odpowiedzi na kwasicę w krótkotrwałej hiponatremii obserwowałam pomimo prawidłowego działania kanału K_{ATP}.

Obok jonów H⁺ w regulacji metabolicznej istotną rolę pełnią także jony K⁺. Wzrost stężenia jonów K⁺ w moich badaniach z 3 do 20 mM powodował rozszerzenie MCA w normonatremii i hiponatremii przewlekłej. Efektu takiego nie obserwowałam w krótkotrwałej hiponatremii. Według piśmiennictwa mechanizm rozszerzenia naczyń mózgowych, w tym tętnicy środkowej mózgu, w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów K⁺ w przestrzeni zewnątrznaczyniowej zależy od stopnia hiperkalemii [Golding i wsp., 2001; Lindauer i wsp., 2001]. W zakresie stężeń fizjologicznych 0-5 mM K⁺ rolę odgrywają zmiany aktywności pompy Na⁺-K⁺-ATP [McCaroon i Halpern, 1990]. W przedziale stężeń K⁺ od 7 do 20 mM aktywowane są w mięśniówce gładkiej kanały potasowe K_{IR} [Johnson i wsp., 1998; McCaroon i Halpern, 1990; Lindauer i wsp., 2001]. Wiadomo także, że w rozszerzeniu naczyń mózgowych w odpowiedzi na wzrost zewnątrznaczyniowego stężenia jonów K⁺ do poziomu 20 mM nie biorą udziału ani NO ani kanały potasowe K_{Ca} i K_{ATP} [Schuh-Hofer i wsp., 2001; Lindauer i wsp., 2003]. Zatem w kontekście moich badań można przypuszczać, że zaburzona odpowiedź MCA na wzrost stężenia jonów K⁺ związana jest z upośledzeniem funkcji kanału K_{IR}. Takie przypuszczenie uprawdopodobniają wyniki badań Wu i wsp., którzy wykazali, że obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu do 90mM oraz hipoosmolarność

zaburzają funkcję tych kanałów w tętnicy podstawnej mózgu szczura [Wu i wsp., 2007]. Dla wyjaśnienia uzyskanych przeze mnie wyników potrzebna jest kontynuacja tych badań.

6.2.3. Wpływ hiponatremii na regulację napięcia tętnicy środkowej mózgu zależną od tlenu azotu

Tlenek azotu odgrywa zasadniczą rolę w regulacji napięcia naczyń krwionośnych mózgu [Koźniewska i wsp., 1992; Faraci i Heistad, 1998]. W celu sprawdzenia jego udziału w regulacji napięcia MCA w hiponatremii użyłam acetylocholiny, która pobudza wydzielanie tlenu azotu ze śródbłonka, donora NO, który jest jego egzogennym źródłem, a także nieselektywnego inhibitora konstytutywnej syntazy NO.

Acetylocholina powodowała rozszerzenie MCA w normonatremii i w hiponatremii przewlekłej. Natomiast w hiponatremii krótkotrwałej nie obserwowałam takiej odpowiedzi. Powszechnie wiadomo, że Ach wywołuje rozszerzenie naczyń krwionośnych, w tym MCA szczura [Lindauer i wsp., 2001] w warunkach fizjologicznych. Naczyniorozszerzające działanie acetylocholiny związane jest ze śródbłonkiem, gdyż pobudza ona wydzielanie NO z tej warstwy naczynia [Elhusseiny i Hamel, 2000]. Usunięcie śródbłonka całkowicie znosi rozszerzenie w odpowiedzi na acetylocholinę [Lindauer i wsp., 2001], natomiast odnerwienie naczynia nie zmienia tej odpowiedzi [Lindauer i wsp., 2001], co oznacza, że acetylocholina nie stymuluje uwalniania NO z nerwów okołonaczyniowych. Wobec tego brak rozszerzenia MCA w odpowiedzi na acetylocholinę może wskazywać na dysfunkcję śródbłonka w krótkotrwałej hiponatremii. W piśmiennictwie nie znalazłam publikacji dotyczącej wpływu krótkotrwałej hiponatremii na odpowiedź naczyń krwionośnych mózgu na acetylocholinę. Dostępne piśmiennictwo dotyczy jedynie takiego wpływu w hiponatremii przewlekłej. Przewlekła hiponatremia indukowana przy pomocy wazopresyny u samic szczurów powodowała zaburzoną odpowiedź naczyń krwionośnych mózgu na NO i prostacyklinę. Co więcej, niezależnie od płci i obecności wazopresyny obserwowano także brak odpowiedzi na acetylocholinę [Koźniewska i wsp., 2003; Koźniewska i Radomska, 2001]. Jednakże badania te były prowadzone *in vivo* i dotyczyły mikrokrążenia, podczas gdy w niniejszej pracy badano duże naczynia

krwionośne w systemie *in vitro*, stosując również inną metodę indukowania hiponatremii przewlekłej.

W celu wyjaśnienia, czy w krótkotrwałej hiponatremii dochodzi do zaburzenia funkcji śródbłonna użyłam inhibitora syntazy NO. Zastosowanie tego inhibitora wywarło podobny naczyniokurczący efekt w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii. W świetle braku rozszerzenia MCA po podaniu acetylocholino, powyższy wynik może oznaczać, że w krótkotrwałej hiponatremii dochodzi do obniżenia zdolności śródbłonna do generacji NO. Śródbłonek jest co prawda zdolny do wydzielania NO pod wpływem napięcia ścinania na prawidłowym poziomie ale wyczerpana jest możliwość generacji NO pod wpływem dodatkowego bodźca, jakim jest acetylocholina. Ponadto, L-NAME będąc niespecyficznym inhibitorem syntazy NO blokuje zarówno nNOS jak i eNOS. Według piśmiennictwa zahamowanie NOS zmniejsza średnicę tętnicy środkowej mózgu o 20 – 30% [Lindauer i wsp., 2001; Schuh-Hofer i wsp., 2001]. W moich badaniach obserwowałam porównywalny skurcz o 27% w normonatremii i 26% w hiponatremii. O dużej roli nNOS w MCA świadczy fakt, że np. w tętniczkach powierzchniowych mózgu średnica naczyń nie zmienia się w wyniku zablokowania NOS [Kontos i Wei, 1996; Sun i wsp., 2002], lub zmniejsza się mniej niż 15% [Xu i wsp., 2002], ponieważ naczynia te nie są otoczone przez tkanki produkujące NO i brak im zakończeń nerwów okołonaczyniowych. Odgałęzienia MCA [You i wsp., 1999], jak również tętnica podstawna mózgu [Faraci, 1991] wykazują także mniejszy skurcz w odpowiedzi na inhibitor NOS niż MCA. Z danych tych wynika, że w MCA źródłem NO w dużym stopniu są nerwy okołonaczyniowe [Iadecola i wsp., 1993; Lindauer i wsp., 2001].

Zatem obserwacja braku rozszerzenia MCA przez acetylocholinę, przy zachowanej odpowiedzi na inhibitor syntazy NO w krótkotrwałej hiponatremii nie wyklucza jednoznacznie dysfunkcji śródbłonna. Wskazuje jednak, że potencjalną przyczyną takich odpowiedzi może być zaburzenie funkcji mięśni gładkich MCA.

O dysfunkcji mięśni gładkich świadczy fakt, że donor NO nie wywołał rozszerzenia MCA w hiponatremii krótkotrwałej. Rozszerzenie MCA w odpowiedzi na podanie donora NO obserwowałam natomiast w normonatremii i hiponatremii przewlekłej. Donor NO hamuje enzymy cytochromu P450 4A, które katalizują powstanie naczyniokurczącego 20-HETE [Alonso Galicia i wsp., 1998]. 20-HETE w naczyniach krwionośnych mózgu hamuje z kolei kanały potasowe K_{Ca} [Harder i wsp., 1994]. Donor NO jest także wrażliwy na inhibitor cykazy guanylanowej [Tseng i wsp.,

2000]. Aby wyjaśnić przyczynę braku odpowiedzi MCA na NO podawany egzogennie oraz pobudzany endogennie, należy prześledzić drogi działania tlenu azotu na mięśnie gładkie MCA.

W tętnicy środkowej mózgu odpowiedź mięśni gładkich na tlenek azotu jest zależna od dwóch mechanizmów: pobudzenia cytozolowej cykazy guanylanowej i zwiększenia stężenia cGMP, oraz aktywacji kanałów potasowych K_{Ca} , które biorą udział w odpowiedzi mięśni gładkich na NO niezależnie od cGMP. Szacuje się, że około 50% odpowiedzi MCA na NO jest zależna od cGMP i 50% zależna od K_{Ca} , podczas gdy w tętnicy podstawnej mózgu aż 80% odpowiedzi na NO zależna jest od cGMP [Yu i wsp., 2002; Alonso-Galicia i wsp., 1999].

Zarówno w normonatremii jak i w hiponatremii krótkotrwałej obserwowałam porównywalne rozszerzenie MCA w odpowiedzi na 8Br-cGMP. W obu grupach była zatem podobna wrażliwość na analog cGMP. Rozszerzenie MCA w odpowiedzi na 8Br-cGMP nie jest zmniejszone przez inhibitor kanału K_{Ca} , zatem cGMP bierze udział w rozszerzeniu MCA w mechanizmie niezależnym od tego kanału [Yu i wsp., 2002]. Niektórzy badacze uważają, że cGMP za pośrednictwem kinazy białkowej G, prowadzi do: zahamowania uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych, inaktywacji kanałów wapniowych typu L i spadku wrażliwości białek kurczliwych mięśnia na jony Ca^{2+} . Wydaje się, że w MCA odgrywa rolę ostatni z tych mechanizmów [Sun i wsp., 2000]. 8Br-cGMP aktywuje kinazę białkową G, a więc powoduje obniżenie wrażliwości białek kurczliwych na wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce. Zatem widać, że krótkotrwała hiponatremia nie prowadzi do zahamowania odpowiedzi na cGMP. Nie wiadomo jednak, czy cGMP jest produkowany w hiponatremii w wystarczającym stopniu. Badania, które przeprowadziłam świadczą jedynie o tym, że w hiponatremii nie dochodzi do upośledzenia odpowiedzi MCA na cGMP.

Tlenek azotu rozszerza MCA także w wyniku aktywacji kanałów K_{Ca} . Rola tych kanałów w kontekście odpowiedzi naczyń krwionośnych mózgu na acetylocholinę i donor NO była wielokrotnie dyskutowana [Alonso-Galicia i wsp., 1999; Yu i wsp., 2002; Onoue i Katusis, 1997]. Niektórzy badacze uważają, że w naczyniach pozamózgowych kanał ten jest bezpośrednio aktywowany przez NO [Bolotina i wsp., 1994; Mistry i Garland, 1998]. Sun i wsp. uważają, że aktywacja kanału K_{Ca} związana jest w większym stopniu z obniżeniem poziomu 20-HETE niż z bezpośrednim wpływem NO. Badacze ci potwierdzili wprowadzając technikę *patch-clamp* w konfiguracji *inside out*, że NO może bezpośrednio aktywować kanał K_{Ca} w komórkach

izolowanych z MCA, jednakże stężenie donora NO niezbędne do aktywacji tego kanału było o dwa rzędy wielkości większe niż potrzebne do aktywacji kanału w izolowanym naczyniu. Badania *in vivo* na tętnicy podstawnej mózgu wskazują, że zablokowanie endogennej produkcji NO może uwrażliwić te kanały na NO [Sobey i Faraci, 1997]. W badaniach techniką *patch-clamp* śródbłonek był nieobecny. Możliwe jest więc, że brak endogennej produkcji NO mógł wyolbrzymić rolę kanałów K_{Ca} w rozszerzeniu zależnym od NO [Sun i wsp., 2000]. Ponadto, NO aktywuje te kanały tylko w niektórych naczyniach krwionośnych mózgu. Ta różnorodność zależna jest od rozmiaru naczynia, a także gatunku zwierzęcia. U szczura rozszerzenie mózgowych tętniczek w odpowiedzi na donory NO jest hamowane przez iberiotoksynę. Inhibitory kanałów BK_{Ca} nie zmieniają natomiast odpowiedzi tętniczek mózgowych królika i tętnicy podstawnej szczura w odpowiedzi na donor NO lub acetylocholinę [Faraci i Heistad, 1998; Yu i wsp., 2002]. Można tłumaczyć to tym, że tlenek azotu nie aktywuje kanałów potasowych BK_{Ca} w niektórych rodzajach naczyń krwionośnych mózgu. W tętnicy podstawnej mózgu szczura rozszerzenie naczynia w odpowiedzi na NO zależne jest od kanałów K_V w szlaku zależnym od cGMP [Sobey i Faraci, 1999]. Potencjalnym wyjaśnieniem tego zjawiska może być także to, że tylko NO uwalniany w warunkach podstawowych aktywuje te kanały, a dodatkowo podawany egzogennie, czy też indukowany endogennie nie powoduje dalszej aktywacji kanałów BK_{Ca} [Faraci i Heistad, 1998]. W kontekście badań własnych bardziej prawdopodobna wydaje się ta pierwsza możliwość. Ze względu na istotną rolę kanałów BK_{Ca} w mechanizmach regulujących napięcie MCA a także obszerność tematu, dalszą część dyskusji dotyczącą kanału BK_{Ca} omówię w następnym rozdziale.

6.3. UDZIAŁ KANAŁÓW POTASOWYCH W MECHANIZMACH REGULUJĄCYCH NAPIĘCIE TĘTNICY ŚRODKOWEJ MÓZGU W HIPONATREMII

Wspólnym ogniwem większości mechanizmów regulujących napięcie naczyń krwionośnych mózgu, w tym MCA jest udział kanałów potasowych błony komórkowej mięśni gładkich. Jak wynika z moich badań, a także danych dostępnych w piśmiennictwie, przewodność niektórych z kanałów potasowych jest upośledzona w hiponatremii. Kanałem, którego wrażliwość ulega zmniejszeniu w krótkotrwałej

hiponatremii jest niewątpliwie kanał BK_{Ca} natomiast nie wydaje się, żeby hiponatremia wywierała wpływ na funkcję kanału K_V .

Po pierwsze, jak wynika z moich badań, hiponatremia nie ma wpływu na autoregulację MCA, która w dużej mierze zależy od kanałów K_V . Kanały te według piśmiennictwa nie są upośledzone w hiponatremii w naczyniach krwionośnych mózgu [Wu i wsp., 2007], co wyjaśnia prawidłową autoregulację MCA w tych warunkach. Po drugie w moich badaniach odpowiedź MCA na wzrost stężenia jonów K^+ jest upośledzona, a jak wiadomo z piśmiennictwa odpowiedź ta zależy od kanałów K_{IR} , których aktywność ulega zaburzeniu w naczyniach krwionośnych mózgu [Wu i wsp., 2007] w hiponatremii. Po trzecie zaburzona odpowiedź MCA na NO podawany egzogennie, a także produkowany endogennie zależy od kanałów BK_{Ca} . Od tego rodzaju kanałów zależy także obok kanałów K_{ATP} odpowiedź MCA na kwasicę, która jest upośledzona w hiponatremii krótkotrwałej. Ze względu na kluczową rolę kanałów BK_{Ca} w regulacji MCA zdecydowałam się bliżej zbadać ich funkcję w hiponatremii.

Aby sprawdzić czynnościowo obecność kanałów BK_{Ca} w mięśniówce gładkiej MCA podałam ich inhibitor – paksylinę. Paksylina jest selektywnym inhibitorem tego kanału podobnie jak iberiotoksyna, podczas gdy np. charybdotoksyna hamuje także kanały IK_{Ca} [Faraci i Heistad, 1998; Kitazano i wsp., 1995; Ko i wsp., 2008]. Paksylina powoduje skurcz naczyń krwionośnych mózgu [Zhang i wsp., 2010; Koide i wsp., 2011; Bukiya i wsp., 2013], co świadczy o tonicznym wpływie kanałów BK_{Ca} na utrzymanie napięcia miogenego. W moich badaniach inhibitor ten wywierał taki sam naczyniokurczący wpływ zarówno w normonatremii jak i w hiponatremii. Także eksperymenty wykonane metodą *patch-clamp* na komórkach mięśni gładkich izolowanych z MCA potwierdziły, że obniżenie stężenia jonów Na^+ do 120 mM nie powoduje zmiany przewodności tego kanału.

Następnie zbadałam odpowiedź MCA na podanie aktywatora kanału BK_{Ca} – NS1619. Spowodował on rozszerzenie MCA w normonatremii i wynik ten był porównywalny do wyników badań Lindauer i wsp. [2003]. Natomiast NS1619 nie wywarł wpływu na średnicę MCA w hiponatremii, co wskazywało na dysfunkcję tego kanału, a najprawdopodobniej na obniżoną wrażliwość na agonistów. Także eksperymenty wykonane metodą *patch-clamp* potwierdziły zmniejszenie wrażliwości miocytów izolowanych z MCA na NS1619 w hiponatremii. W normonatremii NS1619 powodował aktywację kanału począwszy od 40mV i wynik ten jest zgodny z badaniami Holland i wsp. [1996]. Natomiast w hiponatremii nie obserwowałam aktywacji kanału

ani przy 40mV, ani przy 60mV. Następstwem obniżonej wrażliwości tego kanału w hiponatremii była upośledzona odpowiedź MCA na podanie donora NO i na kwasicę a także najprawdopodobniej na acetylocholinę. Obecność aktywatora kanału BK_{Ca} przywróciła odpowiedź MCA na SNAP, oraz na wzrost zewnątrznaczyniowego stężenia jonów H⁺ w hiponatremii. Zatem obecność dodatkowego agonisty kanału BK_{Ca} umożliwiła otwarcie tego kanału. Interpretując i dyskutując uzyskane wyniki zakładam, że NS1619 jest selektywnym aktywatorem kanału BK_{Ca}. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego NS1619 wykazuje, że mechanizm działania tego aktywatora nie jest ostatecznie wyjaśniony. Według Holland i wsp. [1996], którzy prowadzili badania na miocytach izolowanych z tętnicy podstawnej mózgu szczura, NS1619 nie tylko bezpośrednio aktywuje ten kanał ale również działa hamująco na prądy wapniowe i kanały K_V. Tak więc NS1619 może zmniejszać działanie kanałów wapniowych poprzez bezpośrednie ich blokowanie, bądź przez aktywację kanałów BK_{Ca}, i w rezultacie zamknięcie kanałów wapniowych [Holland i wsp., 1996]. Według Lindauer i wsp. [2003] w tętnicy środkowej mózgu szczura NS1619 działa raczej jako selektywny aktywator kanałów BK_{Ca}, niż bloker kanałów wapniowych.

W swojej pracy używałam NS1619 o stężeniu 10μM w badaniu jego wpływu na naczynia izolowane. Zastosowałam to stężenie, ponieważ jest ono najczęściej stosowane w badaniach naczyń krwionośnych mózgu [Holland i wsp., 1996; Lindauer i wsp., 2003]. Natomiast w technice *patch-clamp* stosowałam 2 stężenia NS1619: 10μM i 1μM. Według Yamamura i wsp. [2001] 10μM NS1619 powoduje hiperpolaryzację błony miocytu o ok. 6mV i nie ma znaczącego wpływu na stężenie Ca²⁺ w komórce. Należy jednak pamiętać, że kanał BK_{Ca} w naczyniach mózgowych jest znacznie bardziej wrażliwy na wzrost stężenia Ca²⁺ w porównaniu do innych naczyń, ze względu na większy stosunek podjednostki β do α [Yang i wsp., 2013]. Natomiast 1μM NS1619 w badaniach Yamamura i wsp. nie miał wpływu ani na hiperpolaryzację błony miocytu, ani na stężenie Ca²⁺ w komórce. W moich badaniach, taka dawka NS1619 nie wywierała wpływu na aktywność BK_{Ca} ani w normo- ani w hiponatremii. Zastosowałam ją, ponieważ chciałam sprawdzić efekt zależności przewodności kanału BK_{Ca} od dawki aktywatora i w ten sposób wychwycić potencjalne różnice między normo- i hiponatremią.

Podsumowując ten rozdział dyskusji, hiponatremia powoduje zmniejszenie wrażliwości kanałów BK_{Ca} na agonistów, co skutkuje zaburzeniem odpowiedzi tętnicy środkowej mózgu na czynniki regulujące jej napięcie takie jak NO i kwasica. Zarówno

odpowieź MCA na NO jak i na obniżenie pH do 7,0 jest zależna od tego kanału [Lindauer i wsp., 2003; Yu i wsp., 2002]. Potwierdzają to moje badania, w których jednoczesne podanie aktywatora kanałów BK_{Ca} i SNAP lub H⁺ umożliwia powrót odpowiedzi MCA na obie substancje.

6.4. MECHANIZMY ADAPTACYJNE

Bardzo ciekawą obserwacją w mojej pracy jest zachowanie prawidłowej odpowiedzi MCA na acetylocholinę, donor NO i wzrost stężenia jonów K⁺ w hiponatremii przewlekłej w świetle braku takiej odpowiedzi w hiponatremii krótkotrwałej. Wydaje się, że przyczyną tego może być pełna adaptacja w postaci opisanego we wstępie mechanizmu RVD. Przeciwdziała on obrzękowi komórek powstałemu w wyniku obniżenia stężenia jonów Na⁺ w płynie zewnątrzkomórkowym. Mechanizm ten jest szczególnie ważny w mózgu, ze względu na zamknięcie w sztywnej czaszce i niemożność tolerowania znacznych zmian w objętości komórek. W związku z tym, komórki mózgowe posiadają szereg mechanizmów homeostatycznych pozwalających na wyrównanie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów i substancji osmotycznie czynnych, w odpowiedzi na zmiany osmolarności płynu zewnątrzkomórkowego [Trachtman, 1991]. Mechanizmy RVD analizowane były dość dokładnie w neuronach i astrocytach [Ayus i wsp., 2008, Pasantes-Morales, 1996]. Brak jest natomiast danych odnośnie naczyń krwionośnych.

Wyniki uzyskane przez mnie w badaniach reaktywności MCA wyraźnie wskazują, że w hiponatremii krótkotrwałej upośledzenie regulacji tej tętnicy jest znacznie większe niż w hiponatremii przewlekłej. Sugeruje to, że w hiponatremii przewlekłej dochodzi do adaptacji naczyniowej do długotrwałego obniżenia stężenia jonów sodu i hipoosmolarności. Ponieważ nie znalazłam informacji dotyczących odnośnych mechanizmów adaptacyjnych, poniższa część dyskusji oparta jest częściowo na przypuszczeniach.

Uniwersalnym mechanizmem występującym w większości komórek, które uległy obrzęknięciu w warunkach hipotonicznych jest wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia jonów Ca²⁺ [Pasantes-Morales i Morales-Mulia, 2000]. Do takiego wzrostu, jak już wspomniałam wcześniej, dochodzi także w miocytach naczyń krwionośnych mózgu [Welsh i wsp., 2000]. Ten wzrost stężenia jonów wapnia uczestniczy w mechanizmie

regulacyjnego zmniejszenia objętości komórki poprzez aktywację bądź modulację kanałów dla jonów K^+ , Cl^- i organicznych osmotitów. Utrata KCl z komórki wraz z wodą jest głównym mechanizmem regulacji objętości komórki w większości z nich. Jak wynika jednak z przedstawionych przeze mnie badań, a także z piśmiennictwa, hiponatremia nie aktywuje kanałów potasowych w naczyniach krwionośnych mózgu. Być może aktywność tzw. kanałów mechanowrażliwych - BK_{Ca} i K_V , które jak wynika z moich badań oraz badań Wu i wsp. [2007] nie są hamowane w warunkach hiponatremii, jest wystarczająca, aby usunąć jony K^+ i wodę z komórek naczyń w ramach RVD. W tym miejscu należy zaznaczyć, że przytoczone obserwacje własne oraz Wu i wsp. dotyczące przewodności kanałów potasowych w hiponatremii były prowadzone w krótkotrwałej hiponatremii. Nie można jednak wykluczyć, że w miarę trwania hiponatremii dochodzi do zwiększenia przewodności kanałów potasowych w celu lepszego przystosowania komórek ściany naczyniowej do długotrwałego zmniejszenia osmolarności. Wyjaśnienie tych kwestii wymaga dalszych badań.

Do kanałów wrażliwych na zmiany objętości komórki należą także kanały chlorkowe [Nelson i wsp., 1997]. W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłam informacji dotyczących wpływu hiponatremii na przewodność tych kanałów w naczyniach krwionośnych mózgu. Wiadomo jednak, że są one aktywowane w tych warunkach w tętnicy płucnej i nerkowej psa [Yamazaki i wsp., 1998], a także w aorcie szczura [Lang i wsp., 1995]. Niewykluczone więc, że w warunkach hipoosmolalnych aktywacja kanałów chlorkowych, która jest z reguły niezależna od stężenia jonów Ca^{2+} , bierze udział w mechanizmach adaptacyjnych w naczyniach krwionośnych mózgu [Pasantés-Morales i Morales-Mulia, 2000].

Na uwagę zasługuje także brak odpowiedzi MCA na kwasicę w hiponatremii przewlekłej. Był to jedyny spośród badanych czynników, na który odpowiedź MCA była zaburzona w tym typie hiponatremii. Trudno jest wyjaśnić przyczynę tego zjawiska. Wydaje się, że nie ujawniły się w tym przypadku mechanizmy adaptacyjne, bądź były one niewystarczające. Potencjalnym i w pełni spekulatywnym wyjaśnieniem może być hamujący wpływ kanałów jonowych wykrywających środowisko kwaśne (ASICs, ang. *acid-sensing ion channels*) na kanały BK_{Ca} [Petroff i wsp., 2007]. Wiadomo, że kanały ASICs aktywowane są przez zewnątrzkomórkowe obniżenie pH i są one obecne w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych mózgu [Chung i wsp., 2010].

Niezależnie od braku wyjaśnienia w tej pracy mechanizmu leżącego u podłoża zniesienia odpowiedzi na kwasicę w hiponatremii przewlekłej, ważne są potencjalne implikacje kliniczne takiej obserwacji. Rozszerzenie naczyń krwionośnych i zwiększenie przepływu krwi umożliwia wypłukanie jonów wodorowych z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Jest to jeden z kluczowych mechanizmów niezbędnych dla utrzymania homeostazy jonów wodorowych w mózgu. Utrzymujący się, na skutek braku odpowiedniego przepływu krwi, wzrost stężenia tych jonów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej pogłębia uszkodzenie mózgu do jakiego niewątpliwie dochodzi u pacjentów po urazach mózgu lub krwawieniu podpajęczynówkowym. Są to pacjenci u których najczęściej rozwija się hiponatremia.

7. WNIOSKI

Otrzymane wyniki badań upoważniają do sformułowania następujących wniosków:

1. Hiponatremia selektywnie zaburza mechanizmy regulujące napięcie tętnicy środkowej mózgu szczura.
2. Krótkotrwała hiponatremia zaburza regulację napięcia tętnicy środkowej mózgu szczura w większym stopniu niż przewlekła hiponatremia.
3. Kanały potasowe BK_{Ca} biorą udział w utrzymaniu napięcia tętnicy środkowej mózgu szczura w warunkach krótkotrwałej hiponatremii podobnie jak w normonatremii.
4. Krótkotrwała hiponatremia prowadzi do selektywnych zaburzeń funkcji kanałów potasowych w mięśniach gładkich MCA.
5. Krótkotrwała hiponatremia nie wywiera wpływu na przewodność kanałów potasowych BK_{Ca} , ale zmniejsza ich wrażliwości na agonistów.
6. Konsekwencją zmniejszenia wrażliwości kanałów BK_{Ca} na agonistów w hiponatremii krótkotrwałej jest brak odpowiedzi MCA na tlenek azotu i kwasinę.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Alonso-Galicia M, Hudetz AG, Shen H, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 20-HETE to vasodilator actions of nitric oxide in the cerebral microcirculation. *Stroke*. 1999; 30(12):2727-2734.
2. Alonso-Galicia M, Sun CW, Falck JR, Harder DR, Roman RJ. Contribution of 20-HETE to the vasodilator actions of nitric oxide in renal arteries. *Am J Physiol*. 1998; 275:F370–F378.
3. Altura BM, Altura BT, Carella A, Turlapaty PD. Adverse effects of artificial buffers on contractile responses of arterial and venous smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1980; 69: 207–214.
4. Andresen J, Shafi NI, Bryan RM Jr. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol*. 2006; 100(1):318-327.
5. Arieff AI, Kozniowska E, Roberts TP, Vexler ZS, Ayus JC, Kucharczyk J. Age, gender, and vasopressin affect survival and brain adaptation in rats with metabolic encephalopathy. *Am J Physiol*. 1995; 268(5 Pt 2): R1143-1152.
6. Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci*. 2002; 25(12):621-625.
7. Ayus JC, Achinger SG, Arieff A. Brain cell volume regulation in hyponatremia: role of sex, age, vasopressin, and hypoxia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 295(3):F619-624.
8. Ayus JC, Armstrong D, Arieff AI. Hyponatremia with hypoxia: Effects on brain adaptation, perfusion, and histology in rodents. *Kidney Int*. 2006; 69(8):1319-1325.
9. Ayus JC, Krothapalli RK, Armstrong DL. Rapid correction of severe hyponatremia in the rat: histopathological changes in the brain. *Am J Physiol*. 1985; 248(5 Pt 2):F711-719.
10. Baffi J, Gorcs T, Slowik F i wsp. Neuropeptides in the human superior cervical

- ganglion. *Brain Res.* 1992; 570: 272–278.
11. Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B. Kanały potasowe w naczyniach krwionośnych: ich znaczenie w fizjologii i patologii. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007; 17:61:596-605.
 12. Baumbach GL, Heistad DD. Effects of sympathetic stimulation and changes in arterial pressure on segmental resistance of cerebral vessels in rabbits and cats. *Circ Res.* 1983; 52: 527–533.
 13. Bayliss, W. M. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol.* 1902; 28: 220-231.
 14. Bleys RL, Cowen T. Innervation of cerebral blood vessels: morphology, plasticity, age-related, and Alzheimer's disease-related neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2001; 53: 106–118.
 15. Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc Res.* 2005; 69(3):107-127.
 16. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994; 368(6474):850-853.
 17. Bonnet P, Rusch NJ, Harder DR. Characterization of an outward K⁺ current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. *Pflugers Arch.* 1991; 418(3):292-296.
 18. Bryan RM Jr, Marrelli SP, Steenberg ML, Schildmeyer LA, Johnson TD. Effects of luminal shear stress on cerebral arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280(5): H2011-2022.
 19. Bryan RM Jr, You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology.* 2005;102(6):1261-1277.
 20. Bukiya AN, McMillan JE, Fedinec AL, Patil SA, Miller DD, Leffler CW, Parrill AL, Dopico AM. Cerebrovascular dilation via selective targeting of the cholane

- steroid-recognition site in the BK channel β 1-subunit by a novel nonsteroidal agent. *Mol Pharmacol*. 2013; 83(5):1030-1044.
21. Chen TT, Luykenaar KD, Walsh EJ, Walsh MP, Cole WC. Key Role of Kv1 Channels in Vasoregulation. *Circ Res*. 2006; 99:53-60.
 22. Chung WS, Farley JM, Swenson A, Barnard JM, Hamilton G, Chiposi R, Drummond HA. Extracellular acidosis activates ASIC-like channels in freshly isolated cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298(5):C1198-1208.
 23. Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA. SK_{Ca} and IK_{Ca} Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. *Stroke*. 2009; 40(4):1451-1457.
 24. Coenraad MJ, Bolk JH, Frölich M, Meinders AE. Plasma arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide concentration in patients with hyponatremia at diagnosis and following treatment. *Eur J Intern Med*. 2007; 18(3):221-229
 25. Cohen Z, Molinatti G, Hamel E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997; 17: 894–904.
 26. Dabertrand F, Nelson MT, Brayden JE. Acidosis dilates brain parenchymal arterioles by conversion of calcium waves to sparks to activate BK channels. *Circ Res*. 2012; 110(2):285-294.
 27. Davis MJ, Donovitz JA, Hood JD. Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 262 (Cell Physiol 31):C1083-C1088
 28. Dietrich HH, Dacey RGJ. Effects of extravascular acidification and extravascular alkalinization on constriction and depolarization in rat cerebral arterioles in vitro. *J Neurosurg*. 1994; 81: 437–442.
 29. Di Tullio MA, Tayebati SK, Amenta F. Identification of adenosine A1 and A3

- receptor subtypes in rat pial and intracerebral arteries. *Neurosci Lett.* 2004, 366: 48–52.
30. Edvinsson L, Uddman R, Juul R. Peptidergic innervation of the cerebral circulation. Role in subarachnoid hemorrhage in man. *Neurosurg Rev.* 1990; 13: pp. 265–272.
31. Elhuseiny A, Hamel E. Muscarinic–but not nicotinic–acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20:298–305.
32. Faraci FM. Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: large arteries vs. microcirculation. *Am J Physiol.* 1991; 261: H1038-1042.
33. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the Cerebral Circulation: Role of Endothelium and Potassium Channels. *Physiol Rev.* 1998; 78(1):53-97.
34. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res.* 1990; 66: 8–17.
35. Faraci FM, Sobey CG. Role of soluble guanylate cyclase in dilator responses of the cerebral microcirculation. *Brain Res.* 1999, 821: 368–373.
36. Fried LF, Palevsky PM. Hyponatremia and hypernatremia. *Med Clin North Am.* 1997;81(3):585-609.
37. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke and Alzheimer’s disease. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 328–335.
38. Goadsby PJ, Uddman R, Edvinsson L. Cerebral vasodilatation in the cat involves nitric oxide from parasympathetic nerves. *Brain Res.* 1996; 707: 110–118.
39. Gokina NI, Park KM, McElroy-Yaggy K, Osol G. Effects of Rho kinase inhibition on cerebral artery myogenic tone and reactivity. *J Appl Physiol.* 2005; 98(5):1940-1948.

40. Golanov EV, Reis DJ. Oxygen and cerebral blood flow. (Primer on Cerebrovascular Diseases, Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B) *San Diego, CA: Academic Press, 1997.*
41. Golding EM, Marrelli SP, You J, Bryan RM Jr. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? *Stroke.* 2002; 33(3):661-663.
42. Golding EM, Steenberg ML, Johnson TD, Bryan RM. Nitric oxide in the potassium induced response of the rat middle cerebral artery: a possible permissive role. *Brain Res.* 2001; 889(1-2):98-104.
43. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 1059–1064.
44. Handa Y, Caner H, Hayashi M, Tamamaki N, Nojyo Y. The distribution pattern of the sympathetic nerve fibers to the cerebral arterial system in rat as revealed by antegrade labeling with WGA-HRP. *Exp Brain Res.* 1990; 82: 493–498.
45. Hara H, Hamill GS, Jacobowitz DM. Origin of cholinergic nerves to the rat major cerebral arteries: coexistence with vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res Bull.* 1985; 14: 179–188.
46. Harder DR, Gebremedhin D, Narayanan D, Birks EK, Roman RJ. Formation and action of a P4504A metabolite of arachidonic acid in cat cerebral microvessels. *Am J Physiol.* 1994; 266: H2098–H2107.
47. Hasan D, Wijdicks EF, Vermeulen M. Hyponatremia is associated with cerebral ischemia in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Ann Neurol.* 1990; 27:106–108.
48. Hawkins RC. Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia. *Cli. Chim. Acta.* 2003; 337 (1–2): 169–172.
49. Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP. Effects of the BK_{Ca} channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1996; 117(1):119-129.

50. Horiuchi T, Dietrich HH, Hongo K, Goto T, Dacey RG. Role of endothelial nitric oxide and smooth muscle potassium channels in cerebral arteriolar dilation in response to acidosis. *Stroke*. 2002; 33: 844–849.
51. Iadecola C. Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 3913–3916.
52. Iadecola C. Cerebral circulatory dysregulation in ischemia (Cerebrovascular Diseases: pathophysiology, diagnosis, and management. Ginsberg MD, Bogousslavsky J) *Cambridge, MA: Blackwell Science*. 1998; 319–332.
53. Iadecola C, Beitz AJ, Renno W, Xu X, Mayer B, Zhang F. Nitric oxide synthase-containing neural processes on large cerebral arteries and cerebral microvessels. *Brain Res*. 1993; 606: 148–155.
54. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14(2):175-192.
55. Ignacio CS, Curling PE, Childres WF, Bryan RMJ. Nitric oxide-synthesizing perivascular nerves in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol* . 1997; 273: R661–R668.
56. Jaggar JH. Intravascular pressure regulates local and global Ca^{2+} signaling in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281:C439-C448.
57. Jiménez-Altayó F, Martín A, Rojas S, Justicia C, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Vila E. Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(1):H628-635.
58. Johnson TD, Marrelli SP, Steenberg ML, Childres WF, Bryan RM Jr. Inward rectifier potassium channels in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol*. 1998; 274: 541-547.

59. Johnston J, Steiner LA AJ, Gupta AK, Menon DK. Cerebral oxygen vasoreactivity and cerebral tissue oxygen reactivity. *Br J Anaesth.* 2003; 90: 774–786.
60. Kety SS, Schmidt CF. The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men. *J Clin Invest.* 1948; 27: 484–492.
61. Kitazono T, Faraci FM, Taguchi H, Heistad DD. Role of Potassium Channels in Cerebral Blood Vessels. *Stroke.* 1995; 26:1713-1723.
62. Kleppisch T, Nelson MT. Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12441–12445.
63. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent K⁺ channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1995; 269:H348–H355.
64. Knot HJ, Nelson MT. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol.* 1998; 508:199–209.
65. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 1994; 298: 249–258.
66. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008; 44(2):65-81.
67. Koide M, Nystoriak MA, Krishnamoorthy G, O'Connor KP, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. Reduced Ca²⁺ spark activity after subarachnoid hemorrhage disables BK channel control of cerebral artery tone. *J Cereb Blood Flow Metab.* 201; 31(1):3-16.
68. Kontos HA, Raper AJ, Patterson JL. Analysis of vasoactivity of local pH, PCO₂ and bicarbonate on pial vessels. *Stroke.* 1977; 8:358–360.

69. Kontos HA, Wei EP. Arginine analogues inhibit responses mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol.* 1996; 271: H1498–H1506.
70. Kormann R, Philippart F, Hubert S, Bruel C. Marathon runner with acute hyponatremia: a neurological disorder. *Case Rep Emerg Med.* 2012; 2012:342760.
71. Koźniewska E, Oseka M, Styś T. Effects of endothelium-derived nitric oxide on cerebral circulation during normoxia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992 Mar;12(2):311-317.
72. Koźniewska E, Podlecka A, Rafałowska J. Hyponatremic encephalopathy – some experimental and clinical findings. *Folia Neuropathol.* 2003; 41(1): 41-45.
73. Koźniewska E, Radomska L. Suppression of basal NO- and prostacyclin-dependent tone in cerebral microcirculation during chronic hyponatremia in female rats. *Med Sci Monit.* 2001; 7(4):641-645.
74. Koźniewska E, Roberts TPL, Vexler ZS, Oseka M, Kucharczyk J, Arieff A. Hormonal dependence of the effects of metabolic encephalopathy on cerebral perfusion and oxygen utilization in the rat. *Circ Res.* 1995; 76: 551-558.
75. Koźniewska E, Weller L, Höper J, Harrison DK, Kessler M. Cerebrocortical microcirculation in different stages of hypoxic hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987; 7(4):464-70.
76. Lang F, Busch GL, Zempel G, Ditlevsen J, Hoch M, Emerich U, Axel D, Fingerle J, Meierkord S, Apfel H i wsp. Ca²⁺ entry and vasoconstriction during osmotic swelling of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 199; 431(2):253-258.
77. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia.* 2002; 22: 54–61.
78. Ledoux J., Werner M.E., Brayden J.E., Nelson M.T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology.* 2006; 21: 69–78.

79. Li G, Cheung DW. Modulation of Ca^{2+} -dependent K^+ currents in mesenteric arterial smooth muscle cells by adenosine. 2000; *Eur J Pharmacol*; 394: 35–40.
80. Liamis G, Milionis H, Elisaf M. A review of drug-induced hyponatremia. *Am J Kidney Dis*. 2008; 52(1):144-153.
81. Liebert W, Nowak S, Smól S, Majewski T, Dobrzycki Z. Tętniaki tętnicy środkowej mózgu. *Neuroskop*. 1999; 1:73-77.
82. Lincoln J. Innervation of cerebral arteries by nerves containing 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Pharmacol Ther*. 1995; 68: 473–501.
83. Lindauer U, Kunz A, Schuh-Hofer S, Vogt J, Dreier JP, Dirnagl U. Nitric oxide from perivascular nerves modulates cerebral arterial pH reactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281(3):H1353-1363.
84. Lindauer U, Vogt J, Schuh-Hofer S, Dreier JP, Dirnagl U. Cerebrovascular vasodilation to extraluminal acidosis occurs via combined activation of ATP-sensitive and Ca^{2+} -activated potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003; 23(10):1227-1238.
85. Maddahi A, Edvinsson L. Enhanced expressions of microvascular smooth muscle receptors after focal cerebral ischemia occur via the MAPK MEK/ERK pathway. *BMC Neurosci*. 2008; 9:85.
86. Marchenko SM, Sage SO. Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol*. 1996; 492 (Pt 1):53-60.
87. McCarron JG, Crichton CA, Langton PD, MacKenzie A, Smith GL. Myogenic contraction by modulation of voltage-dependent calcium currents in isolated rat cerebral arteries. 1997; *J. Physiol*. 498: 371-379.
88. McCarron JG, Halpern W. Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol*. 1990; 259: 902-908.
89. Mesh CL, Gewertz BL. The effect of hemodilution on blood flow regulation in normal and postischemic intestine. *J Surg Res*. 1990; 48(3):183-189.

90. Miller M. Hyponatremia and arginine vasopressin dysregulation: mechanisms, clinical consequences, and management. *J Am Geriatr Soc.* 2006; 54(2):345-353.
91. Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1998; 124(6):1131-1140.
92. Mufti RE, Brett SE, Tran CH, Abd El-Rahman R, Anfinogenova Y, El-Yazbi A, Cole WC, Jones PP, Chen SR, Welsh DG. Intravascular pressure augments cerebral arterial constriction by inducing voltage-insensitive Ca^{2+} waves. *J Physiol.* 2010; 588(Pt 20):3983-4005.
93. Nelson MT, Conway MA, Knot H J, Brayden JE. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J. Physiol.* 1997; 502:259:264.
94. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995; 268(4 Pt 1):C799-822.
95. Onoue H, Katusic ZS. Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. *Stroke.* 1997; 28:1264–1271.
96. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327(6122):524-526.
97. Pasantes-Morales H. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms, *Met. Brain Dir.* 1996; 11:187-204.
98. Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G, Tuz KL. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med.* 2006; 119:S4-11.
99. Pasantes-Morales H, Morales Mulia S. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 2000; 86(4):414-27.
100. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1990; 2:161–192.

101. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 10625-10629.
102. Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012; 32(7):1152-1166.
103. Pelligrino DA, Gay RL 3rd, Baughman VL, Wang Q. NO synthase inhibition modulates NMDA-induced changes in cerebral blood flow and EEG activity. *Am J Physiol.* 1996; 271(3 Pt 2):H990-995.
104. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med.* 2011; 2011:823525.
105. Petroff EY, Price MP, Snitsarev V, Gong H, Korovkina V, Abboud FM, Welsh MJ. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(8):3140-3144.
106. Pickard JD, Mackenzie ET. Inhibition of prostaglandin synthesis and the response of baboon cerebral circulation to carbon dioxide. *Nat New Biol.* 1973; 245: 187–188.
107. Quayle J.M., Nelson M.T., Standen N.B.: ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1997; 77: 1165–1232.
108. Rabinstein AA. Vasopressin antagonism: potential impact on neurologic disease. *Clin Neuropharmacol.* 2006; 29(2):87-93.
109. Rabinstein AA, Wijdicks EF. Hyponatremia in critically ill neurological patients. *Neurologist.* 2003; 9(6):290-300.
110. Reivich M. Arterial PCO₂ and cerebral hemodynamics. *Am J Physiol.* 1964; 206: 25–35.
111. Rosenblum WI, Wei EP, Kontos HA. Dimethylsulfoxide and ethanol, commonly used diluents, prevent dilation of pial arterioles by openers of K(ATP) ion channels. *Eur J Pharmacol.* 2001b; 430: 101–106.

112. Roy CS, Sherrington CS. On the regulation of the blood-supply of the brain. *J Physiol.* 1890; 11: 85–108.
113. Rusko J, Tanzi F, Breemen C, Adams DJ. Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca^{2+} sensitivity and block. *J Physiol.* 1992; 455: 601–621
114. Schubert R. Isolated vessels (Practical methods in cardiovascular research: Dhein S, Mohr FW, Delmar M) *Springer.* 2004; 198-214.
115. Schuh-Hofer S, Lobsien E, Brodowsky R, Vogt J, Dreier JP, Klee R, Dirnagl U, Lindauer U. The cerebrovascular response to elevated potassium - role of nitric oxide in the *in vitro* model of isolated rat middle cerebral arteries. *Neurosci Lett.* 2001; 306: 61–64.
116. Sobey CG, Faraci FM. Effect of nitric oxide and potassium channel agonists and inhibitors on basilar artery diameter. *Am J Physiol.* 1997; 272(1 Pt 2):H256-262.
117. Sobey CG, Faraci FM. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1999; 126:1437–1443.
118. Standen NB, Quayle JM. K^+ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand.* 1998; 164(4):549-557.
119. Stenman E, Malmjö M, Uddman E, Gidö G, Wieloch T, Edvinsson L. Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ET(B) receptors in rat. *Stroke.* 2002; 33(9):2311-2316.
120. Sun CW, Falck JR, Okamoto H, Harder DR, Roman RJ. (2000) Role of cGMP versus 20-HETE in the vasodilator response to nitric oxide in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279(1):H339-350.
121. Suzuki Y, Satoh S, Oyama H, Takayasu M, Shibuya M, Sugita K. Vasopressin mediated vasodilation of cerebral arteries. *J Auton Nerv Syst.* 1994; 49: S129-132.

122. Taguchi H, Heistad DD, Kitazono T, Faraci FM. ATP-sensitive K⁺ channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia. *Circ Res.* 1994; 74: 1005–1008.
123. Talman WT, Corr J, Nitschke Dragon D, and Wang D. Parasympathetic stimulation elicits cerebral vasodilatation in rat. *Auton Neurosci* 2007; 133(2): 153–157.
124. Toda N, Hatano Y, Mori K. Mechanisms underlying response to hypercapnia and bicarbonate of isolated dog cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1989; 257:H141–H146.
125. Tong XK, Hamel E. Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex: cellular basis for cortical blood flow regulation. *Eur J Neurosci.* 2000; 12(8):2769-80.
126. Trachtman H. Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances. *Pediatr Nephrol.* 1991; 5(6):743-750.
127. Treschan TA, Peters J. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology.* 2006; 105(3): 599-612.
128. Tseng CM, Tabrizi-Fard MA, Fung HL. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292(2): 737-742.
129. Wang Q, Pelligrino DA, Baughman VL, Koenig HM, Albrecht RF. The role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of cerebral blood flow in normocapnia and hypercapnia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995; 15(5):774-778.
130. Wang Q, Pelligrino DA, Koenig HM, Albrecht RF. The role of endothelium and nitric oxide in rat pial arteriolar dilatatory response to CO₂ in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994; 14:944-957.

131. Wang X, Takeya K, Aaronson PI, Loutzenhiser K, Loutzenhiser R. Effects of amiloride, benzamil, and alterations in extracellular Na⁺ on the rat afferent arteriole and its myogenic response. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295: F272–F282.
132. Watanabe J, Horiguchi S, Keitoku M, Karibe A, Takeuchi M, Suzuki S, Satoh S, Shirato K. The role of extracellular cations in the development of myogenic contraction in isolated rat small arteries. *Jpn. Circ. J.* 1996; 60:239-246.
133. Weber JR, Angstwurm K, Bove GM et al. The trigeminal nerve and augmentation of regional cerebral blood flow during experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 1319–1324.
134. Welsh DG, Nelson MT, Eckman DM, Brayden JE. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J Physiol.* 2000; 527 Pt 1:139-148.
135. White RP, Hindley C, Bloomfield PM, Cunningham VJ, Vallance P, Brooks DJ, Markus HS. The effect of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA on basal CBF and vasoneuronal coupling in man: a PET study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 673–678.
136. Woodard GE, Rosado JA. Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008; 268: 59-93.
137. Wu BN, Luykenaar KD, Brayden JE, Giles WR, Corteling RL, Wiehler WB, Welsh DG. Hyposmotic challenge inhibits inward rectifying K⁺ channels in cerebral arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(2):H1085-1094.
138. Vaidya C, Ho W, Freda BJ. Management of hyponatremia: Providing treatment and avoiding harm. *Cleve Clin J Med.* 2010; 77(10):715-726.
139. Vang A, Mazer J, Casserly B, Choudhary G. Activation of endothelial BK_{Ca} channels causes pulmonary vasodilation. *Vascul Pharmacol.* 2010; 53(3-4):122-129.

140. Vatter H, Konczalla J, Seifert V. Endothelin related pathophysiology in cerebral vasospasm: what happens to the cerebral vessels? *Acta Neurochir Suppl.* 2011; 110(Pt 1):177-180.
141. Verbalis JG. Hyponatremia induced by vasopressin or desmopressin in female and male rats. *Am J Soc Nephrol.* 1993; 3:1600-1606.
142. Verbalis JG, Gullans SR. Hyponatremia causes large sustained reductions in brain content of multiple organic osmolytes in rats. *Brain Res.* 1991; 567(2):274-282.
143. Xu HL, Feinstein DL, Santizo RA, Koenig HM, Pelligrino DA. Agonist-specific differences in mechanisms mediating eNOS-dependent pial arteriolar dilation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H237–H243.
144. Xu K, Lamanna JC. Chronic hypoxia and the cerebral circulation. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 725–730.
145. Yamamura H, Ohi Y, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol.* 2001; 132(4):828-834.
146. Yamazaki J, Duan D, Janiak R, Kuenzli K, Horowitz B, Hume JR. Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 1998; 507 (Pt 3):729-736.
147. Yang Y, Sohma Y, Nourian Z, Ella SR, Li M, Stupica A, Korthuis RJ, Davis MJ, Braun AP, Hill MA. Mechanisms underlying regional differences in the Ca^{2+} sensitivity of BK_{Ca} current in arteriolar smooth muscle. *J Physiol.* 2013; 591(Pt 5):1277-1293.
148. Yeates KE, Singer M, Morton AR. Salt and water: a simple approach to hyponatremia. *CMAJ.* 2004; 3:70(3):365-369.

149. You J, Johnson TD, Marrelli SP, Bryan RMJ. Functional heterogeneity of endothelial P2 purinoceptors in the cerebrovascular tree of the rat. *Am J Physiol.* 1999; 277: H893–H900.
150. Yu M, Sun CW, Maier KG, Harder DR, Roman RJ. Mechanism of cGMP contribution to the vasodilator response to NO in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H1724–H1731.
151. Zhang HT, Wang Y, Deng XL, Dong MQ, Zhao LM, Wang YW. Daidzein relaxes rat cerebral basilar artery via activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2010; 630(1-3):100-106.
152. Zhong XZ, Harhun MI, Olesen SP, Ohya S, Moffatt JD, Cole WC, Greenwood IA. Participation of KCNQ (Kv7) potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter. *J Physiol.* 2010; 588(Pt 17):3277-3293.

9. STRESZCZENIE

Jon sodu jest głównym kationem przestrzeni zewnątrzkomórkowej odgrywającym istotną rolę w utrzymaniu równowagi wodno-elektrolitowej, osmotycznej i kwasowo-zasadowej. Zakres stężenia tego jonu w płynie zewnątrzkomórkowym w warunkach fizjologicznych wynosi 136-145 mM. Obniżenie stężenia jonu sodu poniżej 136 mM nazywane jest hiponatremią, zaś jego podwyższenie powyżej 145 mM hipernatremią. Hiponatremia jest dość powszechnym zaburzeniem gospodarki wodno-elektrolitowej obserwowanym w warunkach szpitalnych. Dotyczy ona aż 28% pacjentów hospitalizowanych, 21% zgłaszających się do izby przyjęć i około 7% pacjentów ambulatoryjnych. Hiponatremia diagnozowana jest w takich schorzeniach jak: niedoczynność tarczycy, zastoinowa niewydolność serca, marskość wątroby, zespół nerczycowy, nowotwory oraz choroby ośrodkowego układu nerwowego. Grupę ryzyka stanowią także pacjenci, którym podawane są leki antydepresyjne, przeciwpadaczkowe i diuretyki pętlowe. Sporadycznie hiponatremia może się także rozwijać po zastosowaniu leków rutynowo używanych w praktyce klinicznej takich jak: leki przeciwnadciśnieniowe, antybiotyki oraz inhibitory pompy protonowej.

Hiponatremia jest jednak najbardziej niebezpieczna dla pacjentów neurochirurgicznych, u których diagnozowana jest często po krwawieniu podpajęczynówkowym, urazach mózgu, krwawieniu śródmózgowym oraz zapaleniu opon mózgowych. Zaburzenie to może wystąpić również u pacjentów po operacjach podwzgórza i tylnego płata przysadki, gdzie wytwarzany i uwalniany jest do krwi hormon antydiuretyczny.

Dotychczasowe badania dotyczące wpływu hiponatremii na ośrodkowy układ nerwowy koncentrowały się wokół zagadnień związanych z obrzękiem mózgu oraz ze skutkami leczenia hiponatremii. Obrzęk osmotyczny komórek, skutkujący objawami neurologicznymi, jest pierwszą odpowiedzią na obniżenie stężenia jonów Na^+ w płynach ustrojowych. Z kolei leczenie hiponatremii za pomocą roztworów hipertonicznych może prowadzić do powikłań w postaci demielinizacji struktur mostu. Pomimo tego, że układ naczyniowy odgrywa istotną rolę w homeostazie mózgu, wpływ hiponatremii na mechanizmy regulacji napięcia naczyń krwionośnych mózgu nie był dotychczas systematycznie badany. W piśmiennictwie znaleźć można liczne prace

doświadczalne dotyczące wpływu usunięcia jonów sodu lub drastycznego zmniejszenia ich stężenia na zachowanie naczyń krwionośnych lub izolowanych komórek mięśni gładkich. Wyników tych badań nie można jednak interpretować w aspekcie klinicznym. Pacjenci, u których występuje obniżenie stężenia jonów sodu w osoczu poniżej 100 mM są w bardzo ciężkim stanie i często nie przeżywają tak niskich poziomów natremii.

Celem mojej pracy było zbadanie czy i w jakim stopniu obniżenie stężenia jonów sodu do poziomu notowanego w oznaczeniach elektrolitów u pacjentów wywiera wpływ na podstawowe mechanizmy regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych mózgu szczura. Ponadto, chciałam odpowiedzieć na wynikające z obserwacji klinicznych pytanie czy w odpowiedzi naczyń krwionośnych mózgu na hiponatremię odgrywa rolę czas jej trwania. Poznanie tych zaburzeń być może mogłoby przyczynić się do zoptymalizowania leczenia pacjentów, u których w przebiegu choroby rozwija się hiponatremia.

Badania zostały przeprowadzone na 211 izolowanych tętnicach środkowych mózgu (MCA, ang. *middle cerebral artery*) dorosłych szczurów stada Wistar (waga 260-310g, n=140), samców. Tętnice były umieszczane w komorze arteriografu w buforze o odpowiednim składzie zapewniającym stałość pH na poziomie 7,4 i perfundowane pod stałym ciśnieniem hydrostatycznym wynoszącym 80 mmHg. Temperatura buforu zewnątrz- i wewnątrznaczyniowego utrzymywana była termostatycznie na poziomie 37°C. Obraz MCA rejestrowałam za pomocą toru wizyjnego złożonego z kamery i monitora. Parametrem mierzonym była średnica wewnętrzna naczyń. Skład buforów, zarówno zewnątrz- jak i wewnątrznaczyniowego był zmieniany odpowiednio, w zależności od potrzeb przeprowadzanych badań. W normonatremii stężenie jonów Na⁺ wynosiło 144 mM.

Badania w hiponatremii prowadzone były w modelu hiponatremii krótkotrwałej (ostrej) lub przewlekłej. Hiponatremia krótkotrwała była wywoływana *in vitro* poprzez obniżenie stężenia jonów sodu ze 144 mM do 120 mM w płynie wewnątrz- i zewnątrznaczyniowym. Hiponatremia przewlekła była wywoływana *in vivo* przez 3,5 dnia przy użyciu pompy osmotycznej (mini- osmotic pump model 2002, ALZET, U.S.A.) uwalniającej wazopresynę w tempie 2,4 µg/24h oraz płynnej karmy dla gryzoni (AIN -76; Bio-Serv, NJ, U.S.A.). Naczynia do badań pobierane były po tym czasie i umieszczane w buforze hiponatremicznym zawierającym jony Na⁺ o stężeniu zbliżonym do tego w jakim przebywały *in vivo*. Część badań została przeprowadzona na

komórkach mięśni gładkich izolowanych z tętnicy środkowej mózgu. Były to badania dotyczące wpływu krótkotrwałej hiponatremii na przewodność kanałów potasowych BK_{Ca}, prowadzone za pomocą techniki *patch-clamp* w konfiguracji *whole-cell*.

Przeprowadzone zostały IV serie badań reaktywności tętnicy środkowej mózgu:

Seria I obejmowała badanie odpowiedzi MCA na: zmiany ciśnienia perfuzyjnego, wzrost stężenia jonów H⁺ i K⁺ w przestrzeni zewnątrznaczyniowej, oraz na podanie acetylocholinyl, inhibitora syntazy tlenku azotu – L-NAME i donora tlenku azotu - SNAP w normonatremii oraz hiponatremii krótkotrwałej i przewlekłej.

W Serii II badana była odpowiedź MCA na podanie analogu cGMP - 8Br-cGMP w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii.

Seria III dotyczyła udziału kanałów potasowych BK_{Ca} w odpowiedzi mięśni gładkich MCA na tlenek azotu. Badałam w niej odpowiedź MCA na podanie: inhibitora – paksyliny lub aktywatora - NS1619 tych kanałów oraz donora NO na tle NS1619 w normonatremii i krótkotrwałej hiponatremii.

Seria IV miała na celu zbadanie mechanizmu leżącego u podłoża zaburzonej odpowiedzi MCA na kwasinę i obejmowała odpowiedź tej tętnicy na podanie aktywatora kanałów K_{ATP} – pinacidilu oraz na wzrost stężenia jonów H⁺ na tle pinacidilu, lub na tle aktywatora kanałów BK_{Ca} w normonatremii i w krótkotrwałej hiponatremii.

Ponadto za pomocą techniki *patch-clamp* badany był wpływ obniżenia stężenia jonów Na⁺ w płynie zewnątrzkomórkowym do 120 mM na przewodność kanału BK_{Ca} oraz zmiany jego przewodności w odpowiedzi na podanie aktywatora – NS1619 w normo- oraz w hiponatremii.

Uzyskałam następujące wyniki:

1. Zależność średnicy naczynia od ciśnienia perfuzyjnego (autoregulacja) jest zachowana zarówno w krótkotrwałej jak i w przewlekłej hiponatremii.
2. Krótkotrwała hiponatremia zaburza odpowiedź MCA na czynniki biorące udział w regulacji metabolicznej takie jak: zewnątrznaczyniowy wzrost stężenia jonów K⁺ i H⁺.
3. Krótkotrwała hiponatremia zaburza odpowiedź MCA na acetylocholinę oraz donor NO.
4. W przewlekłej hiponatremii obserwuje się zniesienie odpowiedzi MCA na zewnątrznaczyniowy wzrost stężenia jonów H⁺ przy zachowaniu odpowiedzi na zewnątrznaczyniowy wzrost stężenia jonów K⁺ oraz na acetylocholinę i donor NO.

5. W hiponatremii krótkotrwałej nie dochodzi do upośledzenia odpowiedzi MCA na cGMP.

6. Aktywator kanałów BK_{Ca} przywraca odpowiedź MCA na kwasinę oraz donor NO w krótkotrwałej hiponatremii.

Powyższe wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Hiponatremia selektywnie zaburza mechanizmy regulujące napięcie tętnicy środkowej mózgu szczura.

2. Krótkotrwała hiponatremia zaburza regulację tętnicy środkowej mózgu szczura w większym stopniu niż przewlekła hiponatremia.

3. Kanały potasowe BK_{Ca} biorą udział w utrzymaniu napięcia tętnicy środkowej mózgu szczura w warunkach krótkotrwałej hiponatremii podobnie jak w normonatremii.

4. Krótkotrwała hiponatremia prowadzi do selektywnych zaburzeń funkcji kanałów potasowych w mięśniach gładkich MCA.

5. Krótkotrwała hiponatremia nie wywiera wpływu na przewodność kanałów potasowych BK_{Ca} w mięśniach gładkich MCA ale zmniejsza ich wrażliwości na agonistów.

6. Konsekwencją zmniejszenia wrażliwości kanałów BK_{Ca} w mięśniach gładkich MCA na agonistów w hiponatremii krótkotrwałej jest brak odpowiedzi tej tętnicy na tlenek azotu i kwasinę.

9. a. ABSTRACT

Sodium ion is the main cation of the extracellular space playing an important role in maintenance of water-electrolyte, osmotic and acid-base balance. The physiological range of sodium concentration in the extracellular fluid is 136-145 mM. The decrease of plasma sodium concentration below 136 mM is named hyponatremia, whereas the increase above 145 mM is known as hypernatremia. Hyponatremia is a relatively common disorder of water-electrolyte balance observed in the medical practice. It is observed in 28% of hospitalized patients, 21% admitted to the emergency room and in about 7% of ambulatory patients. This disorder occurs in many diseases such as: hypothyroidism, liver cirrhosis, renal and heart failure, cancer and central nervous system disorders. In the risk group are also patients who are given antidepressants, antiepileptics, and loop diuretics. Occasionally, hyponatremia can also develop after using drugs routinely used in clinical practice such as: antihypertensives, antibiotics and proton pump inhibitors.

The disease is, however, most dangerous for neurosurgical patients, in whom hyponatremia is often diagnosed after: subarachnoid hemorrhage, head trauma, intracerebral hemorrhage and cephalomeningitis. This disorder can also occur in patients after operations surrounding the hypothalamus and the posterior pituitary, where is produced and released into the blood antidiuretic hormone.

Previous studies on the impact of hyponatremia on the central nervous system were mostly focused on issues related to cerebral edema, and the complications connected with the treatment of hyponatremia. The osmotic cell swelling, resulting in neurological symptoms, is the first response to the reduction in the sodium concentration in body fluids. In turn, hyponatremia treatment with hypertonic solutions can lead to brain complications in a form of a centropontine myelinolysis.

Although vascular system plays a crucial role in the homeostasis of the brain, the effect of hyponatremia on the regulatory mechanisms of cerebral blood vessels tone has not been systematically investigated so far. In the literature, numerous experimental studies can be found on the effect of the removal of sodium ions or of a drastic reduction in their concentration on blood vessels or isolated smooth muscle cells. These results can not be, however, interpreted in the context of clinical situations. Patients

who suffer from decreased concentration of sodium ions in the plasma below 100 mM are in critically bad condition and often do not survive such low levels of natremia.

The aim of my work was to examine whether and to what extent the mild reduction in the sodium concentration to the level observed in patients affects the basic mechanisms of the regulation of cerebral vascular tone. In addition, this study addresses the question arising from clinical observations whether the response of cerebral blood vessels to low sodium concentration depends on the duration of hyponatremia. Disclosure of the vascular effects of hyponatremia could possibly help to elaborate the optimal treatment of patients, who demonstrate brain symptoms connected with hyponatremia.

The experiments were performed on 211 middle cerebral arteries (MCA) of adult male Wistar rats (weight 260-310g, n=140). The arteries were placed in a arteriograph chamber in the buffer with suitable composition and stable pH of 7.4. They were perfused under hydrostatic pressure of 80 mm Hg. The temperature of the extra- and intravascular fluid was maintained at 37° C. The MCA images were recorded using microscope equipped with a camera coupled to a monitor. The measured parameter was the internal diameter of the vessel. Composition of extra- and intravascular buffers was changed during the experiments according to the needs of the protocol. In normonatremia Na⁺ concentration was 144 mM. Studies in hyponatremia were performed according to two paradigms - either in shortlasting (acute) or chronic hyponatremia. Acute hyponatremia was induced in the chamber by decreasing sodium concentration from 144 mM to 120 mM in the extra- and intravascular fluid. Chronic hyponatremia was induced in vivo through 3.5 days with a help of mini- osmotic pump (model 2002, ALZET, U.S.A) releasing vasopressin at a rate of 2.4 µg/24h, and liquid diet (AIN -76; Bio-Serv, NJ, U.S.A.). Isolated vessels were placed in a hyponatremic buffer containing Na⁺ ions in a concentration similar to that which they were exposed to during chronic hyponatremia *in vivo*. Some studies were performed on the smooth muscle cells isolated from the middle cerebral artery. These were studies on the effect of hyponatremia on the conductance of BK_{Ca} potassium channels, performed using patch-clamp technique in the whole-cell configuration.

Four series of studies of middle cerebral artery reactivity were performed: Series I covered response of MCA to: changes in perfusion pressure, increase in the H⁺ and K⁺ concentration in the extravascular space, and to the administration of

acetylcholine, an inhibitor of nitric oxide synthase - L-NAME and nitric oxide donor - SNAP in normonatremia as well as acute and chronic hyponatremia.

In series II, the response of MCA to an analogue of cGMP - 8Br-cGMP in normonatremia and in acute hyponatremia was examined. Series III was planned to study the participation of BK_{Ca} potassium channels in MCA response to nitric oxide. In this series, the MCA response to: an inhibitor - paxillin or an activator - NS1619 of these channels as well as the response to administration of NO donor on the background of NS1619 was studied in normonatremia and in acute hyponatremia.

Series IV was undertaken to investigate the mechanism underlying impaired MCA response to acidosis, and included studies of the response of the artery to an activator of K_{ATP} channel - pinacidil and to an increase in the concentration of H⁺ ions on the background of pinacidil, or of the BK_{Ca} channel activator in normonatremia and acute hyponatremia.

In addition, the impact of a reduction in the sodium concentration in the extracellular fluid to 120 mM on the conductance and sensitivity to specific agonist (NS1619) of BK_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells freshly isolated from the MCA was studied using patch-clamp technique.

Following results were obtained:

1. Dependence of vessel diameter on perfusion pressure (autoregulation) is preserved both in acute and chronic hyponatremia
2. Acute hyponatremia leads to the impairment of the response of the MCA to factors involved in the metabolic regulation such as extravascular increases in K⁺ and H⁺ ions concentration.
3. Acute hyponatremia impairs MCA response to acetylcholine and NO donor.
4. In chronic hyponatremia the response of MCA to extravascular increase in H⁺ ion concentration is lost but the responses to extravascular increase in K⁺ ion concentration, to acetylcholine and NO donor are preserved.
5. In acute hyponatremia no impairment of MCA response to cGMP is observed.
6. BK_{Ca} channel activator restores the response of the MCA to acidosis and NO donor in acute hyponatremia.

These results allow to formulate following conclusions:

1. Hyponatremia selectively disturbs regulatory mechanisms of the rat middle cerebral artery.

2. Acute hyponatremia impairs regulation of middle cerebral artery of rat more than the chronic one.
3. BK_{Ca} potassium channels participate in maintaining the tone of the rat middle cerebral artery in acute hyponatremia similarly as in normonatremia.
4. Acute hyponatremia leads to selective dysfunction of potassium channels in MCA smooth muscle.
5. Acute hyponatremia does not affect the BK_{Ca} potassium channel conductance, but reduces its sensitivity to agonists.
6. Lack of MCA response to nitric oxide and acidosis in acute hyponatremia is a consequence of reduced BK_{Ca} channels sensitivity to specific agonists.