

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. prof. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk



mgr Krzysztof Hubert Olszyński

**Modyfikacja czynności i struktury nerki
w zależności od wysokiej podaży sodu
– udział wybranych elementów
macierzy zewnątrzkomórkowej**

rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Elżbiety Kompanowskiej-Jeziarskiej
w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych

Warszawa 2013

*Quam desiderabilia omnia opera eius,
et tamquam scintilla spectatu!*

Eccli 42, 23

Bardzo serdecznie dziękuję pani prof. dr hab. n. med. Elżbiecie Kompanowskiej-Jezierskiej i panu prof. dr. hab. n. med. Januszowi Sadowskiemu za umożliwienie mi wykonania pracy doktorskiej w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, a także za nadzór merytoryczny nad moimi badaniami.

Zespołowi pod kierownictwem pani prof. dr hab. n. med. Janiny Rafałowskiej z Zakładu Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej dziękuję za przygotowanie preparatów histologicznych i pomoc w ich analizie. Podziękowania należą się również pani dr n. med. Hannie Kozłowskiej wraz z zespołem Środowiskowego Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych za wszelkie porady służące lepszemu wykorzystaniu możliwości oferowanych przez mikroskop konfokalny.

Szczególne podziękowania należą się dr n. med. Małgorzacie Beręsewicz z Pracowni Biologii Molekularnej za zaangażowanie w biochemiczną część niniejszego projektu, a także mgr Annie M Jabłońskiej z Zakładu Neurobiologii Naprawczej, której jestem wdzięczny za rady dotyczące przygotowania i późniejszej analizy preparatów mrożeniowych, a także pomoc w obsłudze mikroskopów. Lecz prócz tej pomocy merytorycznej jestem im szczerze wdzięczny za życzliwość i wsparcie zwłaszcza wtedy, gdy coś nie wychodziło.

Wszystkim pracownikom, a szczególnie doktorantom Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych dziękuję za trudną do przecenienia rewelacyjną atmosferę pracy, która pozostanie w mej pamięci na długo.

Spis treści

Skróty.....	3
Streszczenie	5
Abstract.....	7
1. Wstęp.....	11
1.1. Rola nerki w utrzymaniu homeostazy płynów ustrojowych i kształtowaniu tętniczego ciśnienia krwi	13
1.1.1. Nefron jako podstawowa jednostka funkcjonalna nerki.....	13
1.1.2. Zróżnicowanie strukturalne i funkcjonalne nerki szczura.....	14
1.2. Udział jonów Na ⁺ w kształtowaniu ciśnienia krwi (Ryc. 1).....	16
1.3. Przyczyny i zjawiska towarzyszące rozwojowi sodozależnego nadciśnienia tętniczego.....	20
1.4. Wybrane związki działające w macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach towarzyszących rozwojowi sodozależnego nadciśnienia tętniczego.....	21
1.4.1. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń typu A (VEGF-A; Ryc. 2)	21
1.4.2. Tlenek azotu (NO; Ryc. 3).....	28
1.4.3. Neutrofilowa lipokalina towarzysząca żelatynazie (NGAL; Ryc. 4)	35
1.4.4. Żelatynazy (MMP2, MMP9; Ryc. 5).....	39
1.5. nierozstrzygnięte pytania o sodozależne nadciśnienie tętnicze	45
2. Cel badań	48
3. Materiały i metody.....	49
3.1. Doświadczenia chroniczne i ostre	49
3.1.1. Doświadczenie chroniczne	49
3.1.2. Chirurgiczne przygotowanie do doświadczenia ostrego	50
3.1.3. Doświadczenie ostre	51
3.1.4. Pobranie materiału na skrawki histologiczne i na oznaczenia biochemiczne ..	52
3.2. Analiza próbek moczu i krwi.....	52
3.2.1. Pobranie próbek i oznaczanie parametrów wydalniczych.....	52
3.2.2. Wykonanie testów ELISA na próbkach moczu i osocza.....	52
3.3. Analiza histologiczna z użyciem skrawków parafinowych.....	53
3.3.1. Wykonanie barwień i znakowań na skrawkach parafinowych.....	53
3.3.2. Obliczenie indeksu uszkodzenia kłębuszków nerkowych.....	54
3.3.3. Obliczenie stopnia uszkodzenia rdzenia nerkowego	54
3.4. Analiza tkanek nerki z użyciem skrawków mrożeniowych	55
3.4.1. Wykonanie skrawków mrożeniowych.....	55
3.4.2. Zymografia żelatynowa <i>in situ</i>	55
3.5. Analiza statystyczna	56
4. Wyniki	57
4.1. Wpływ wysokiej podaży sodu w diecie na ciśnienie krwi tętniczej i parametry osocza u zwierząt czuwających (doświadczenia chroniczne)	57
4.2. Zmiany morfologiczne nerki powstające w następstwie działania diety wysokosodowej.....	59
4.2.1. Zmiany w obrębie kory nerki – obraz morfologiczny z oceną stopnia uszkodzenia.....	59
4.2.2. Indeks uszkodzenia kłębuszków.....	61
4.2.3. Zmiany w obrębie rdzenia nerki – obraz morfologiczny.....	61

4.2.4. Liczebność jąder i indeks jąder wyznakowanych przeciwko PCNA – rdzeń zewnętrzny i wewnętrzny	66
4.3. Doświadczenia ostre – parametry hemodynamiczne.....	69
4.4. Doświadczenie ostre – parametry wydalnicze.....	74
4.5. Analiza osocza i moczu z wykorzystaniem testów ELISA	74
4.6. Znakowanie przeciwko VEGF-A wykonane na skrawkach parafinowych.....	79
4.7. Zymografia żelatynowa <i>in situ</i>	81
4.7.1. Obserwacje jakościowe	81
4.7.2. Analiza ilościowa.....	87
4.8. Całościowe zestawienie zgromadzonych wyników.....	89
5. Dyskusja	92
5.1. Zmiany ciśnienia w zależności od podaży sodu w diecie i cech użytego zwierzęcia doświadczalnego.....	92
5.2. Zmiany stężenia sodu w osoczu i ich związek z sodowrażliwością.....	94
5.3. Wczesny wpływ wysokiej podaży sodu; przełomowe zmiany w dziewiątym/dziesiątym dniu.....	96
5.4. Zmiany masy ciała i proporcji masy nerek do masy ciała.....	97
5.5. Zmiany hemodynamiczne w nerkach	98
5.6. Zależne od wysokiej podaży sodu uszkodzenia nerek i możliwości regeneracyjne ich struktur.....	100
5.7. Hemodynamika rdzenia i jej związki ze zmianami morfologicznymi	103
5.8. Wydalanie nerkowe	105
5.9. Ogólnoustrojowy stres oksydacyjny a stan śródbłonna naczyń i nerek	108
5.10. NGAL jako wskaźnik stanu zapalnego i specyficznego uszkodzenia kanalików bliższych	111
5.11. Indeks uszkodzenia kłębuszków i jego pozytywna korelacja z wydalaniem czynnika VEGF-A	113
5.12. Lokalizacja aktywności żelatynolitycznej (MMP2 + MMP9) w nerkach.....	116
5.13. Lokalizacja VEGF-A w strukturach nerki i jego powiązania z aktywnością żelatynolityczną	120
6. Podsumowanie.....	125
7. Wnioski.....	127
8. Piśmiennictwo.....	128

Skróty

- 8-izo-PGF 2α – 8-izoprostaglandyna F 2α (8-izoprostan)
- ACE, ACE1 – enzym konwertujący angiotensyny (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*)
- Ang I – angiotensyna I
- Ang II – angiotensyna II
- AT1, AT1R – receptor typu 1 dla angiotensyny II (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor*)
- BH $_4$ – tetrahydrobiopteryna
- BSA – albumina pozyskana z surowicy bydłej (ang. *Bovine Serum Albumine*)
- C – kora nerki (ang. *Cortex*)
- CBF – korowy przepływ krwi w nerce mierzony powierzchniowo (ang. *Cortical Blood Flow*)
- ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- FITC – izotiocyjanian fluoresceiny
- GFR – filtracja kłębuszkowa (ang. *Glomerular Filtration Rate*)
- HE – barwienie hematoksylina-eozyna
- HO-1 – oksygenaza hemowa 1 (ang. *Heme Oxygenase*)
- HR – tętno (ang. *Heart Rate*)
- HS – dieta wysokosodowa (ang. *High Salt*)
- HS21 – dieta wysokosodowa o długości 21 dni
- HS10 – dieta wysokosodowa o długości 10 dni
- HS28 – dieta wysokosodowa o długości 28 dni
- IM – rdzeń wewnętrzny nerki (ang. *Inner Medulla*)
- IMBF – wewnątrzrdzeniowy przepływ krwi w nerce (ang. *Inner Medullary Blood Flow*)
- IUK – indeks uszkodzenia kłębuszków
- MBP – średnie ciśnienie krwi tętniczej (ang. *Mean Blood Pressure*)
- MMP – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Matrix Metalloproteinases*)
- NADPH – forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
- NGAL – neutrofilowa lipokalina towarzysząca żelatynazie (ang. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*)
- NO – tlenek azotu

- NOS, eNOS, iNOS, nNOS – syntaza tlenku azotu: endotelialna, indukowana, neuronalna (ang. *Nitric Oxide Synthase – endothelial, induced, neuronal*)
- OM – rdzeń zewnętrzny nerki (ang. *Outer Medulla*)
- OMBF – zewnątrzrdzeniowy przepływ krwi w nerce (ang. *Outer Medullary Blood Flow*)
- PBS – sól fizjologiczna zbuforowana fosforanami (ang. *Phosphate Buffered Saline*)
- PCNA – jądrowy antygen komórek proliferujących (ang. *Proliferative Cell Nuclear Antigen*)
- PFA – paraformaldehyd
- P_{Na} – stężenie jonów sodu w osoczu
- P_x – stężenie substancji x w osoczu (ang. *Plasma*)
- PU – jednostki perfuzji (ang. *Perfusion Unit*)
- RAAS – układ renina-angiotensyna-aldosteron
- RBF – całkowity przepływ krwi przez nerkę (ang. *Renal Blood Flow*)
- ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*)
- SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej (ang. *Systolic Blood Pressure*)
- SHR – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*)
- SOD1, SOD2 – dysmutaza nadtlenkowa 1, 2 (ang. *Superoxide Dismutase*)
- STD – dieta standardowa
- sVEGFR1 – rozpuszczalny receptor typu 1 dla czynnika VEGF (ang. *soluble VEGF Receptor*)
- TGF β – transformujący czynnik wzrostu typu β (ang. *Transforming Growth Factor β*)
- TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (ang. *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases*)
- $U_{Na}V$ – prędkość wydalania sodu
- $U_{osm}V$ – prędkość wydalania substancji osmotycznie czynnych
- U_x – stężenie substancji x w moczu (ang. *Urea*)
- VCAM – cząsteczka adhezji komórek naczyniowych (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule*)
- VEGF-A – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń typu A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*)
- VEGFR – receptor dla czynnika VEGF (ang. *VEGF Receptor*)

Streszczenie

Choroba nadciśnieniowa przyczynia się do rozwoju wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym udaru mózgu i zawału serca. Istotnym składnikiem ryzyka rozwoju nadciśnienia tętniczego jest wysokie spożycie sodu. Pomimo, że związek sodu z ciśnieniem krwi jest znany od dawna, wysoki współczynnik zapadalności i wysoka śmiertelność w grupie chorób krążeniowych zobowiązuje do dalszych poszukiwań podstawowych mechanizmów patologicznych. Bardzo ważną rolę w kształtowaniu ciśnienia krwi odgrywają nerki, szczególnie narażone na uszkodzenia przy wysokiej podaży sodu w diecie. Chociaż dane literaturowe przynoszą wiele informacji na temat czynności nerek oraz zmian ekspresji/ aktywności wielu cząsteczek w procesach sodozależnego kształtowania ciśnienia krwi, nadal odczuwa się brak badań łączących obserwacje czynnościowe z oznaczeniami konkretnych czynników biochemicznych. Wiele z nich (VEGF-A, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*; NO, tlenek azotu; NGAL, ang. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*; MMP2, MMP9, ang. *Matrix Metalloproteinase 2 i 9*) działa w przestrzeni pozakomórkowej wywierając silny wpływ na strukturę tkanki czy funkcje komórek.

Cel niniejszej pracy wynikał z potrzeby kompleksowego spojrzenia na udział nerki w kształtowaniu ciśnienia krwi w zależności od wysokiej podaży sodu w diecie u szczurów o różnych predyspozycjach do rozwoju nadciśnienia. Podjęto próbę znalezienia czynników biochemicznych w macierzy zewnątrzkomórkowej, których obecność mogłaby wiązać się ze zmianami czynnościowo-morfologicznymi w nerce.

Doświadczenia zostały przeprowadzone na szczurach stada Wistar (zwierzęta normotensyjne) i szczepu SHR (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*, zwierzęta z predyspozycjami do rozwoju nadciśnienia) karmionych paszą standardową (STD, 0,25% Na, w/w) lub wysokosodową (HS, 4% Na, w/w) przez 21 dni. W tym okresie zwierzętom regularnie mierzono ciśnienie skurczowe krwi (SBP) oraz oznaczano stężenie jonów Na⁺ w osoczu. W doświadczeniu ostrym, kończącym obserwacje chroniczne, uśpionym zwierzętom mierzono przepływy krwi przez nerkę (całkowity, RBF; korowy, CBF; zewnątrzrdzeniowy, OMBF; wewnątrzrdzeniowy, IMBF) oraz wydalanie nerkowe (diureza, wydalanie sodu i ogółu substancji osmotycznie czynnych). Pobrane nerki utrwalano w PFA i przeznaczano do barwienia (hematoksylina i eozyjna) oraz znakowania przeciwciałami (skierowanymi przeciwko PCNA, ang. *Proliferative Cell Nuclear*

Antigen, i VEGF-A) lub utrwalano przez mrożenie w izopentanie schłodzonym ciekłym azotem i przeznaczano do oznaczenia aktywności żelatynolitycznej metodą zymografii żelatynowej *in situ*. Pobrane osocze i moczu wykorzystano w analizie z użyciem testów ELISA, oznaczając stężenia VEGF-A, NO, NGAL i 8-izo-PGF2 α (8-izoprostaglandyny F2 α). Uszkodzenie nerek oceniano poprzez oznaczenie indeksu uszkodzenia kłębuszków (kora) oraz zmian liczebności jąder wraz ze stopniem ich wyznakowania przeciwko PCNA (rdzeń).

Skurczowe ciśnienie krwi w odpowiedzi na dietę wysokosodową wzrastało zarówno u szczurów Wistar, jak i SHR, jednak tylko u szczurów Wistar zmianie tej towarzyszył wzrost stężenia jonów sodu w osoczu. Mechanizmy wydalania sodu i wody wydawały się działać prawidłowo, reagując na wysoką podaż sodu w diecie natężonym usuwaniem jonów sodowych w moczu. Wzrost ciśnienia krwi po 21 dniach diety był jednak wyższy u szczurów SHR, u których kumulacja sodu w osoczu nie zachodziła. Jednakże wzrost stężenia jonów sodu w osoczu nie jest jedyną możliwą drogą oddziaływania sodu na ciśnienie krwi; być może miała tu miejsce kumulacja pozaosoczowa jonów sodowych, np. w płynie międzykomórkowym. Z drugiej strony zmiany zawartości sodu nie musiały być jedyną przyczyną zmian ciśnienia krwi tętnicznej. U szczurów Wistar oraz u szczurów SHR, w odpowiedzi na dietę wysokosodową obserwowano spadek stosunku ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego, jednak dochodziło do tego w następstwie zmiany innej części składowej: u szczurów Wistar w wyniku wzrostu IMBF, u szczurów SHR w wyniku spadku OMBF. Zmianom hemodynamicznym u szczurów Wistar towarzyszyły zmiany w lokalizacji VEGF-A. O ile wyznakowanie w obrębie rdzenia zewnętrznego (OM) pozostawało stałe niezależnie od diety, ilość wyznakowanych struktur w rdzeniu wewnętrznym (IM) obniżała się w miarę trwania diety wysokosodowej. Dodatkowo obserwowano również zmniejszenie liczebności komórek w obydwu warstwach rdzenia; w grupie Wistar STD była wyraźna różnica w liczbie komórek między OM a IM, po diecie HS ubytek komórek w obydwu warstwach prowadził do zaniku tej różnicy. Pomimo ograniczenia immunoreaktywności VEGF-A w IM oraz spadku liczebności komórek w tej warstwie, przepływ przez rdzeń wewnętrzny (IMBF) wzrastał. Z kolei zmiany w przepływach rdzeniowych u szczurów SHR zachodziły równolegle ze zmianami liczebności komórek i aktywności żelatynolitycznej: w rdzeniu zewnętrznym obserwowano zarówno obniżenie przepływu krwi, jak i liczby komórek i aktywności żelatynolitycznej, podczas gdy wartości te

pozostawały na stałym poziomie w rdzeniu wewnętrznym. Być może niska immunoreaktywność VEGF-A w rdzeniu wewnętrznym jest czynnikiem przesądającym o skłonności do rozwoju nadciśnienia; charakteryzuje ona bowiem szczury spontanicznie nadciśnieniowe (SHR) w warunkach podstawowych, bez względu na dietę, a u szczurów Wistar pojawia się w odpowiedzi na wysoką podaż sodu, wraz ze zwiększeniem stężenia jonów sodowych w osoczu i podwyższeniem wartości ciśnienia tętniczego krwi. W osoczu szczurów Wistar, jak i SHR, obserwowano wzrost stężenia metabolitów NO w odpowiedzi na dietę wysokosodową, co sugeruje uruchomienie ogólnoustrojowych mechanizmów przeciwstawiających się wzrostowi ciśnienia krwi oraz rosnącemu stresowi oksydacyjnemu. W wydalaniu NGAL i metabolitów NO nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic, natomiast stężenie VEGF-A w moczu było dodatnio skorelowane ze stopniem uszkodzenia kłębuszków. Wyjściowa aktywność żelatynolityczna w rdzeniu u szczurów SHR była znacznie wyższa niż u szczurów Wistar; dodatkowo u jednych i u drugich szczurów pojawiała się w tym obszarze aktywność jądrowa, sugerująca udział MMP2 i/ lub MMP9 w transkrypcji genów.

Wydaje się więc, że kluczowe zmiany czynnościowe, jak i w lokalizacji/aktywności wybranych substancji w nerce szczurów z wysoką podażą sodu w diecie zachodzą w obszarze rdzenia, strukturze uznawanej za kluczową dla kontroli ciśnienia krwi. Silna korelacja pomiędzy wydalaniem VEGF-A a uszkodzeniem kłębuszków daje nadzieję na przyszłe zastosowanie w praktyce klinicznej tego oznaczenia jako wskaźnika stanu kłębuszków.

Abstract

Arterial hypertension contributes to the development of many diseases of the cardiovascular system, including stroke and myocardial infarction. An important risk factor for the onset and progression of hypertension is high sodium intake. Although the association of body sodium with blood pressure has been known for a long time, a high rate of morbidity and mortality in the group of cardiovascular diseases requires further research into the basic pathogenetic mechanisms. The kidneys have a crucial role in the maintenance and control of blood pressure, these organs are also particularly vulnerable to damage by high sodium intake. Although the relevant literature still brings a great amount of information on alterations of renal function and changes in the expression/

activity of numerous active factors which seem to be involved in the process of salt-dependent blood pressure elevation, the studies combining functional observations and determination of specific biochemical factors are relatively few in number. On the other hand, it is known that many of these factors (VEGF-A, Vascular Endothelial Growth Factor A; NO, nitric oxide; NGAL, Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin; MMP2, MMP9, Matrix Metalloproteinase 2 and 9) are active in the extracellular space and exert a strong influence on tissue structure and function.

The purpose of this study ensued from a need for a comprehensive inspection of the participation of the kidney in the development of salt-dependent blood pressure elevation in rats that were not or were predisposed to the development of hypertension. An attempt was made to determine which biochemical factors present in the extracellular matrix may be associated with the functional and morphological changes in the kidney.

Experiments were conducted in normotensive Wistar rats and SHR (Spontaneously Hypertensive Rats, animals genetically predisposed to develop hypertension), males, fed standard (STD, 0.25% Na, w/w) or high salt diet (HS, 4% Na, w/w) for 21 days. During this period, systolic blood pressure (SBP) and plasma concentration of Na⁺ ions were regularly measured. In the final acute experiment, total renal blood flow (RBF), cortical (CBF), outer medullary (OMBF), inner medullary (IMBF) blood flows, as well as renal excretion (diuresis, excretion of sodium and total osmotically active substances) were measured. In another group of intact animals, the kidneys were removed and fixed in PFA; slices were prepared for staining (hematoxylin and eosin) or for antibody labeling (antibodies against PCNA, *Proliferative Cell Nuclear Antigen*, and VEGF-A). Other kidneys were fixed in isopentane cooled with liquid nitrogen and were used for determination of gelatinolytic activity measured by *in situ* gelatin zymography. Plasma and urine samples were examined using ELISA test to determine VEGF-A, NO, NGAL and 8-iso-PGF2 α (8-isoprostaglandin F2 α) concentrations. Kidney damage was evaluated by glomerular damage index and changes in the number of medullary nuclei positive for PCNA.

Systolic blood pressure during exposure to high salt diet increased in both Wistar and SHR, but only in the former was this accompanied by increasing sodium ions concentration in the plasma. Mechanisms of sodium and water excretion seemed to operate correctly and adequately increased sodium excretion in response to high sodium intake. The increase in blood pressure after 21 days of diet, however, was greater in SHR

rats, in which the elevation of plasma sodium did not occur. However, the plasma sodium concentration increase is not the only possible way of sodium influence on blood pressure; the causal influence of sodium ions accumulated in the interstitial fluid could be also possible. On the other hand, sodium need not be the only factor in arterial blood pressure changes. In response to a high salt diet in both strains of rats a decline in the outer-to-inner medullary blood flow ratio was observed, however, in a given strain a change in a different component was responsible: in Wistar as a result of IMBF increase whereas in SHR as a result of an OMBF decrease. Haemodynamic changes in Wistar rats were accompanied by a local change in the expression of VEGF-A. While labeling of the outer medulla (OM) remained constant, irrespective of the diet, the number of labeled structures in inner medulla (IM) decreased. In addition, the reduction in the number of cells in both layers of the medulla were observed; in the Wistar STD rats a distinct difference in the number of cells between OM and IM was detected whereas HS diet caused cell loss in both layers, leading to the disappearance of the difference. Despite the limitations of VEGF-A immunoreactivity in the IM and the lowered number of the cells in this layer, the intramedullary blood flow (IMBF) increased unexpectedly. On the other hand, changes in the medullary blood flow in SHR occurred in parallel with those in the number of cells and gelatinolytic activity: in the outer medulla a decrease in OMBF, number of cells, and gelatinolytic activity was observed while these parameters remained unaltered in the inner medulla. Perhaps the low VEGF-A immunoreactivity within inner medulla (IM) is a factor determining the susceptibility to the hypertension; such feature characterizes spontaneously hypertensive rats (SHR) irrespective of the diet, but in contrast, in Wistar rats it occurs in response to high sodium intake, alongside with the increasing plasma sodium concentration and an of blood pressure. In the plasma of both strains of rats an increase in concentration of NO metabolites in response to high salt diet was observed, suggesting initiation of systemic protective mechanisms against an increase of blood pressure and oxidative stress. There were no significant differences in the excretion of NGAL and NO metabolites, whereas VEGF-A concentration in the urine was correlated with the degree of glomerular damage. The initial gelatinolytic activity in the medulla of SHR was significantly higher than in Wistar rats; in addition, the activity appeared in the nuclei, suggesting participation of MMP2 and/ or MMP9 in gene transcription.

The results suggest very strongly that in rats exposed to high salt diet both the key functional changes and increased activity of selected substances occur in the renal medulla, the region recognized as crucial for the control of blood pressure. A strong correlation between VEGF-A excretion and glomerular damage is a finding that promises future application of the former in clinical practice as an early indicator of glomerular condition.

1. Wstęp

Jednym z podstawowych warunków zachowania ogólnej homeostazy ustroju jest utrzymanie bilansu elektrolitów, między innymi jonów sodowych Na^+ , w płynach ustrojowych, zarówno w przestrzeni pozakomórkowej, jak i wewnątrz komórek. Wzrost zawartości Na^+ w płynach pozakomórkowych może prowadzić do wzrostu tętniczego ciśnienia krwi i może być przyczyną rozwoju sodozależnego nadciśnienia tętniczego. Podwyższenie ciśnienia krwi jest przejawem uruchomienia wielu krótko i długo działających procesów prowadzących do zachowania stałej objętości i składu płynów ustrojowych, a także skutkuje uruchomieniem mechanizmów zapewniających optymalne ukrwienie narządów. Z drugiej strony wydaje się, że wysokie stężenie sodu w płynach ustrojowych może prowadzić w sposób bezpośredni do zmian metabolicznych i morfologicznych poprzedzających rozwój nadciśnienia.

W odpowiedzi na wzrost ciśnienia krwi w pierwszej kolejności dochodzi do rozszerzenia naczyń i obniżenia całkowitego oporu naczyniowego na drodze neurogennej. Rozszerzenie naczyń włosowatych prowadzi do wzrostu filtracji osocza do przestrzeni pozanaczyniowej, powodując zmniejszenie objętości krwi krążącej kosztem zwiększenia objętości pozostałej części przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Następnie obniża się uwalnianie reniny w nerkach, co prowadzi do ograniczenia produkcji naczyniokurczącej angiotensyny II (Ang II), a w następstwie do zwiększenia filtracji kłębuszkowej (GFR, ang. *Glomerular Filtration Rate*) i zmniejszenia syntezy aldosteronu.

Jeżeli czynnik prowokujący wzrost ciśnienia krwi, np. wysokie stężenie sodu w płynach ustrojowych, działa w sposób przewlekły, to wymienione powyżej szybkie reakcje ustroju są niewystarczające do przywrócenia prawidłowych wartości ciśnienia krwi i, co ważniejsze, do utrzymania prawidłowego przepływu krwi w narządach. W najdalszej perspektywie zmiany neurogenne, hormonalne i parakryne prowadzić mogą do trwałej przebudowy struktur układu krążenia. Szczególnie istotne w patogenezie nadciśnienia tętniczego są zmiany w tętniczych naczyniach oporowych. Ze względu na obecność warstwy mięśniowej mogą one zmieniać swoje światło w dość znacznym zakresie, a przez to wpływać zarówno na przepływ krwi w różnych obszarach krążeniowych, jak i na ciśnienie krwi. To właśnie zmiany w strukturze i plastyczności naczyń oporowych związane z cyklicznie powracającym stresem psychicznym stały się podstawą teorii neurogenno-naczyniowej etiologii nadciśnienia tętniczego sformułowanej

przez Folkow [Folkow B *i wsp.*, 1958a; Folkow B *i wsp.*, 1958b]. Równoległe do niej funkcjonuje teoria identyfikująca przyczynę choroby nadciśnieniowej w dysfunkcji nerek, sformułowana przez Guytona [Guyton AC *i wsp.*, 1972]. Kluczowe znaczenie patogenetyczne przypisuje się tu zjawisku diurezy i natriurezy z nadciśnienia (ang. *pressure diuresis*, *pressure natriuresis*), czyli zwiększenia tempa wydalania wody i sodu w wyniku podwyższenia ciśnienia krwi. W ten sposób, kosztem podwyższenia ciśnienia krwi, zachowana zostaje homeostaza płynów ustrojowych. Obie teorie uzupełniają się nawzajem i stanowią obecnie podstawę zrozumienia procesów regulacji tętniczego ciśnienia krwi.

Zaburzenia wspomnianych wcześniej procesów utrzymujących optymalne ciśnienie krwi mogą prowadzić do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Choroba ta najczęściej występuje w postaci tzw. nadciśnienia pierwotnego (samoistnego), tzn. nieposiadającego żadnej uchwytnej przyczyny, która mogłaby zostać usunięta interwencją medyczną. Takie nadciśnienie może być wynikiem czynników genetycznych, środowiskowych lub kombinacją obydwu tych kategorii. W zdecydowanej mniejszości znajdują się przypadki uznane za tzw. nadciśnienie wtórne, a więc nadciśnienie tętnicze o znanej etiologii. Może być one spowodowane zaburzeniami neurologicznymi, hormonalnymi (zwłaszcza w przypadku zmian nowotworowych w obrębie gruczołów dokrewnych), a także wiązać się z trybem życia (reakcje stresowe, dieta z dużą zawartością soli), czy odmiennymi stanami fizjologicznymi (menopauza, ciąża). Jednakże w większości przypadków nadciśnienie wtórne jest związane z różnymi schorzeniami nerek: m. in. patologicznym zwężeniem tętnicy nerkowej, zaburzeniami wydzielania reniny, czy też ostrą bądź przewlekłą niewydolnością nerek, niekiedy towarzyszącą innym schorzeniom (cukrzyca, kamicy nerkowej). To właśnie nerki są narządem odpowiedzialnym za utrzymanie prawidłowego bilansu jonów i ich stężenia w osoczu w wąskich fizjologicznych granicach. Regulacja zawartości elektrolitów i wody przez ten narząd zapewnia stałą objętość płynów ustrojowych, szczególnie płynu pozakomórkowego i krwi obwodowej, co jest jednym z istotnych warunków prawidłowego ciśnienia tętniczego.

1.1. Rola nerki w utrzymaniu homeostazy płynów ustrojowych i kształtowaniu tętniczego ciśnienia krwi

1.1.1. Nefron jako podstawowa jednostka funkcjonalna nerki

Regulacja objętości płynów ustrojowych i krwi poprzez usuwanie z osocza nadmiaru jonów oraz wody jest wynikiem procesów zachodzących w podstawowej jednostce strukturalnej nerki – nefronie. Wyróżnić można w nim dwa podstawowe elementy strukturalno-funkcjonalne; pierwszy z nich to kłębuszek, w którym zachodzi proces filtracji osocza, a drugi to kanalik nefronu, gdzie w wyniku zachodzących procesów transportowych następuje zmiana składu przesącza kłębuszkowego – część substancji zostaje odzyskana, a związki zbędne dla organizmu, bądź występujące w nadmiarze, usuwane są w postaci moczu ostatecznego.

Strukturom nefronu nieodłącznie towarzyszą naczynia krwionośne. Tętniczka doprowadzająca kłębuszka rozdziela się na sieć naczyń włosowatych, które opuszczając kłębuszek łączą się w tętniczkę odprowadzającą. Krew nią płynąca jest silnie zagęszczona; jest to wynik oddania (filtracji) w obrębie kłębuszka znacznej części wody oraz substancji zdolnych do przekroczenia bariery błony filtracyjnej, co jest zależne od kształtu, ładunku i wielkości cząsteczek, przy jednoczesnym pozostaniu w osoczu krwi niemal wszystkich białek. Hipertoniczność takiej krwi jest istotna w procesie formowania moczu ostatecznego, bowiem tętniczka odprowadzająca ponownie rozdziela się na sieć drobnych naczyń oplatających kanaliki, stwarzając w ten sposób sprzyjające warunki do resorpcji wody oraz substancji, jakie są odzyskiwane z przesącza w zależności od potrzeb, tj. w ilościach pozwalających na utrzymanie równowagi wodno-elektrolitowej ustroju.

W części kanalikowej nefronu wyróżniamy kilka odcinków różniących się budową morfologiczną oraz rodzajem i intensywnością procesów transportowych: kanalik bliższy (proksymalny, I rzędu), pętlę nefronu i kanalik dalszy (dystalny, II rzędu). Klasyczny podział kanalika bliższego rozróżnia w nim część krętą i prostą, choć późniejsze badania biochemiczno-strukturalne pozwoliły na wyróżnienie w nim trzech rejonów: S1 (w całości kręty), S2 (na pograniczu krętego i prostego) i S3 (w całości prosty). Pętla nefronu składa się z kolei z dwóch ramion: zstępującego i wstępującego, składających się z odcinka grubego i cienkiego. Znajdujący się za nią kanalik dalszy uchodzi do kanalika zbiorczego wyprowadzającego mocz do miedniczki nerkowej.

W kanalikule bliższym zachodzi proces resorpcji (tzw. obowiązkowej) około 2/3 przesącza; takie zmniejszenie objętości pozwala na wybiórcze odzyskiwanie (resorpcję fakultatywną) poszczególnych składników przesącza w dalszych odcinkach kanalika, głównie w grubym ramieniu wstępującym pętli nefronu. Intensywność procesów aktywnego i biernego transportu, resorpcji obowiązkowej i dodatkowej (fakultatywnej), a także czynnego wydalania wielu substancji do światła kanalika sprawia, że różne jego odcinki mają różne zapotrzebowanie energetyczne. Największa liczba mitochondriów występuje w komórkach kanalika bliższego nefronu, a także w ramieniu wstępującym pętli nefronu: stanowią one 33% objętości komórek odcinka S1, 39% objętości komórek odcinka S2 i 22% objętości komórek odcinka S3, natomiast w rdzeniowym i korowym fragmencie grubego odcinka ramienia wstępującego pętli ich objętość sięga 30-44% objętości komórek [Pfaller W i Rittinger M, 1980]. Różnice w poziomie metabolizmu komórek kanalikowych przejawiają się również brakiem tlenowej i beztlenowej glikolizy w odcinku S1 kanalika bliższego (jego komórki pozyskują energię głównie z glutaminy i mleczanu) [Klein KL *i wsp.*, 1981; Uchida S i Endou H, 1988], co usuwa ważny mechanizm ochrony komórkowego ATP i przeżywalności komórek kanalików podczas uszkodzenia ich struktury [Venkatachalam MA *i wsp.*, 1988]. W takich przypadkach przeżywalność komórek grubego odcinka ramienia wstępującego pętli i kanalika dalszego jest znacznie wyższa, bowiem dysponują one dobrze rozwiniętymi szlakami glikolitycznymi [Klein KL *i wsp.*, 1981; Bagnasco S *i wsp.*, 1985; Bastin J *i wsp.*, 1987; Uchida S i Endou H, 1988]. Glikoliza zachodzi w odcinku S3 kanalika bliższego, jednak w znacznie bardziej ograniczonym stopniu niż w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli i kanaliku dalszym; odpowiedzialna jest za utrzymanie stabilnego poziomu ATP w sytuacji zaburzeń pracy mitochondriów [Uchida S i Endou H, 1988; Ruegg CE i Mandel LJ, 1990]. W ten sposób kanaliki bliższe stają się najbardziej wrażliwym cna uszkodzenia odcinkami kanalika nefronu, a ich martwica bywa często pierwszym skutkiem niedokrwienia nerki czy działania substancji toksycznych.

1.1.2. Zróznicowanie strukturalne i funkcjonalne nerki szczura

W obrębie nerki szczura można wyróżnić trzy warstwy: zewnętrzną (powierzchniową) i stanowiącą większość masy nerki korę, w której znajdują się kłębuszki, a także kanaliki kręte: bliższe (proksymalne) i dalsze (dystalne) oraz dwie położone głębiej warstwy rdzeniowe: zewnętrzną i wewnętrzną. W rdzeniu zewnętrznym

zakręcają krótsze pętle nefronów, których kłębuszki położone są bliżej powierzchni nerki. Tutaj znajdują się również grube odcinki ramion wstępujących pętli nefronów – odcinki kluczowe w energochłonnych procesach resorpcji sodu stanowiących podstawę zagęszczania moczu. W rdzeniu wewnętrznym zakręcają cienkie odcinki długich pętli nefronów należących do nefronów przyrdzeniowych. Rdzeń wewnętrzny tworzy brodawkę nerkową otoczoną miedniczką nerkową zbierającą mocz, który dalej uchodzi do moczowodu. Taki plan budowy nerki odbiega od struktury anatomicznej nerki ludzkiej, gdzie rdzeń zewnętrzny tworzą słupy rdzeniowe wpuszczone w struktury kory, a rdzeń wewnętrzny tworzy nie jedną, a kilka brodawek nerkowych.

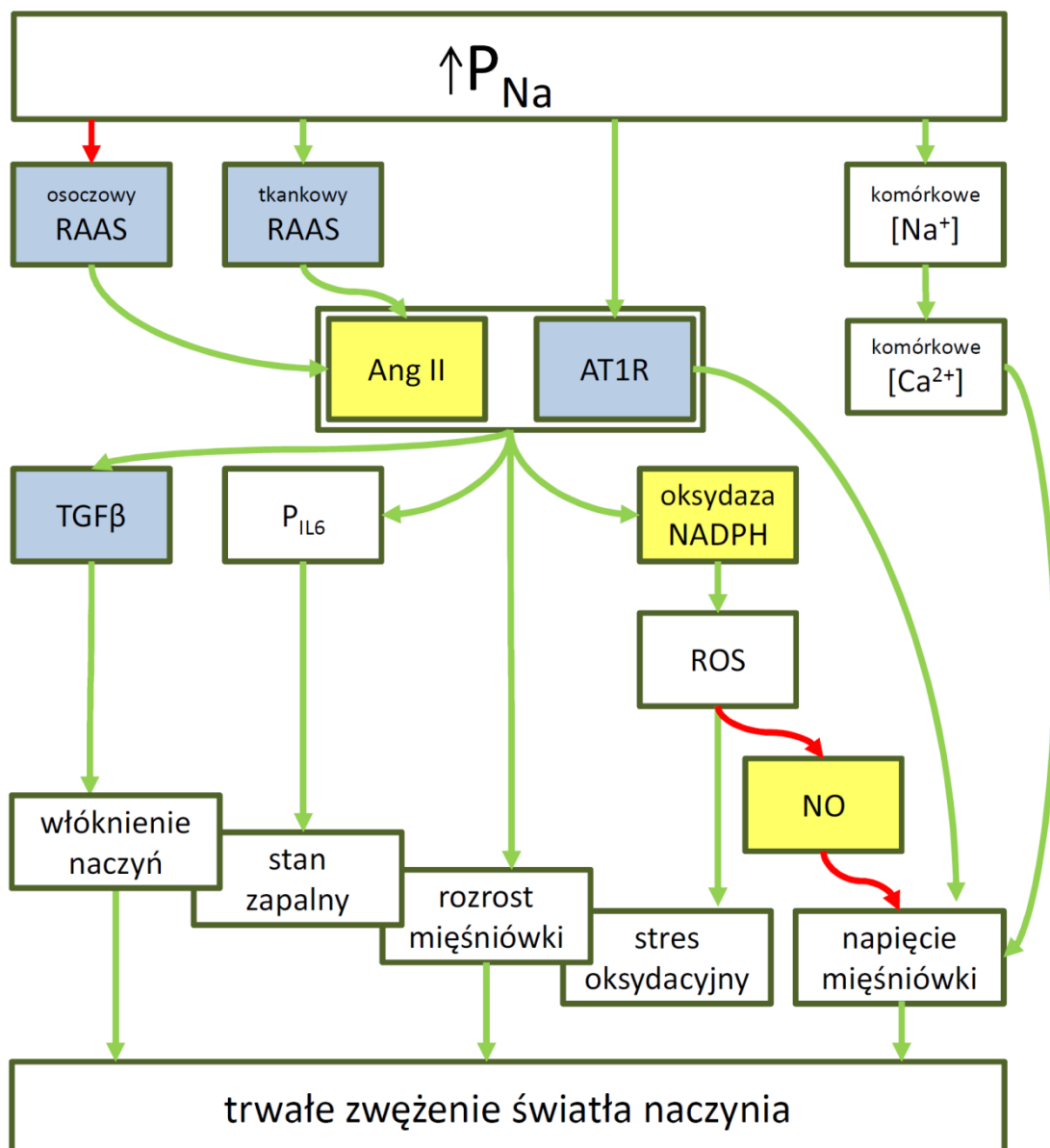
Otoczenie kanalikowych i naczyniowych struktur nerkowych stanowi śródmiąższ (interstitium), który aktywnie uczestniczy w procesach wymiany składników między moczem pierwotnym (kanalikowym) a osoczem. Architektura unaczynienia nerki jest bardzo złożona, a intensywność ukrwienia zależy od warstwy: najwyższe jest w korze, niższe w rdzeniu zewnętrznym i najniższe w rdzeniu wewnętrznym. Gradient ukrwienia przekłada się na gradient parcjalnego ciśnienia tlenu (PO_2) w nerce: w korze mieści się on w granicach 40-50 mmHg, w rdzeniu zewnętrznym jest to 20-30 mmHg, podczas gdy w rdzeniu wewnętrznym zaledwie 10-15 mmHg [Brezis M *i wsp.*, 1994], co stwarza warunki swego rodzaju fizjologicznej hipoksji, do której wiele systemów wewnątrznerkowych jest świetnie zaadaptowana poprzez modulację hipoksyjnych ścieżek sygnałowych regulujących ekspresję erytropoetyny [Prchal JT i Pastore YD, 2004] lub enzymów oksydacyjnych [Zhan CD *i wsp.*, 2004]. Jednakże głębsze obszary nerki – rdzeń zewnętrzny, lecz szczególnie wewnętrzny – są obszarem wysoce wrażliwym na niedokrwienie, szczególnie w sytuacji nasilenia procesów transportowych. Badania przeprowadzone w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych IMDiK PAN pokazały, że w zależności od czasu spożywania przez szczury diety o wysokiej zawartości sodu (co prowadzi do nasilenia procesów transportu kanalikowego) następuje stopniowe obniżenie stosunku przepływów krwi przez dwie warstwy rdzenia (prawidłowo: przepływ przez rdzeń zewnętrzny, OMBF > przepływ przez rdzeń wewnętrzny, IMBF), aż do jego odwrócenia (OMBF < IMBF) [dane niepublikowane]. Interesujące więc byłoby ustalenie, czy obniżona perfuzja (ukrwienie) rdzenia zewnętrznego – obszaru, w którym przebiegają intensywne procesy transportu kanalikowego – ma swoje odzwierciedlenie w zmianach strukturalnych w tym obszarze. Interesujące byłoby również określenie czy i w jakim stopniu zmiany OMBF mogłyby

wpływać na wartości ciśnienia tętniczego krwi. Przy pozytywnym wyniku takich badań warto byłoby się zastanowić, czy takie zmiany zależą (a jeśli tak, to w jakim stopniu) od wybranych czynników odpowiedzialnych za przemodelowanie tkanki, a aktywnych w przestrzeni macierzy zewnątrzkomórkowej.

Znaczna częstość występowania schorzeń wynikłych z uszkodzeń struktur nerki pociąga za sobą konieczność poszukiwania wrażliwych i specyficznych wskaźników zmian patologicznych, wskazujących na rodzaj procesu oraz jego umiejscowienie w zróżnicowanych strukturach tego narządu. Stosowane dziś w klinice oznaczenie klirensu kreatyniny (miara tempa filtracji kłębuszkowej – GFR) oraz wydalania w moczu albuminy (normoalbuminuria w stanie fizjologicznym, mikro- i makroalbuminuria w stanach patologicznych) coraz częściej nie spełnia oczekiwań diagnostyków ze względu na niespecyficzność, małą wrażliwość oraz niemożność wykrycia wczesnych stadiów chorobowych. Dlatego też usilnie poszukuje się nowych substancji wskaźnikowych, występujących przede wszystkim w moczu (pozyskiwanym znacznie łatwiej niż próbki krwi czy tkanki z biopsji), które byłyby wysoce specyficzne dla danych struktur (kłębuszków, różnych odcinków kanalika) i dla procesów prowadzących do uszkodzenia narządu (niewydolność ostra lub chroniczna, niedokrwienność lub toksyczna itp.).

1.2. Udział jonów Na^+ w kształtowaniu ciśnienia krwi (Ryc. 1)

W warunkach fizjologicznych stężenie jonów sodu w płynach ustrojowych utrzymywane jest w ściśle określonych granicach (135-150 mM). Wzrost podaży sodu w diecie może prowadzić do zwiększenia jego stężenia w płynach pozakomórkowych, w tym w osoczu, co może wiązać się ze zwiększeniem objętości krwi. Wzrost objętości krwi może prowadzić do wzrostu ciśnienia tętniczego, co zgodnie z teorią Guytona [Guyton AC *i wsp.*, 1972] wyzwala nerkowy mechanizm diurezy (wydalania wody) i natriurezy (wydalania sodu) z nadciśnienia. Długotrwałe zwiększenie podaży sodu w diecie prowadzi w efekcie do nasilenia procesów transportu kanalikowego, a więc procesów wysoce energochłonnych. Obniżona w ten sposób dostępność tlenu w tkance (PO_2) może prowadzić do wielu zaburzeń metabolicznych, czego następstwem może być uszkodzenie struktury i upośledzenie funkcji kanalików.



Ryc. 1. Stężenie jonów sodu w osoczu a zmiany w śródbłonku i mięśniówce naczyń. Kolor strzałek wskazuje na rodzaj oddziaływania (zielone – pobudzanie, czerwone – hamowanie). Strzałki dochodzące do pól niebieskich oznaczają wpływ na transkrypcję, do pól żółtych – wpływ na aktywność. P_{Na} – stężenie jonów sodu w osoczu; Ang II – angiotensyna II; RAAS – układ renina-angiotensyna-aldosteron; AT1R – receptor 1 dla angiotensyny II; TGF β – transformujący czynnik wzrostu β ; P_{IL6} – stężenie interleukiny 6 w osoczu; ROS – reaktywne formy tlenu; NO – tlenek azotu.

Zwiększone stężenie jonów Na^+ prowadzi również do zmian czynnościowych i/ lub strukturalnych w naczyniach krwionośnych; postuluje się, że w śródbłonku naczyń rozwija się przewlekły stan zapalny o niskim natężeniu [Moriguchi Y *i wsp.*, 2011]. Bez wątplenia wysokie ciśnienie krwi jest również mechanicznym bodźcem zdolnym do bezpośredniego uszkodzenia naczyń, a w dalszej perspektywie do reorganizacji ich struktur ze zwłóknieniem i zeszywnieniem ścian. Wzrost stężenia jonów sodu w osoczu (P_{Na}) o 15 mM indukuje znaczne zmiany w tętnicach i podnosi ciśnienie krwi w ciągu kilku godzin [Friedman SM *i wsp.*, 1990]. Wzrost stężenia sodu w osoczu pociąga za sobą wzrost stężenia tego jonu wewnątrz komórek, w tym i komórek mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych. Zmiana ta generuje wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} , co wywołuje zwiększenie napięcia mięśniówki [Bevan JA, 1993].

Wzrostowi P_{Na} towarzyszy również zwiększona lub obniżona reaktywność naczyń na czynniki naczyniokurczące i naczyniorozszerzające. Jednym z kluczowych układów sterujących ustrojowym ciśnieniem krwi jest układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Produkowana przez nerki renina przekształca uwalniany z wątroby angiotensynogen (prekursor angiotensyn) w angiotensynę I (Ang I), głównie w krążeniu płucnym. Ang I może być przekształcona przez enzymy konwertujące angiotensynę (ACE, ACE1, ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*) w angiotensynę II (Ang II), najważniejszą ze wszystkich angiotensyn. Wzmacnia ona wydzielanie z kory nadnerczy aldosteronu, hormonu nasilającego resorpcję soli i wody w kanalikach nerkowych. Układ RAAS jest więc układem ogólnoustrojowym, którego kluczowe procesy przebiegają w osoczu krwi.

Reakcja naczyń na angiotensynę II (Ang II), związek o silnym działaniu naczyniokurczącym, jest w dużej mierze zależna od podaży sodu w diecie: przy wzroście P_{Na} obserwuje się spadek ekspresji reniny, rośnie za to ekspresja zarówno enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), jak i receptorów AT1 (AT1R, ang. *Angiotensin II Type I Receptor*), przez które Ang II przekazuje sygnał naczyniokurczący [Nickenig G *i wsp.*, 1998; Samuel P *i wsp.*, 2012]. W ten sposób zwiększa się tempo powstawania Ang II z Ang I, jednakże produkcja Ang I jest ograniczona. Prowadzi to do wyciszenia ogólnoustrojowego (osoczonego) RAAS. Skutkiem takiej sytuacji jest wzmocnienie lokalnych tkankowych układów RAAS, m. in. w ścianach naczyń krwionośnych, bowiem wiele komórek wchodzących w skład ich ścian zdolnych jest do syntezy elementów RAAS. Sugeruje się, że takie lokalne tkankowe układy obecne w ścianach naczyń mogą

odgrywać większą rolę w biologii naczyń niż substancje krążące ogólnoustrojowo; zmiany w strukturze naczyń spowodowane wzmożoną aktywnością takich układów odpowiedzialne są bowiem za długotrwałe i trudne do odwrócenia zmiany lokalnego przepływu krwi. Również komórki struktur nerkowych innych niż aparat przykłębuszkowy, np. komórki kanalikowe, zdolne są do syntezy elementów układu RAAS [Navar LG *i wsp.*, 2011a; Navar LG *i wsp.*, 2011b]. Taki wewnątrzkomórkowy parakryny układ RAAS może zawierać dodatkowe elementy, ujawniające się głównie w stanach patologicznych. Wydaje się, że lokalne oddziaływania wewnątrzkomórkowych układów RAAS mogą mieć wpływ na krążenie ogólnoustrojowe.

Warto zwrócić uwagę, że angiotensyna II jest również znanym czynnikiem mitogennym dla komórek mięśniówki naczyń [Xu X *i wsp.*, 2007]. Przy zwiększeniu dostępności jonów sodowych obserwuje się również wzrost produkcji TGF β (transformujący czynnik wzrostu β) – cytokiny sprzyjającej kumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej [Gu JW *i wsp.*, 2000] – której uwalnianie z nieaktywnych kompleksów może być zależne od Ang II [Gibbons *i wsp.*, 1992]. Zwiększenie stężenia Ang II prowadzi także do zwiększenia produkcji wolnych rodników tlenowych, które neutralizowane są przez tlenek azotu (NO), znaną substancję naczyniorozszerzającą [Zhou MS *i wsp.*, 2003]. Dodatkowo enzym konwertujący angiotensyny, którego ekspresję nasila wysokie spożycie sodu, zdolny jest do przekształcania naczyniorozszerzającej bradykininy w nieaktywną pochodną [Carey RM i Siragy HM, 2003]. W ten sposób dochodzi do osłabienia sygnału do rozszerzenia naczyń.

Zwiększenie stężenia jonów Na⁺ w osoczu owocuje więc wieloaspektowymi zmianami w plastyczności naczyń. Z jednej strony sód przez bezpośrednie powiązania z wewnątrzkomórkowym stężeniem jonów wapnia wywołuje skurcz mięśniówki naczyń; reakcja ta jest pogłębiona przez zwiększenie dostępności biologicznej Ang II oraz AT1R. Z drugiej strony zwiększenie ekspresji ACE prowadzi do zmniejszenia dostępności naczyniorozszerzających NO i bradykininy. Przejściowy skurcz naczyń może zostać utrwalony przez TGF β , który sprzyjając kumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej może trwale ograniczyć światło naczynia. Zmiany w naczyniach nie są jedynymi, jakie wystąpić mogą w następstwie zwiększenia spożycia soli, pokazują jednak jak wiele procesów zaangażowanych jest w rozwój sodozależnego nadciśnienia tętniczego.

1.3. Przyczyny i zjawiska towarzyszące rozwojowi sodozależnego nadciśnienia tętniczego

Wysokie spożycie sodu może prowadzić do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej u niektórych osób i zwierząt, a także do nasilenia transportu kanalikowego, zjawiska wiążącego się z wieloma wysokoenergetycznymi procesami zwiększającymi zapotrzebowanie tkanki na tlen. Należy zwrócić uwagę, że różne procesy nastawione na usuwanie z ustroju nadmiaru sodu pozostają w ścisłym związku ze sobą, a także mogą również indukować dodatkowe zjawiska i procesy, takie jak:

a. pojawienie się lokalnych stanów hipoksyjnych [Laakso J *i wsp.*, 1998; Escobales N i Crespo MJ, 2005],

b. przebudowę struktur morfologicznych, związaną z przerostem (hipertrofią) i/ lub rozplemem (hiperplazją) komórek, czy też kumulacją włókien macierzy zewnątrzkomórkowej [Simon G *i wsp.*, 1998; Flamant M. *i wsp.*, 2007],

c. rozwinięcie lokalnych stanów zapalnych o niskim natężeniu, w tym i chronicznego stanu zapalnego śródbłonna [Rosón M *i wsp.*, 2006].

Procesy te mogą powodować zmiany w obrazie morfologicznym tkanki, a ich rozwojowi towarzyszą zmiany poziomu ekspresji, lokalizacji i aktywności wielu związków, zaangażowanych w:

- **przeciwdziałanie hipoksji** (VEGF-A – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń typu A; NF κ B – czynnik jądrowy κ B; HIF-1 – czynnik indukowany hipoksją 1; MMP1, 2, 9 – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 1, 2, 9; TGF α , TGF β – transformujący czynnik wzrostu α , β ; FABP1 – białko wiążące kwasy tłuszczowe 1; NOS – syntazy tlenku azotu) [Dor Y *i wsp.*, 2001; Yamamoto T *i wsp.*, 2007],
- **rozwój stanu zapalnego** (MMP9, TIMP1 – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej 1; TNF α – czynnik nekrozy nowotworów α ; VCAM – cząsteczka adhezji komórek naczyniowych; PGE₂ – prostaglandyna E₂; NOS), [Gad MZ i Khattab M, 2000; Manicone AM i McGuire JK, 2008],
- **przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej** (MMP, lamininy, integryny, czynniki wzrostu) [Flamant M *i wsp.*, 2007].

Powyższa lista nie wyczerpuje wszystkich czynników, jakie mogą składać się na biochemiczny obraz zmian zachodzących w strukturach naczyń krwionośnych, struktur nefronu oraz śródmiąszu nerki w trakcie rozwoju nadciśnienia sodozależnego, jednak warto zauważyć, że niektóre z nich są specyficzne dla określonych zjawisk i procesów patologicznych (np. VEGF-A dla hipoksji i związanej z nią angiogenezy). Warto byłoby więc zbadać je pod kątem użyteczności jako nowych wskaźników zmian zachodzących w nerce w sytuacji rozwoju tego typu nadciśnienia. Z drugiej strony, inne związki (np. MMP9) wydają się brać udział we wszystkich wymienionych procesach, dlatego też analiza zmian ich stężeń/ aktywności może zbliżyć nas do ustalenia, które z czynników zaangażowanych w procesy toczące się w nerce w następstwie długotrwałej zwiększonej podaży sodu mają największe znaczenie. Jeszcze inną kwestią jest do dziś nieustalona kolejność obserwowanych zdarzeń, a szczególnie – które z wymienionych procesów są przyczyną, a które skutkiem rozwijającej się choroby nadciśnieniowej.

1.4. Wybrane związki działające w macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach towarzyszących rozwojowi sodozależnego nadciśnienia tętniczego

Wśród wymienionych wyżej związków pokazną grupę stanowią cząsteczki działające w macierzy zewnątrzkomórkowej. Na podstawie ich funkcji podzielić je można na grupy: cząsteczki sygnałowe (VEGF-A, NO), cząsteczki transportowe (NGAL) oraz białka enzymatyczne (MMP2, MMP9).

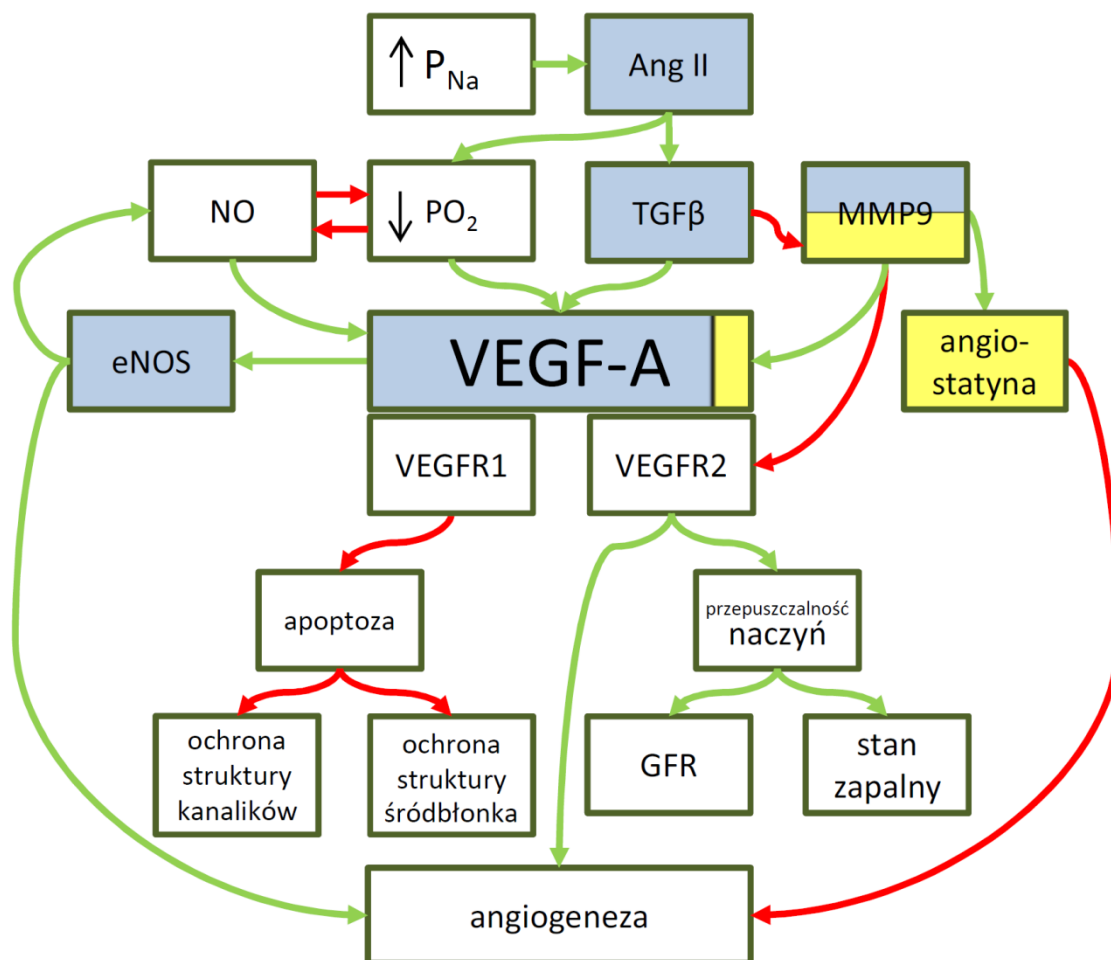
1.4.1. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń typu A (VEGF-A; Ryc. 2)

Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) to rodzina białek sterujących rozwojem naczyń krwionośnych i limfatycznych. W jej obrębie wyróżniono siedem podtypów, sześć nazywanych kolejnymi literami alfabetu, od VEGF-A do VEGF-F oraz Pl-VEGF (VEGF łożyskowy). Każdy z nich wykazuje specyficzne działanie, najlepiej poznane dla VEGF-A (głównego czynnika proangiogenego [Carmeliet P *i wsp.*, 1996]) i VEGF-C (głównego czynnika prolimfangiogenego [Cao R *i wsp.*, 2012]). Ze wszystkich członków rodziny największą ekspresją, a co za tym idzie także najpowszechniejszym występowaniem wyróżnia się VEGF-A. U człowieka występuje on w sześciu izoformach, będących wynikiem alternatywnego składania genu (splicing),

a ich numeracja wywodzi się od liczby budujących je aminokwasów. Najlepiej poznane, a zarazem najbardziej proangiogenne są izoformy VEGF₁₂₁ i VEGF₁₆₅, z czego najwięcej danych literaturowych dotyczy tej drugiej. VEGF₁₆₅, najpowszechniej występująca izoforma ze wszystkich wariantów VEGF-A, w większości związany jest ze strukturami macierzy zewnątrzkomórkowej lub powierzchnią komórki i w razie potrzeby uwalniany jest za pośrednictwem MMP9 [Raffetto JD i Khalil RA, 2008].

Warto podkreślić, że z uwagi na fakt, iż zdecydowana większość badań dotyczy roli VEGF-A, natomiast badania dotyczące pozostałych czynników wzrostu śródbłonna naczyń są nieliczne, a także w związku z przeważającą ekspresją izoformy VEGF-A nad pozostałymi, bardzo często w literaturze określa się go po prostu jako VEGF. Może to powodować pewne problemy w interpretacji wyników takich prac, jednak jeśli ich tematem jest angiogeneza śmiało można przyjąć, że pod używanym w nich terminem VEGF kryje się VEGF-A. By uniknąć tych wątpliwości, w niniejszej pracy uproszczenie takie nie będzie stosowane.

Receptory dla VEGF. Białka z rodziny VEGF oddziałują z trzema klasami receptorów błonowych – VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk2) i VEGFR3 (Flt 4) – występujących jako monomery, które po związaniu ligandu przechodzą dimeryzację (czasem tworząc heterodimery VEGFR2-VEGFR3 [Dixelius *i wsp.*, 2003]) i pozwalają na przekazanie sygnału do wnętrza komórki [Schlessinger J, 2000]. VEGF-A zdolny jest do wiązania dwóch pierwszych klas receptorów [Wiessman C *i wsp.*, 1997; Fuh G *i wsp.*, 1998], z czego powinowactwo do VEGFR1 jest o jeden rząd wielkości wyższe niż do VEGFR2. Pomimo wysokiego powinowactwa do VEGFR1 fosforylacja tego receptora jest słaba, a co za tym idzie nie generuje on silnego sygnału. Wydaje się, że służy on głównie do negatywnej kontroli dostępności VEGF-A, choć może generować sygnał antyapoptotyczny i proangiogeny [Waltenberger J *i wsp.*, 1994]. Dodatkowo receptor ten może występować w formie rozpuszczalnej (sVEGFR1, ang. *soluble VEGF Receptor 1*) [Kendall RL i Thomas KA, 1993] i w ten sposób działać wyłącznie jako inhibitor VEGF-A, sterujący jego dostępnością [Ambati BK *i wsp.*, 2006]. Związanie VEGF-A z VEGFR2 skutkuje natomiast znacznie powolniejszą dimeryzacją niż w przypadku oddziaływań z VEGFR1, jednakże znacznie silniejszym pobudzeniem receptorowej kinazy tyrozynowej, a przez to dłuższym pobudzeniem komórki [Waltenberger J *i wsp.*, 1994]. Prawdopodobnie właśnie tą drogą odbywa się przekaźnictwo sygnału



Ryc. 2. Udział sygnału przekazywanego przez VEGF-A za pośrednictwem jego receptorów (VEGFR1 i VEGFR2) w procesach wywołanych wysokim spożyciem sodu i/ lub sodozależnym wzrostem ciśnienia krwi. Kolor strzałek wskazuje na rodzaj oddziaływania (zielone – pobudzanie, czerwone – hamowanie). Strzałki dochodzące do pól niebieskich oznaczają wpływ na transkrypcję, do pól żółtych – wpływ na aktywność. P_{Na} – stężenie jonów sodu w osoczu; Ang II – angiotensyna II; NO – tlenek azotu; PO_2 – ciśnienie parcjalne tlenu; $TGF\beta$ – transformujący czynnik wzrostu β ; MMP9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9; eNOS – endotelialna syntaza tlenu azotu; VEGF-A – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń A; VEGFR1, VEGFR2 – receptor 1 i 2 dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyń; GFR – filtracja kłębuszkowa.

proangiogenego. Receptor VEGFR3 występuje głównie w naczyniach limfatycznych i związany jest z kształtowaniem pierwotnej sieci naczyń w embriogenezie oraz limfangiogenezą [Kaipainen A *i wsp.*, 1995]. Dodatkowymi receptorami dla VEGF są neuropiliny (NRP1 i NRP2), z których pierwsze występują głównie w tętnicach, a drugie w żyłach i naczyniach limfatycznych [Roskoski R Jr, 2007; Pellet-Many C *i wsp.*, 2008]. Choć wykazano, że ich obecność w embrionalnej angiogenezie jest konieczna, ich rola jest niejasna; prawdopodobnie NRP1 jako koreceptor prezentuje VEGF-A dla VEGFR2 [Soker S *i wsp.*, 1996]. Ponieważ zasadniczą różnicą między VEGF₁₂₁ a VEGF₁₆₅ jest brak u tego pierwszego rejonu specyficznego dla oddziaływań z neuropilinami, prawdopodobnie właśnie to jest przyczyną znacznie większego potencjału mitogennego VEGF₁₆₅ [Soker S *i wsp.*, 1996]. Badania hodowli komórek nabłonkowych kanalika bliższego oraz analiza materiału biopsyjnego uzyskanego od ludzi z ogniskowym segmentowym stwardnieniem kłębuszków nerkowych (FSGS, ang. *Focal Segmental Glomerulosclerosis*) wykazały wzrost ekspresji NRP2 w komórkach kanalików bliższych z jednoczesnym zahamowaniem ekspresji NRP1 (w warunkach fizjologicznych obecnej również w śródmiązgu). Nasilenie ekspresji NRP2 było ujemnie skorelowane z tempem filtracji kłębuszkowej (GFR); dodatkowo wykazano, że w zmiany ekspresji NRP1 i NRP2 zaangażowane są czynniki inicjujące włóknienie, w tym TGFβ1 [Schramek H *i wsp.*, 2009]. Rola neuropilin pozostaje jednak do tej pory bardzo słabo poznana.

Udział VEGF-A w formowaniu naczyń i kanalików. VEGF-A odgrywa znaczącą rolę zarówno w procesie kształtowania naczyń w wyniku angiogenezy, jak i w regulacji czynności zarówno naczyniowych, jak i kanalikowych struktur nerki. Obydwie funkcje wiążą się z jego możliwymi powiązaniem z rozwojem choroby nadciśnieniowej. Wiele badań wskazuje na to, że VEGF-A odgrywa bardzo istotną rolę w utrzymaniu funkcjonalności i struktury nerki. Taka nadrzędna rola jednej substancji w sterowaniu pracą narządu jest unikalna i niespotykana w innych narządach; w nerce VEGF-A odpowiedzialny jest za utrzymanie kluczowych struktur funkcjonalnych – nie tylko układu naczyniowego (co jest działaniem ogólnoustrojowym), ale także za utrzymanie właściwości nabłonka okienkowatego błony filtracyjnej kłębuszków i strukturalno-funkcjonalnych właściwości kanalików. VEGF-A jest wyrażany konstytutywnie w podocytach, w segmencie S3 kanalików bliższych (końcowa część odcinka prostego w przykorowym obszarze rdzenia zewnętrznego), a także w komórkach grubego odcinka

ramienia wstępującego pętli nefronu w zewnętrznej warstwie rdzenia zdrowej nerki [Kang DH *i wsp.*, 2001a; Kang DH *i wsp.*, 2001b].

Skutki ograniczenia biodostępności VEGF-A. Wiele interesujących wniosków na temat działania VEGF-A wyciągnięto z obserwacji prowadzonych na pacjentach dotkniętych chorobą nowotworową, którym w ramach terapii przeciwrakowej blokowano VEGF-A. Taka interwencja dawała pozytywne rezultaty w walce z nowotworem, jednak skutkowała efektami ubocznymi, takimi jak nadciśnienie i uszkodzenie nerek. Pacjentów tych charakteryzowały wysokie wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz białkomocz [Sandler AB *i wsp.*; 2004, Holden SN *i wsp.*, 2005]. Opisano również sytuacje, w których wyciszenie sygnału niesionego przez VEGF-A prowadziło w zdrowych narządach do zaburzeń strukturalnych na poziomie małych naczyń, a wręcz do zaniku sieci naczyniowej, co pociągało za sobą kolejne niekorzystne zmiany [Kamba T i McDonald DM, 2007]. W nerce, w której z uwagi na pełnioną funkcję sieć naczyń jest wyjątkowo gęsta, taki efekt spowodowany mniejszą dostępnością VEGF-A może być wyjątkowo silny i bardziej brzemienny w skutki. Być może dla ochrony nerek przed uszkodzeniem w niektórych stanach patologicznych korzystna byłaby terapia zwiększająca dostępność VEGF-A, co potwierdzają prace zespołu DH Kanga [Kang DH *i wsp.*, 2001a; Kang DH *i wsp.*, 2001b] oraz zespołu DP Basile'a [Basile DP *i wsp.*, 2008; Leonard EC *i wsp.*, 2008] wykazujące rolę VEGF-A w spowolnieniu procesu uszkodzenia nerek u gryzoni – związanego ze starzeniem się, zjawiskiem niedokrwienia, czy w modelu nerki szczątkowej (usunięcie 5/6 masy obu nerek). W modelu chronicznego zwężenia tętnicy nerkowej opisano postępujący zanik sieci niewielkich naczyń krwionośnych prowadzący do postępującego uszkodzenia nerek; zanik był związany z systematycznym obniżaniem zawartości VEGF-A w nerce. Podanie VEGF-A poprawiało strukturę oraz funkcję nerki; co więcej, jednorazowe podanie VEGF-A zwiększało jego ekspresję w kanalikach, a także prowadziło do zwiększenia ekspresji śródbłonkowej (endotelialnej) syntazy tlenu azotu (eNOS) [cykl prac zespołu AR Chada zebrany w pracy przeglądowej: Chade AR, 2012]. Syntaza ta bierze udział w pierwszych etapach formowania małych naczyń z udziałem VEGF-A [Lu Y *i wsp.*, 2011], a współdziałanie VEGF-A z NO chroni kanaliki i kłębuszki przed uszkodzeniem [Morita T *i wsp.*, 2011].

Działanie na rzecz zwiększenia dostępności VEGF-A (głównie poprzez podawanie egzogennej substancji) może wywoływać również dodatkowe efekty. Po pierwsze jego wysokie stężenia mogą działać naczyniorozszerzająco i prowadzić

do obniżenia ciśnienia krwi [Chade AR, 2012]. Z drugiej jednak strony VEGF-A, poprzez swoją właściwość zwiększania przepuszczalności naczyń (VEGF pierwotnie nazywany był VPF, ang. *Vascular Permeability Factor*), może działać niekorzystnie w obrębie nowopowstających naczyń. Wysoka przepuszczalność ogranicza ich podstawowe funkcje, a poprzez ułatwiony przeciek cytokin do przestrzeni pozanacyniowej może nasilać uszkodzenie nerek w schorzeniach przewlekłych [Chade AR, 2012]. Zwiększenie przepuszczalności naczyń nie pozostaje także bez wpływu na filtrację kłębuszkową; zwiększenie dostępności VEGF-A w mysim i szczurzym modelu nefropatii cukrzycowej prowadziło do zwiększenia filtracji i wystąpienia mikroalbuminurii [De Vriese AS *i wsp.*, 2001; Flyvbjerg A *i wsp.*, 2002].

Udział VEGF-A w utrzymaniu prawidłowych struktur nerki. Dwa główne sygnały regulujące ekspresję VEGF-A to hipoksja i sygnał zależny od TGF β [Chua CC *i wsp.*, 2000; Yamamoto T *i wsp.*, 2001]. Są to prawdopodobnie dwie całkowicie niezależne ścieżki (w stanach hipoksyjnych wzmożenie ekspresji VEGF-A następuje zanim pojawi się TGF β), których działanie może się sumować [Nakagawa T *i wsp.*, 2004]. VEGF-A jest pierwszym czynnikiem proangiogenym aktywowanym w wyniku hipoksji w mięśniówce naczyń, prawdopodobnie m.in. przez NO. Z drugiej strony VEGF-A przez VEGFR2 wzmacnia ekspresję eNOS [Facemire CS *i wsp.*, 2009]. Postuluje się, że oznaczanie zawartości VEGF-A w osoczu pacjentów chorych na cukrzycę lub z chroniczną niewydolnością serca może być dobrym wskaźnikiem rozwoju chronicznego stanu zapalnego o niskim natężeniu rozwijającego się w śródbłonku [Vila V *i wsp.*, 2008]. VEGF-A mógłby być traktowany jako wskaźnik stanu naczyń krwionośnych, ale także stanu funkcjonalnego struktur nerki: kłębuszków i kanalików. Opisano działanie VEGF-A jako czynnika zwiększającego przepuszczalność błony filtracyjnej [Fainaru O *i wsp.*, 2008; Veron D *i wsp.*, 2010]; wzrost wydalania tej substancji może być znacznie czulszym wskaźnikiem uszkodzenia kłębuszków niż albuminuria [Kim NH *i wsp.*, 2004; Kim NH *i wsp.*, 2005]. Stwierdzono także istotnie wyższe stężenie VEGF w osoczu osób posiadających tylko jedną nerkę (po nefrektomii lub przy całkowitym lub częściowym niewykształceniu jednej z nerek). Ten wzrost wiąże się z hipertrofią i rozrostem struktur nerki (w tym i kanalików, których formowanie jest zależne od VEGF-A), prowadzącymi do tzw. kompensacyjnego przerostu nerki [Yildiz B *i wsp.*, 2008]. Podobne zjawisko zwiększenia masy nerek obserwuje się u zwierząt z wysoką podażą sodu w diecie; co prawda posiadają one obydwie funkcjonalne nerki, jednak obciążone znacznie

intensywniejszą pracą. Użycie VEGF-A jako wskaźnika w diagnostyce laboratoryjnej wymaga jeszcze wielu badań, lecz dotychczasowe analizy są obiecujące.

Niezależnie od wpływu na naczynia krwionośne VEGF-A odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu struktur kanalikowych. Zarówno receptor VEGFR1, jak i VEGFR2 występują na komórkach śródbłonka naczyń kłębuszków i naczyń okołokanalikowych [Schrijvers BF *i wsp.*, 2004]. VEGF-A wydaje się być kluczowym czynnikiem wpływającym na ich strukturę i funkcje, może również wywierać autokryny lub parakryny wpływ na podocyty, komórki mezangium oraz nabłonek kanalików nerkowych [Villegas G *i wsp.*, 2005]. W badaniach z użyciem szczurzego modelu nadciśnienia pierwotnego (szczury spontanicznie nadciśnieniowe, SHR, ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*) opisano podwyższoną ekspresję VEGF-A w kłębuszkach w porównaniu z normotensyjnymi szczurami Sprague-Dawley, jednak w obydwu grupach ekspresja VEGFR2 była zbliżona. Neutralizowanie VEGF-A lub blokowanie jego receptora VEGFR2 w obydwu grupach owocowało utratą komórek śródbłonka oraz postępem choroby nadciśnieniowej, z czym wiązało się zwłóknienie kłębuszków, spadek filtracji kłębuszkowej (GFR) i dalszy wzrost ciśnienia tętniczego. Blokowanie VEGFR2 było mniej efektywne niż neutralizowanie VEGF-A, ale i wtedy obserwowano niewielką, lecz statystycznie istotną utratę komórek śródbłonka kłębuszków i rosnącą albuminurię. Te same badania wykazały u SHR delikatny rozrost mezangium oraz znacznie mniej gęstą sieć podocytów w porównaniu z normotensyjnymi szczurami Sprague-Dawley. Być może spowodowane było to obniżoną ekspresją nefryny, białka przezłonowego obecnego w szczelinach między podocytami [Advani A *i wsp.*, 2007]. Dlatego też genetycznie warunkowane nadciśnienie u SHR może być związane z jednej strony z ubytkiem komórek śródbłonka naczyń kłębuszka, a z drugiej z zaburzeniami syntezy składników selektywnej błony filtracyjnej. W innych badaniach wykazano natomiast spadek ekspresji VEGF-A w tkankach nerki szczurów Sprague-Dawley po długiej ekspozycji na wysoką zawartość sodu w diecie, natomiast nie obserwowano zmian jego stężenia w osoczu i w moczu. Wiązały się z tym jednak rozległe uszkodzenia kanalikowych struktur nerki [Gu JW *i wsp.*, 2008].

VEGF-A wykazuje rolę ochronną nerki wobec czynników uszkadzających związanych z układem RAAS. Zawartość białka VEGF-A w kłębuszkach wzrasta w odpowiedzi na aktywację układu RAAS; badania *in vivo* i *in vitro* wskazują, że ekspresja VEGF-A może być stymulowana zarówno przez Ang II, jak i mechaniczne

rozciąganie naczyń [Gruden G *i wsp.*, 1999; Kitayama H *i wsp.*, 2006]. Taka reakcja może być adaptacyjną odpowiedzią na rosnące ciśnienie krwi (VEGF-A pobudza ekspresję eNOS [Kang DH *i wsp.*, 2001b; Gu JW *i wsp.*, 2009]). Co więcej, spadek zawartości NO pobudza syntezę VEGF w mięśniówce naczyń [Kang DH *i wsp.*, 2002]. VEGF-A aktywowany nadciśnieniem lub wzmożonym działaniem układu RAAS jest więc czynnikiem bardzo ważnym w utrzymaniu funkcji i struktury śródbłonna. Do dziś jednak mechanizm powstawania uszkodzeń nerek, któremu przeciwstawia się aktywny VEGF-A, nie został w pełni poznany; po raz kolejny ilustruje to konieczność badań, które przybliżyłyby nas do określenia, które z procesów towarzyszących rozwojowi nadciśnienia tętniczego są wywołane wysokim ciśnieniem krwi, a które są jego przyczyną.

W rozwoju sodozależnego nadciśnienia tętniczego VEGF-A mógłby więc brać udział w:

a. formowaniu nowych naczyń, a przez to przeciwdziałaniu stanom niedotlenienia wynikającym z niewystarczających zasobów energetycznych komórek kanalików, a także ze zniszczenia struktur sąsiadujących z nimi naczyń, w procesach zależnych bezpośrednio od wysokiego stężenia sodu lub od wtórnego ich uszkodzenia przez mechaniczne rozciąganie zależne od podwyższenia ciśnienia krwi;

b. utrzymaniu właściwości struktur istniejących naczyń krwionośnych, narażonych na wzmożony bodziec mechaniczny, a także kanalików narażonych na uszkodzenie z powodu intensyfikacji procesów transportowych;

c. regulacji przepuszczalności błony filtracyjnej kłębuszków; wzrost stężenia VEGF-A w moczu można by wykorzystać jako wskaźnik wczesnego uszkodzenia kłębuszków, być może bardziej czuły niż mikroalbuminuria.

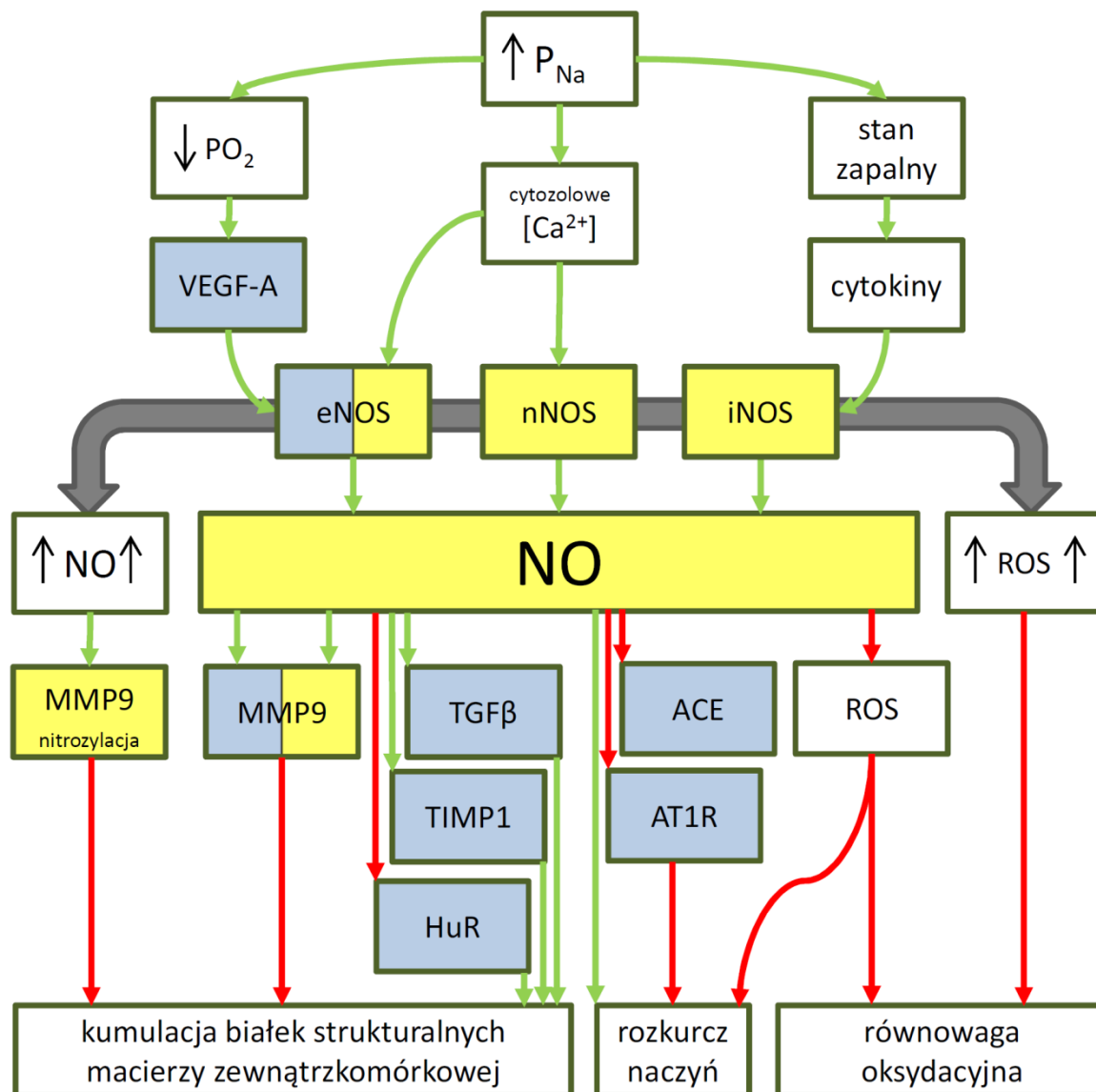
1.4.2. Tlenek azotu (NO; Ryc. 3)

Podwyższenie ciśnienia krwi jest bodźcem uruchamiającym w ustroju mechanizmy prowadzące do rozszerzenia naczyń. Jednym z głównych aktywnych czynników jest tu tlenek azotu (NO) – wolny, niestabilny i wysoce reaktywny rodnik, który dzięki swoim lipofilowym właściwościom i niewielkim rozmiarom przenika (dyfunduje) przez błony biologiczne bez udziału transporterów.

Tlenek azotu produkowany jest z L-argininy przy udziale kofaktora tetrahydrobiopteryny (BH₄) przez syntazy tlenu azotu (NOS), występujące w trzech

formach: śródbłonkowej/ endotelialnej (eNOS, NOS3), neuronalnej (nNOS, NOS1) i indukowanej (iNOS, NOS2). Wszystkie trzy obecne są w strukturach nerki: w łożysku naczyniowym (głównie eNOS) i w kanalikach (eNOS oraz konstytutywnie aktywna iNOS). Syntaza eNOS jest powszechnie obecna w śródbłonku naczyń włosowatych kłębuszka, tętniczki doprowadzającej i odprowadzającej, naczyń prostych rdzenia i całego układu tętniczego nerki; pojawia się także w kanaliku bliższym, grubym odcinku ramienia wstępującego pętli nefronu i w kanaliku zbiorczym [Ujii K *i wsp.*, 1994; Bachmann S *i wsp.*, 1995]. Syntaza iNOS występuje w różnych odcinkach kanalików nerkowych, szczególnie w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli nefronu [Morrissey JJ *i wsp.*, 1994]. Największe stężenie nNOS opisano w aparacie przykłębuszkowym – strukturze, w której współdziałanie komórek kanalika dalszego i tętniczki doprowadzającej tworzy jeden z elementów układu autoregulacji krążenia krwi w nerce. Neuronalna NOS pojawia się również w komórkach pętli nefronu oraz w kanalikach zbiorczych. Aktywność wszystkich izoform NOS jest najwyższa w obszarach rdzeniowych, przewyższając katalityczną aktywność NOS w korze dziesięciokrotnie [Moridani BA i Kline RL, 1996]. Aktywność eNOS i nNOS zależna jest od jonów wapnia, dlatego też syntezę NO aktywuje napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy, co wywołuje kalmodulinozależną fosforylację cząsteczek NOS [Lin S *i wsp.*, 2000; McMurry JL *i wsp.*, 2011]. W komórkach śródbłonka zwiększony napływ wapnia może być wywołany bodźcami mechanicznymi (stres ścinający, ang. *shear stress*) lub humoralnymi (acetylocholina, bradykinina), czy też wzrostem stężenia jonów sodowych w osoczu.

Produkcja NO w śródbłonku jako odpowiedź na zwiększenie stężenia Na^+ . Tlenek azotu działa lokalnie, a postępujący w wyniku dysfunkcji śródbłonka niedobór tego czynnika zwiększa ryzyko wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych oraz przyczynia się do rozwoju chronicznej choroby nerek [Martens CR i Edwards DG, 2011]. Pierwszą poznaną funkcją tlenu azotu było działanie naczyniorozszerzające (pierwotna nazwa NO to EDRF – ang. *Endothelium-Derived Relaxing Factor*); wiadomo, że NO zwiększa lokalny przepływ krwi przyczyniając się do zmniejszenia oporu naczyniowego i obniżenia ciśnienia krwi w ustroju. Jednakże zwiększenie stężenia jonów sodu w osoczu prowadzi do osłabienia uwalniania NO z komórek śródbłonka. Ta obserwacja pozwoliła sformułować hipotezę, że komórki śródbłonka spełniają funkcję naczyniowego sensora



Ryc. 3. Udział tlenu azotu w procesach prowadzących do rozwoju sodozależnego nadciśnienia tętniczego. Kolor strzałek wskazuje na rodzaj oddziaływania (zielone – pobudzanie, czerwone – hamowanie). Strzałki dochodzące do pól niebieskich oznaczają wpływ na transkrypcję, do pól żółtych – wpływ na aktywność. Szare grube strzałki wskazują procesy patologiczne, wynikające ze skrajnie zaburzonej równowagi w produkcji NO, tj. w konsekwencji podwyższonej (lewa strona) lub obniżonej (prawa strona) aktywności syntaz NO. P_{Na} – stężenie jonów sodu w osoczu; PO_2 – ciśnienie parcjale tlenu; VEGF-A – czynnik wzrostu komórek śródbłonna A; eNOS, nNOS, iNOS – endotelialna, neuronalna i indukowana syntaza tlenu azotu; NO – tlenek azotu; ROS – reaktywne formy tlenu; MMP9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9; TGF β – transformujący czynnik wzrostu β ; ACE – enzym konwertujący angiotensyny; TIMP1 – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej 1; AT1R – receptor 1 dla angiotensyny II; HuR – czynnik stabilizujący mRNA dla MMP9.

stężenia jonów sodowych [Oberleithner H *i wsp.*, 2010]. Wiadomo, że nie każdy osobnik, czy też pacjent, reaguje na wzrost zawartości sodu w pożywieniu wzrostem tętniczego ciśnienia krwi. Mówi się wtedy o sodooporności, w przeciwieństwie do sodowrażliwości, gdy ciśnienie wzrasta. Wydaje się, że sodowrażliwość zależy od podwyższenia stężenia jonów sodu w osoczu i tym samym od upośledzenia produkcji NO w odpowiedzi na wysoką podaż sodu w diecie [Cubeddu LX *i wsp.*, 2000]. Może się to przekładać na zaburzenia procesu natriurezy z nadciśnienia (prawidłowo uruchamianego przy niewielkim wzroście ciśnienia, lecz u osób sodowrażliwych wymagającego znacznie wyższego ciśnienia krwi), a w dłuższej perspektywie czasowej prowadzi do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Prawdopodobnie fizjologiczną reakcją śródbłonna na zwiększenie docierającego do naczynia ładunku sodu jest bądź zwiększenie podstawowego poziomu uwalniania NO lub zwiększenie wrażliwości naczyń na ten czynnik. Obydwie te reakcje mogą być wtórne do zwiększenia objętości osocza [Barba G *i wsp.*, 2000]. Dalsze badania nad sodowrażliwymi i sodoopornymi osobami z rozwiniętym nadciśnieniem tętniczym wykazały, że infuzja L-argininy, substratu do syntezy NO, obniżała średnie ciśnienie krwi bardziej u pacjentów sodowrażliwych niż sodoopornych, co popiera pogląd, że defekt produkcji NO może modyfikować wrażliwość ciśnienia krwi na ilość spożywanego sodu [Campese VM *i wsp.*, 1997]. Ponadto zauważono, że stężenie produktów metabolizmu NO (nitratów i nitrytów, NO₂/NO₃) w osoczu pacjentów sodowrażliwych z nadciśnieniem (na diecie normosodowej) było niższe niż u sodoopornych. Wartości te obniżały się u obydwu grup po zmianie diety na wysokosodową, a stężenie NO₂/NO₃ było ujemnie skorelowane ze zmianami ciśnienia krwi [Fujiwara N *i wsp.*, 2000]. Również wydalanie NO₂/NO₃ u pacjentów nadciśnieniowych na diecie wysokosodowej obniżało się znacznie wyraźniej u pacjentów sodowrażliwych niż u sodoopornych [Bragulat E *i wsp.*, 2001]. Jednak niezależnie od wielu badań wskazujących jasno na korelację między sodowrażliwością a uwalnianiem tlenu azotu postuluje się, że istnieją również inne mechanizmy, niezależne od śródbłonna, kształtujące wrażliwość na sód [Campese VM *i wsp.*, 1996; Higashi *i wsp.*, 2001]. Opinie są jednak zgodne co do tego, że dysfunkcja śródbłonna przyczynia się do rozwoju nadciśnienia sodozależnego i innych zaburzeń hemodynamicznych, prawdopodobnie poprzez bezpośrednie obniżenie aktywności eNOS, dostępności substratu [Kakoki M *i wsp.*, 2004] i biodostępności NO, jak i pośrednio

poprzez podwyższenie stężenia ADMA (asymetrycznej dimetyloargininy), endogennego inhibitora NO [Fujiwara N *i wsp.*, 2000].

NO jako czynnik ograniczający włóknienie tkanek i sygnał mitogeny. Jednym ze zjawisk często towarzyszących nadciśnieniu tętniczemu jest włóknienie tkanek. W przypadku nerek tyczy się to nie tylko naczyń krwionośnych, ale także kanalików i śródmiąższu. Włóknienie może być pośrednio związane z uwalnianiem czynników mitogennych – powstawanie nowych komórek wiąże się z koniecznością rearanżacji macierzy zewnątrzkomórkowej, co może wpływać na zachwianie procesów proteolizy i syntezy, a ostatecznie prowadzić do kumulacji białek strukturalnych. Tlenek azotu jawi się tutaj jako jeden z czynników mających najsilniejszy potencjał ochronny dla struktur naczyń. Niezależnie od swoich właściwości naczyniorozszerzających, zdolny jest do hamowania wzrostu komórek mięśniówki naczyń [Garg UC i Hassid A, 1989], a także hamowania syntezy włókien macierzy zewnątrzkomórkowej [Chatziantoniou C *i wsp.*, 1998]. Przewlekły niedobór NO skutkuje zwłóknieniem naczyń nerkowych [Baylis C *i wsp.*, 1992; Baylis C i Bloch J, 1996; Myers PR *i wsp.*, 1996]. Znaczna część funkcji ochronnych NO związana jest z jego antagonistycznym oddziaływaniem z Ang II [Millat LJ *i wsp.*, 1999]. Angiotensyna II poprzez receptory AT1 nasila ekspresję promującą zwłóknienie cytokiny TGFβ [Wolf G *i wsp.*, 1993; Boffa JJ *i wsp.*, 2003], podczas gdy NO – m. in. poprzez aktywator plazminogenu (PA) – może zwiększać aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), trawiących włókna [Kaikita K *i wsp.*, 2001; Kaikita K *i wsp.*, 2002]. Wiadomo, że Ang II aktywuje błonową oksydazę NADPH i zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), a NO zdolny jest do ich neutralizacji [Hayden MR *i wsp.*, 2005; Paravicini TM i Touyz RM, 2006]. Jednakże oddziaływania między angiotensyną II a tlenkiem azotu nie zawsze mają charakter antagonistyczny; Ang II może zwiększać produkcję NO [Deng X *i wsp.*, 1996], jednak NO może także hamować aktywność enzymu konwertującego (ACE), produkującego Ang II [Higashi Y 1995; Takemoto M 1997]. Wydaje się również, że NO odpowiada za hamowanie ekspresji AT1R [Millat LJ *i wsp.*, 1999; Yan C *i wsp.*, 2003]. Ten „pozytywny” efekt jest wynikiem działania NO syntetyzowanego przez eNOS, z drugiej jednakże strony wysoki poziom produkcji NO przez indukowaną cytokinami iNOS wydaje się być odpowiedzialny za zniszczenie naczyń oraz upośledzenie funkcji serca [Moncada S i Higgs A, 1993]. Subtelne i złożone relacje między tlenkiem azotu i układem RAAS widoczne są we wspomnianym wcześniej działaniu aparatu

przykłębuszkowego. Renina uwalniana jest do krwi z komórek ziarnistych znajdujących się w ścianie tętniczek doprowadzających. Tlenek azotu uwalniany przez eNOS w śródbłonku tychże tętniczek hamuje jej sekrecję [Sigmon DH *i wsp.*, 1992; He XR *i wsp.*, 1995]. Jednakże NO uwalniany przez nNOS w płamce gęstej kanalika dalszego stymuluje uwalnianie reniny [Beierwaltes WH, 1995].

Fizjologiczne stężenia NO działają głównie przez ścieżki sygnałowe zależne od cyklicznego guanylomono fosforanu (cGMP), wywołując rozkurcz mięśniówki [Vaandrager AB i de Jonge HR, 1996]. Patologicznie wysokie uwalnianie NO powoduje działanie niezależne od cGMP, opierające się na bezpośredniej nitrozylacji białek, co prowadzi do zmiany właściwości wielu kinaz (zmiany w ścieżkach sygnałowych) [Kröncke KD, 2001], rozpadu palców cynkowych (zmiany w transkrypcji) [Schindler H i Bogdan C, 2001] czy do nieenzymatycznej aktywacji enzymów (m. in. proMMP9) [Gu Z *i wsp.*, 2002]. W zależności od wyjściowej sytuacji fizjologicznej takie działania mogą wzmacniać lub hamować włóknienie. Z wymienionych zjawisk warto zwrócić uwagę na możliwość sterowania przez NO aktywnością metaloproteinaz, szczególnie żelatynaz (MMP2 i MMP9), bowiem może on wpływać na ich aktywność na wielu poziomach.

Zależności pomiędzy NO a MMP9. MMP9, szczególnie istotna w procesie zapalnym, w którym jest zaangażowana w rozszczelnianie naczyń krwionośnych, a przez to umożliwia infiltrację komórek układu odpornościowego do okolicznych tkanek, produkowana jest w komórkach mięśniówki ściany naczyń w odpowiedzi na cytokiny prozapalne. NO pochodzący z iNOS może hamować ekspresję MMP9 indukowanej cytokiną poprzez zmniejszenie stabilności jej transkryptu (obniżając dostępność czynnika HuR, stabilizującego mRNA dla MMP9) [Eberhardt *Wi wsp.*, 2002; Akool el-Si *wsp.*, 2003]. Podobne zjawisko opisano w wielu typach komórek, m. in. w komórkach śródbłonka [Phillips PG, Birnby LM, 2004], co sugeruje, że hamowanie ekspresji MMP9 nie jest zjawiskiem specyficznym dla danego typu komórek. W stanach zapalnych następuje stymulacja zarówno produkcji NO, jak i ROS, a obydwa typy rodników działają antagonistycznie na ekspresję MMP9, co ustalono w doświadczeniach *in vitro* na komórkach mezangium. W przeciwieństwie do NO, reaktywne formy tlenu wzmacniają ekspresję MMP9 indukowaną cytokinami. Ostateczny efekt zależy więc od tego, które z rodników (ROS czy NO) będą dominować, a zarazem ile NO zostanie wykorzystanego do neutralizacji ROS. Dodatkowo NO może obniżać aktywność MMP9 poprzez zwiększanie syntezy TIMP1, głównego inhibitora MMP9, przez mechanizm

wyzwalany za pośrednictwem TGF β [Akool el-Si *wsp.*, 2005]. W ten sposób, poprzez nasilenie ekspresji TGF β , tlenek azotu może działać również jako czynnik zwiększający kumulację włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest krytycznym elementem rozplemu komórek mięśniówki ścian naczyń [Schmidt A *i wsp.*, 2003]. Z drugiej strony w niektórych typach komórek NO stymuluje MMP9 poprzez bezpośrednią aktywację proMMP9 [Gu Z *i wsp.*, 2002], czy też wzmocnienie ekspresji genu *MMP9* [Marcet-Palacios M *i wsp.*, 2003]. Widać więc, że wpływ NO na aktywność MMP9 jest złożony i jest wypadkową procesów szybkich (aktywacja MMP9) i trwających powyżej kilku godzin (zmiana ekspresji genów). Przez to wpływ NO na macierz komórkową będzie dwojaki – z jednej strony może wspierać jej kumulację, a w innych przypadkach degradację, co może zależeć od źródła tlenu azotu (działania ochronne przeważają przy produkcji z udziałem eNOS, z kolei iNOS uznawana jest przez wielu za kluczowy czynnik stymulujący uszkodzenie), czy też od produkcji reaktywnych form tlenu.

Tlenek azotu w równowadze oksydacyjnej. Reaktywne formy tlenu generowane przez wysoką podaż sodu mogą prowadzić do stanu stresu oksydacyjnego. W konsekwencji dochodzi do obniżenia dostępnego tlenu azotu w wyniku zużycia jego cząsteczek na procesy zubożniania ROS. Ten aspekt działania NO jest u ludzi słabo poznany, jednakże wydaje się być ważnym elementem w patogenezie nadciśnienia tętniczego [Vanhoute PM *i wsp.*, 2005]. Ponadto większe zapotrzebowanie na NO w przypadku wysokiej podaży sodu w diecie prowadzi do niedoborów substratu dla syntazy NO. W takiej sytuacji może dojść do zjawiska niewłaściwego konformacyjnego ułożenia (rozprzęgania) podjednostek NOS, co prowadzi do produkcji nie NO, a innych reaktywnych form azotu, głównie rodnika nadnitylowego ONOO⁻ [Gao YT *i wsp.*, 2007]. W ten sposób powstaje zjawisko błędnego koła: zwiększenie zapotrzebowania na tlenek azotu może zwiększyć generowanie reaktywnych form tlenu i azotu, co zmniejsza dostępność NO.

Tlenek azotu w nadciśnieniu tętniczym może więc być zaangażowany w kilka procesów:

- a. obniżanie ciśnienia krwi poprzez rozszerzenie naczyń i działania antagonistyczne względem naczyniokurczącej i mitogennej Ang II;
- b. kształtowanie macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez indukcję czynników sprzyjających kumulacji bądź degradacji białek strukturalnych;

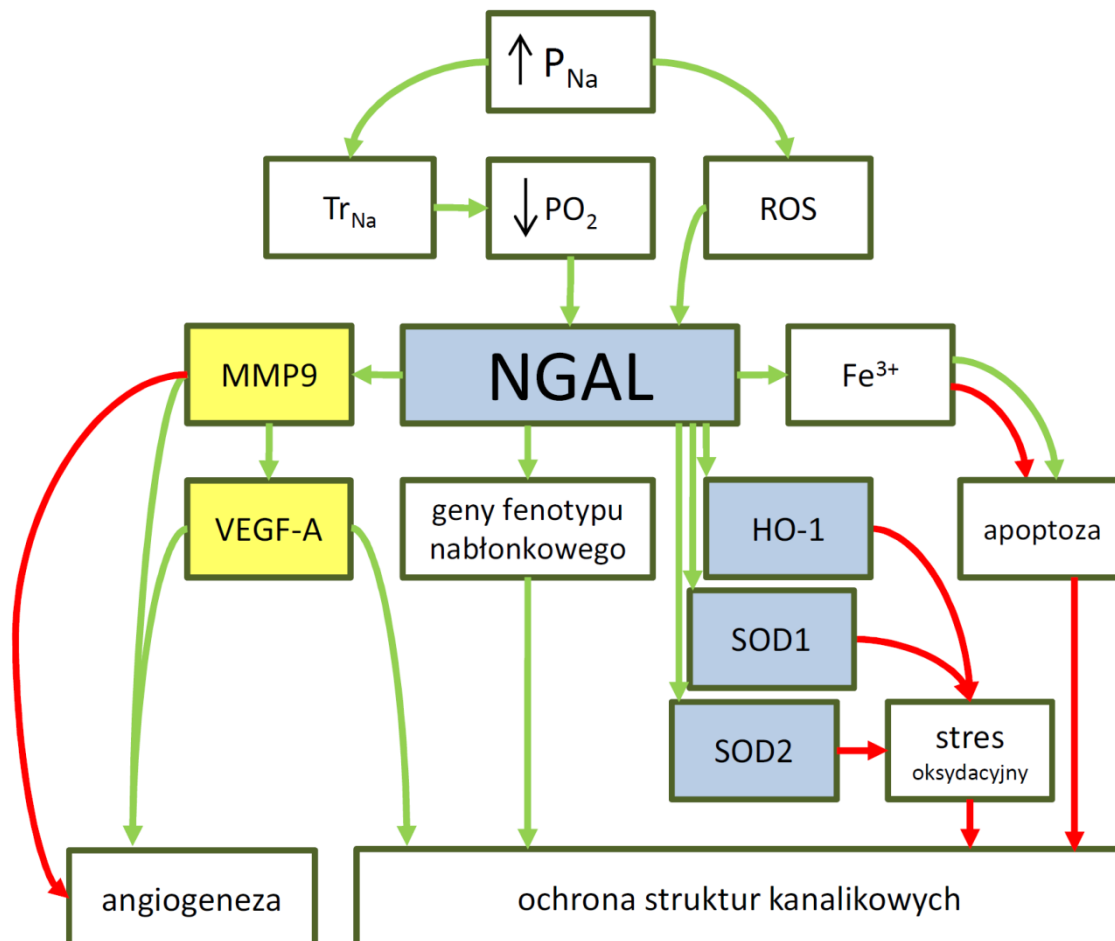
c. wpływ na równowagę rodnikową: zmniejszanie hipertensyjnego wpływu hipoksji poprzez unieszkodliwianie ROS, bądź też generowanie dodatkowych rodników tlenowych i azotowych przez syntazy tlenku azotu.

1.4.3. Neutrofilowa lipokalina towarzysząca żelatynazie (NGAL; Ryc. 4)

Neutrofilowa lipokalina towarzysząca żelatynazie (NGAL, lipokalina 2, LCN2, siderokalina, uterokalina, lipokalina związana z onkogenem *neu* – *neu-related lipocalin*, 24p3 – nazwa odnosząca się tylko do myszy) to białko transportowe z rodziny lipokalin. Rodzina ta, licząca 20 zewnątrzkomórkowych białek o budowie β -beczułki, odpowiedzialna jest za transport różnorodnych cząsteczek lipofilowych (kwasu arachidonowego, kwasów tłuszczowych, prostaglandyn, feromonów, steroidów, chelatów żelaza) [Goetz DH, 2000]. Ligandami NGAL są przede wszystkim żelatynaza MMP9 i nośniki żelaza (siderofory). Wiązanie z obydwoma tymi czynnikami czyni z NGAL cząsteczkę wspierającą procesy zapalne, szczególnie związane z infekcją; podczas gdy MMP9 poprzez degradację macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwia migrację komórek układu odpornościowego, zarządzanie lokalną dostępnością żelaza pozwala na odbieranie go bakteriom patogennym [Ratledge C, 2007]. Z tych właśnie powodów NGAL jest powszechnie obecna w tych narządach wewnętrznych, które narażone są na kontakty z patogenami (płuca, układ moczowo-płciowy). Oprócz udziału w odpowiedzi immunologicznej NGAL odgrywa rolę w procesach sterujących apoptozą.

W zdrowej nerce NGAL jest swobodnie filtrowany w kłębuszkach, a następnie w znacznej części reabsorbowany w kanalikach bliższych. W komórkach tego odcinka kanalika jest go zdecydowanie najwięcej [Schmidt-Ott *i wsp.*, 2006; Schmidt-Ott *i wsp.*, 2007], jednak w różnych schorzeniach pojawia się także w innych odcinkach. Nie zależy to od reabsorpcji z moczu, lecz od lokalnej syntezy – w mysim modelu uszkodzenia nerek wywołanego niedrożnością moczowodu tempo syntezy NGAL w kanaliku dalszym wzrastało stukrotnie już pierwszego dnia po wywołaniu niedrożności [Kuwabara T *i wsp.*, 2009].

Proapoptotyczne i antyapoptotyczne działanie NGAL. U organizmów obciążonych wysoką podażą sodu nasilenie procesów transportowych w komórkach kanalików, a więc zwiększenie zapotrzebowania energetycznego, może prowadzić do nasilenia ich apoptozy, będącej wynikiem niedotlenienia. Nasilenie apoptozy może bezpośrednio



Ryc. 4. Działanie lipokaliny NGAL w sytuacji zwiększonej podaży sodu. Kolor strzałek wskazuje na rodzaj oddziaływania (zielone – pobudzanie, czerwone – hamowanie). Strzałki dochodzące do pól niebieskich oznaczają wpływ na transkrypcję, do pól żółtych – wpływ na aktywność. P_{Na} – stężenie jonów sodu w osoczu; Ang II – angiotensyna II; Tr_{Na} – transport kanalikowy jonów sodu; PO_2 – ciśnienie parcjalne tlenu; NGAL – neutrofilowa lipokalina towarzysząca żelatynie; MMP9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9; VEGF-A – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń A; HO-1 – oksygenaza hemowa 1, SOD1, SOD2 – dysmutaza nadtlenkowa 1 i 2.

zależec od dzialania czasteczek NGAL, ktore zdolne sa zarowno do dzialania proapoptotycznego, jak i antyapoptotycznego. Lipokalina NGAL jest zdolna do odzyskiwania zelaza z martwych komorek i przekazywania zywym. Siderofory niesione przez NGAL pozwalaja na zwiekszenie uwalniania zelaza wewnatrz komorki, co skutecznie przeklada sie na obnizenie apoptozy i wzmocnienie sygnalow proliferacyjnych. W innych sytuacjach, w ktorych z powodu nadmiaru zelaza w komorce moze dochodzic do zalezego od jonow zelaza stresu oksydacyjnego, NGAL moze brac udzial w usuwaniu jego nadmiaru, a przez to rowniez dzialac antyapoptotycznie, ograniczajac uszkodzenia komorek kanalikow [Haase M *i wsp.*, 2009]. Dodatkowym dzialaniem ograniczajacym stres oksydacyjny jest wzmocnienie przez NGAL ekspresji oksygenazy hemowej 1 (HO-1, ang. *Heme Oxygenase 1*) [Mishra J *i wsp.*, 2004] oraz dysmutazy nadtlenkowej 1 i 2 (SOD1, SOD2, ang. *Superoxide Dismutase 1, 2*) [Bahmani P *i wsp.*, 2010]. U pacjentow z chroniczna niewydolnoscia nerek obserwuje sie kumulacje zelaza w kanalikach blizszych, co sprzyja powstawaniu ROS i stresu oksydacyjnego. Zarowno stres oksydacyjny, jak i duza ilosc wolnego zelaza, zdolne sa do zwiekszania ekspresji NGAL, co opisywano w sytuacji poniedokrwiennej reperfuzji nerki [Wahlberg E *i wsp.*, 2002], czy tez szoku termicznego (szczegolnie ochlodzenia) [Roudkenar MH *i wsp.*, 2009]. Jednakze zaangazowanie NGAL w zarzadzanie zelazem moze dac odmienny skutek, prowadzac do nasilenia apoptozy. To NGAL moze wywolowac zalezny od wewnatrzkomorkowego zelaza stres oksydacyjny [Lin HH *i wsp.*, 2007]. Zaburzenie gospodarki zelaza w nerkach prowadzi do zaburzen wydalania sodu – dlugotrwalie ograniczenie spozycia zelaza prowadzi do wzrostu wydalania sodu i spadku wydalania potasu u szczurow [Naito Y *i wsp.*, 2009]. U chorych z niedokrwistooscia powszechnie opisuje sie ogolnoustrojowe rozszerzenie naczyń, spadek lepkości krwi oraz zatrzymanie (retencje) wody i sodu w ustroju, co skutkuje zwiekszeniem objętości wyrzutowej serca [Zipes DP *i wsp.*, 2004]. Gospodarka zelazem w duzej mierze zalezy od nerek, ktore ograniczaja jego usuwanie w moczu, a takze syntetyzuja erytropoetyne, hormon kluczowy w zaleznych od zelaza procesach formowania elementow morfotycznych krwi. Kluczowym procesem jest endocytoza sideroforow zawartych w moczu pierwotnym przez komorki kanalikow blizszych [Smith CP i Thévenod F, 2009], jak rowniez endocytoza NGAL [Yang J *i wsp.*, 2003]. Dodatkowo czasteczka ta moze dzialac jako czynnik wspomagajacy zachowanie prawidlowej struktury kanalika. Dokonuje sie to poprzez autokrynne stymulowanie proliferacji i zwiekszenie ekspresji czynnikow

wzmacniających fenotyp nabłonkowy, co stwierdzono zarówno w rozwoju embrionalnym ssaków, jak i w dorosłych organizmach [Kamarainen M *i wsp.*, 1997; Mori K *i wsp.*, 2005]. Kluczowa dla kształtowania i funkcjonowania kanalików jest również dostępność VEGF-A, którego uwalnianie z rezerwuaru macierzy zewnątrzkomórkowej jest zależne od aktywności MMP9. Tworzenie kompleksów NGAL/MMP9 chroni MMP9 przed degradacją i w ten sposób zapewnia dostępność jej aktywnych form [Yan L *i wsp.*, 2001]. Umożliwia to efektywne działanie MMP9 (degradację macierzy zewnątrzkomórkowej i uwalnianie VEGF-A) – w ten sposób NGAL może być również zaangażowany w angiogenezę [Devarajan P, 2007].

Drogi utrzymania struktury kanalików przez NGAL. Wydaje się więc, że NGAL przyczynia się do zachowania właściwej struktury kanalików kilkoma drogami. Szczególną rolę mógłby odgrywać w utrzymaniu funkcjonalności kanalików bliższych, w których najszybciej dochodzi do martwicy w odpowiedzi na czynniki nefrotoksyczne, co jest związane z wysokim natężeniem procesów transportowych (resorpcja obowiązkowa). Jak już wspomniano wyżej, to właśnie komórki kanalików bliższych odpowiedzialne są za odzyskiwanie NGAL z moczu pierwotnego. Badania na mysim modelu cukrzycy z przewlekłym uszkodzeniem nerek pokazały, że wzrost wydalania NGAL w moczu nie był wynikiem syntezy tej substancji (ani w wątrobie, ani w nerkach), lecz następstwem zahamowania jej reabsorpcji. Co więcej, podanie blokera receptorów AT1 angiotensyny, kandesartanu, obniżało wydalanie NGAL [Kuwabara T *i wsp.*, 2009]. W ten sposób stężenie NGAL w moczu może zmieniać się wraz ze zmianami zachodzącymi przede wszystkim w samej nerce. Stężenie NGAL w moczu rośnie gwałtownie w ostrym uszkodzeniu nerek, jednak wzrost jego wydalania obserwuje się również w chronicznych schorzeniach tego narządu [Devarajan P, 2007]. NGAL zawarty w moczu pochodzi głównie z uszkodzonych komórek kanalików, natomiast ten obecny w osoczu może pochodzić ze śródbłonkowych komórek wykazujących fenotyp prozapalny [Nguyen MT i Devarajan P, 2008]. U ludzi w ustalonej fazie ostrej niewydolności nerek stężenie NGAL w osoczu wzrosło dziesięciokrotnie, a w moczu aż stukrotnie; biopsja wykazała kumulację NGAL w 50% kanalików położonych w obrębie kory [Mori K *i wsp.*, 2005]. Wzrost stężenia tej lipokaliny w moczu obserwowano również u pacjentów z nadciśnieniem [Małyszko J *i wsp.*, 2008]. NGAL jest niewielkim białkiem odpornym na degradację, wydalany z moczem, co powoduje, że jest znakomitym kandydatem na biochemiczny wskaźnik, szczególnie użyteczny

dla oceny ostrego uszkodzenia nerek w wyniku niedokrwienia lub działania substancji nefrotoksycznych. Jednak wiele nowych badań wykazało, że wzrost poziomu NGAL w osoczu i w moczu jest proporcjonalny do rozmiarów uszkodzeń nerek również w przewlekłych schorzeniach tego narządu [Ding H *i wsp.*, 2007; Mitsnefes MM *i wsp.*, 2007]. Jego pionierskie zastosowanie w praktyce diagnostycznej to zasługa m. in. zespołu badawczego z Białegostoku [Małyszko J *i wsp.*, 2009].

Nasilenie transportu kanalikowego bądź pojawienie się w przesączu kłębuszkowym substancji o działaniu nefrotoksycznym może więc prowadzić do nasilenia ekspresji NGAL, który spełniałby następujące funkcje:

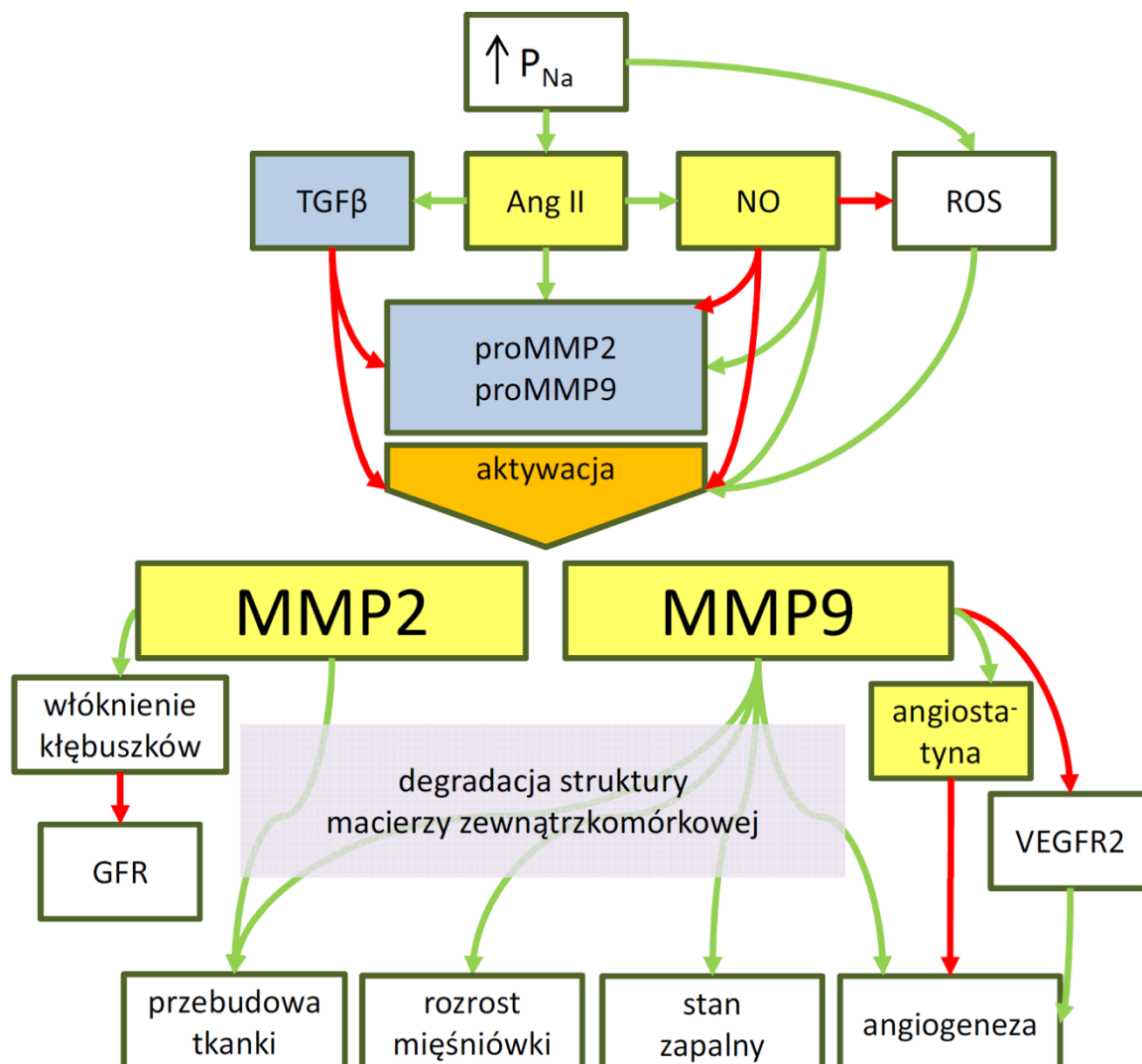
a. bezpośrednią ochronę nabłonka kanalików poprzez zależny od jonów żelaza sygnał antyapoptotyczny, sygnał proliferacyjny, a także wzmocnienie fenotypu nabłonkowego komórek kanalików nerkowych;

b. pośrednią ochronę kanalików poprzez transport cząsteczek MMP9; enzym ten może uwalniać z rezerwuaru macierzy zewnątrzkomórkowej aktywny VEGF-A o działaniu ochronnym względem struktur kanalikowych;

c. w sytuacji zachwiania równowagi gospodarki żelazem może zwiększać zależny od jonów żelaza stres oksydacyjny, a w konsekwencji nasilać apoptozę.

1.4.4. Żelatynazy (MMP2, MMP9; Ryc. 5)

Żelatynazy – MMP2 (żelatynaza A) i MMP9 (żelatynaza B) – należą do dużej rodziny metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) – enzymów cynkozależnych, których aktywność warunkowana jest dostępnością jonów wapnia i neutralnym pH. MMP dzielą się na klasy ze względu na specyfikę substratów: **a.** kolagenazy śródmiąższowe, **b.** kolagenazy kolagenu typu IV (żelatynazy), **c.** stromielizyny, **d.** matrylizyny, **e.** MMP błonowe, **f.** pozostałe. Z wyjątkiem MMP2, która w zdrowych tkankach wyrażana jest konstytutywnie na niskim poziomie [Benbow U i Brickerhoff CE, 1997], metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej podlegają działaniu wielu czynników transkrypcyjnych. Wieloetapowa kontrola aktywności odbywa się również na poziomie potranslacyjnym i obejmuje oddziaływanie z czterema białkami z rodziny TIMP (od TIMP1 do TIMP4), naturalnymi inhibitorami MMP. TIMP1 wiąże niekowalencyjnie aktywowane cząsteczki MMP, podczas gdy TIMP2 stabilizuje cząsteczki w formie zymogenu (proenzymu) [Carmeli E *i wsp.*, 2004]. Te dwa inhibitory



Ryc. 5. Żelatynazy MMP2 i MMP9 w procesach towarzyszących zmianom ciśnienia krwi spowodowanego wysokim spożyciem sodu. Kolor strzałek wskazuje na rodzaj oddziaływania (zielone – pobudzanie, czerwone – hamowanie). Strzałki dochodzące do pól niebieskich oznaczają wpływ na transkrypcję, do pól żółtych – wpływ na aktywność. Część działań żelatynaz odbywa się pośrednio, poprzez degradację włókien macierzy zewnątrzkomórkowej (strzałki przechodzące przez szare pole). P_{Na} – stężenie jonów sodu w osoczu; TGF β – transformujący czynnik wzrostu β ; Ang II – angiotensyna II; NO – tlenek azotu; ROS – reaktywne formy tlenu; proMMP2, proMMP9 – żelatynazy w formie proenzymu (zymogenu); MMP2, MMP9 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 i 9; GFR – filtracja kłębuszkowa; VEGFR2 – receptor 2 dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyń.

zdolne są do blokowania wszystkich znanych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej [Hägg PM *i wsp.*, 1997], przy czym aktywność MMP9 regulowana jest w większości przez TIMP1, a aktywność MMP2 przez TIMP2. Co interesujące, stabilizacja MMP2 przez TIMP2 jest koniecznym krokiem w jej późniejszej aktywacji przez błonową metaloproteinazę MT1-MMP [Nagase H *i wsp.*, 2006]. Uzyskany w wyniku procesów pobudzania i hamowania aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej stan dynamicznej równowagi przekłada się na procesy kształtujące tę macierz: degradację, reorganizację lub kumulację jej składników strukturalnych. W ten sposób MMP przyczyniają się do rozluźnienia struktur tkanki, umożliwiając migrację komórek, formowanie nowych struktur (angiogeneza) i naprawę zniszczonych, czy napływ komórek stanu zapalnego i kształtowanie odpowiedzi immunologicznej [Parks WC *i wsp.*, 2004]. Przez zdolność do aktywowania i dezaktywowania cząsteczek sygnałowych oraz do cięcia receptorów błonowych dla tychże cząsteczek metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej zdolne są do modyfikacji sygnału płynącego z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Już przez same zmiany w elementach strukturalnych MMP mogą modyfikować sygnał płynący do komórek, ponieważ przez receptory integrynowe komórki są wrażliwe na oddziaływania z elementami architektonicznymi tkanki. W ten sposób metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej mogą być wieloczynnikowo zaangażowane w wiele procesów fizjologicznych i patologicznych.

Żelatynazy w nerkach. W rozwijającej się nerce płodowej obecne są obydwie żelatynazy, jednak tylko MMP9 jest niezbędna do prawidłowego przebiegu morfogenezy [Lelongt B *i wsp.*, 1997]. W prawidłowo wykształconej i funkcjonującej nerce aktywność obydwu żelatynaz stwierdzono w kłębuszkach [Lovett DH *i wsp.*, 1983] i komórkach nabłonka kanalikowego [McMillan JI *i wsp.*, 1996]. MMP2 i MMP9 występują również w kanalikach zbiorczych, lecz jedynie po stronie apikalnej komórek [Piedagnel R *i wsp.*, 1999]. W komórkach mezangium stwierdzono jedynie obecność MMP2 [Davies M *i wsp.*, 1988]. Wzrost ekspresji MMP2 pojawia się w związanym z naciekami leukocytów zwłóknieniu kłębuszków, a także towarzyszy atrofii kanalików i postępującemu włóknieniu nerek [Cheng S *i wsp.*, 2006]. Zauważono również odwrotną zależność pomiędzy ilością białka MMP2 a filtracją kłębuszkową (GFR) [Chung AW *i wsp.*, 2008].

Żelatynazy w naczyniach krwionośnych. W naczyniach krwionośnych obydwie żelatynazy produkowane są przez komórki śródbłonka oraz mięśni gładkich. Nasilenie ich

aktywności towarzyszy zjawiskom stresu oksydacyjnego oraz obniżonej biodostępności tlenu azotu [Upchurch GR Jr *i wsp.*, 2001; Wang W *i wsp.*, 2005]. Za aktywację MMP odpowiedzialna może być również Ang II. Zwiększa ona ekspresję MMP9 w komórkach mięśni gładkich naczyń [Browatzki M *i wsp.*, 2005], a także ekspresję i aktywację MMP2 zarówno w mięśniówce, jak i w śródbłonku [Arenas IA *i wsp.*, 2004; Luchtefeld M *i wsp.*, 2005; Flamant M *i wsp.*, 2007]. Co więcej, infuzja niskiej, subpresyjnej dawki Ang II (50 ng/kg/min przez 28 dni) indukowała ekspresję MMP2 w aorcie młodych szczurów [Wang M *i wsp.*, 2005]. Wzrost aktywności MMP9 może przekładać się na wzmożoną degradację kolagenu IV, głównego składnika błony podstawnej, a przez to zwiększać przepuszczalność struktur naczyniowych, co ułatwia infiltrację komórek układu odpornościowego i rozwój ognisk zapalnych [Flamant M *i wsp.*, 2007].

Żelatynaza MMP9 okazuje się niezbędna w migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich w procesie odbudowy naczyń [Cho A i Reidy MA, 2002]. Myszy pozbawione obydwu żelatynaz wykazywały upośledzenie angiogenezy [Bergers G *i wsp.*, 2000]. Zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej wynikające z aktywności tych metaloproteinaz mogą więc wpływać na angiogenezę dwojako: poprzez tworzenie przestrzeni dla migracji komórek, a także poprzez zmiany dostępności cząsteczek sygnałowych. Widoczne jest to szczególnie w interakcjach ze ścieżkami sygnału przekazywanego przez VEGF-A.

Zależności między VEGF-A a MMP9. Wspomniane przy omawianiu VEGF-A badania pacjentów posiadających tylko jedną nerkę wykazały wzrost stężenia MMP9 w ich osoczu [Yildiz B *i wsp.*, 2008]. Wydaje się więc, że MMP9 bierze udział w procesie hipertroficznego wzrostu masy nerki w sytuacji jej nadmiernego funkcjonalnego obciążenia. Z drugiej jednak strony badania przeprowadzone na spontanicznie nadciśnieniowych szczurach (SHR) wykazały, że wzrost aktywności MMP9 w osoczu pociąga za sobą zintensyfikowanie procesu cięcia receptorów VEGFR2, a przez to spadek siły sygnału przekazywanego przez VEGF-A do komórek śródbłonka naczyń. Zastosowanie niespecyficznego inhibitora metaloproteinaz, doksycykliny, doprowadzało do zwiększenia ilości zewnątrzkomórkowych domen receptorów VEGFR2, ograniczenia apoptozy, a wskutek tego do zwiększenia gęstości sieci kapilarnej. Co więcej, procesy te pociągały za sobą znaczne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi u szczurów SHR [Tran E *i wsp.*, 2010]. Inne badania pokazały, że żelatynazy (głównie MMP9) uwalniają VEGF-A z nieaktywnych prokompleksów [Belotti D *i wsp.*, 2003; Rundhaug JE, 2005]. W ten sposób działanie tych dwóch cząsteczek (MMP9 i VEGF-A) wzajemnie się

uzupełnia (obydwa związki są zdolne do zwiększania przepuszczalności naczyń), co wykazały inne badania z użyciem doksycykliny, która podawana doustnie ograniczała wzmożoną przepuszczalność naczyń wywołaną podawaniem VEGF-A [Fainaru O *i wsp.*, 2008]. Wydaje się więc, że sygnał proangiogeny niesiony przez VEGF-A i aktywność żelatynolityczna głównie MMP9 pozostają w skomplikowanych zależnościach, a przebieg angiogenezy jest wypadkową ich równowagi. Dodatkowo żelatynazy mogą hamować angiogenezę poprzez cięcie plazminogenu do angiostatyny [Cornelius LA *i wsp.*, 1998; Chung AW *i wsp.*, 2006]. Ponieważ wzrost aktywności żelatynolitycznej w ścianach tętnic (a co się z tym wiąże również w osoczu) towarzyszy wielu zjawiskom (starzenie się, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze) [Chung AW *i wsp.*, 2008], może przekładać się na zaburzenie procesów angiogenezy. Z jednej strony żelatynazy mogą więc wspierać angiogenezę poprzez uwalnianie VEGF-A z prokompleksów, przez degradację błony podstawnej, czego wynikiem jest sygnał do migracji komórek śródbłonna, a także przez tworzenie przestrzeni dla tego procesu. Z drugiej jednak strony mogą działać hamująco, generując angiostatynę oraz zmniejszając liczbę receptorów VEGFR2.

Udział żelatynaz w zmianach naczyniowych towarzyszących wzrostowi ciśnienia krwi.

Przewlekłe zmiany ekspresji różnych czynników prowadzą często do trwałych, strukturalnych zmian architektury naczyń krwionośnych. Zmiany mogą zachodzić we wszystkich warstwach naczynia (śródbłonek, mięśniówka, przydanka) i w różnych kierunkach (zmiana średnicy zewnętrznej i/ lub wewnętrznej naczynia). W naczyniach oporowych (spośród których najistotniejsze dla niniejszej pracy są oporowe naczynia nerki) w ludzkim nadciśnieniu tętniczym zazwyczaj dochodzi do ukierunkowanego do wewnątrz (zmniejszenie światła naczynia z zachowaniem średnicy zewnętrznej) przerostu (eutrofizacji) warstwy środkowej naczynia (mięśniówki). Z drugiej strony przewlekłe podwyższenie przepływu krwi prowadzi w oporowych naczyniach tętniczych do zwiększenia zewnętrznej średnicy naczyń i masy ich ścian. W przemodelowaniu ściany naczyń zależnym od przepływu krwi biorą udział różne MMP, które degradując włókna macierzy zewnątrzkomórkowej wspierają proliferację i migrację komórek budujących naczynie, a także ułatwiają infiltrację leukocytów i rozwój stanu zapalnego [Raffetto JD i Khalil RA, 2008].

Wydaje się więc, że aktywność żelatynolityczna jest istotna w wielu procesach patologicznych związanych z nadciśnieniem [Chung AW *i wsp.*, 2008; Guimaraes DA *i wsp.*, 2010], jednak problem czy związana jest z procesami przyczynowymi, czy też

może jest skutkiem podwyższonego ciśnienia tętniczego pozostaje jak dotąd nierozstrzygnięty. Nadciśnienie tętnicze u ludzi wiąże się ze zmianami zarówno zawartości białka, jak i aktywności obydwu żelatynaz w osoczu, jednak badania dają sprzeczne wyniki odnośnie kierunku zmian – jedne wskazują na wyraźny wzrost tych wartości zarówno dla MMP2, jak i MMP9 [Derosa G *i wsp.*, 2006], inne odnotowują ich obniżenie [Zervoudaki A *i wsp.*, 2003]. Doświadczenia przeprowadzone na myszach pozbawionych obu alleli genu *MMP9*, u których wywoływano nadciśnienie poprzez infuzję Ang II pozwoliło sformułować hipotezę, że podwyższona aktywność MMP9 w pierwszych fazach nadciśnienia opóźnia sztywnienie naczyń [Flamant M *i wsp.*, 2007]. Jednakże rozwój nadciśnienia tętniczego wiąże się również z nadekspresją głównego inhibitora MMP9 – TIMP1. Jego oznaczanie w osoczu jest obecnie powszechną praktyką kliniczną, bowiem wzrost stężenia TIMP1 jest wskaźnikiem towarzyszącemu nadciśnieniu przerostu lewej komory serca [Lindsay MM *i wsp.*, 2008].

Przebudowa naczyń nerkowych związana jest z proliferacją komórek mięśniówki naczyń oraz wzmożoną syntezą białek strukturalnych ECM, takich jak kolagen I, III, IV w tętnicznych naczyniach oporowych, kłębuszkach i śródmiąższu. Wykazano, że NO hamuje aktywację genu kolagenu I, a w doświadczeniach z przewlekłym hamowaniem NOS wykazano wzmożoną kumulację składników strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednakże, jak pisano wcześniej, ostateczny efekt działania NO na macierz zewnątrzkomórkową może być różny i zależy prawdopodobnie od równowagi rodnikowej. Z kolei Ang II jest zdolna do aktywowania genu kolagenu I, a przez to może wywoływać zwłóknienie naczyń – co ważne niezależnie od wpływu na parametry hemodynamiczne – prawdopodobnie za pośrednictwem m. in. endoteliny 1 (ET-1) i TGFβ [Tharoux PL *i wsp.*, 2000]. Indukowane przez Ang II wzmocnienie ekspresji ET-1 odbywa się za pośrednictwem oksydazy NADPH, co wskazuje na rolę procesów charakterystycznych dla stresu oksydacyjnego w przebudowie naczyń w nerce [An SJ *i wsp.*, 2007].

Żelatynazy mają więc szeroki wpływ na funkcje naczyń krwionośnych, jednakże nie ogranicza się on jedynie do przemodelowania macierzy zewnątrzkomórkowej. W obserwacjach izolowanych krążków żyły głównej dolnej szczura poddanych naczyniokurczącemu działaniu fenylefryny wykazano, że MMP2 zdolna jest do znoszenia takiego skurczu. Był to proces niezależny od takich elementów układów naczyniorozkurczających, jak NOS, czy prostacyklina (PGI₂), ale znoszony był przez

blokery przewodnictwa Ca^{2+} i kanałów K^+ [Raffetto JD *i wsp.*, 2007]. Z kolei w doświadczeniach przeprowadzonych na wyizolowanej szczurzej aorticie pozbawionej śródbłonna i obkurczonej za pomocą fenylefryny zaobserwowano, że zarówno MMP2, jak i MMP9 znosiły skurcz, a efekt ten był zależny od dawki żelatynaz oraz czasu ich działania. Co więcej, był w pełni odwracalny – badania histologiczne wykazały brak zmian w mięśniówce i w warstwie elastynowej naczyń, a więc wykluczyły zależność tego efektu od zmian strukturalnych w macierzy zewnątrzkomórkowej [Chew DKW *i wsp.*, 2004]. Być może MMP potrafią wpływać na komórki naczyń za pośrednictwem integryn lub przez hamowanie napływu jonów Ca^{2+} z przestrzeni pozakomórkowej do komórki, jednakże powiązania między MMP a jonami wapnia w tym procesie są niejasne [Chew DKW *i wsp.*, 2004].

Żelatynazy mogą więc być zaangażowane w kształtowanie czynnościowego i morfologicznego obrazu nadciśnienia poprzez:

- a. przebudowę struktur naczyniowych i/ lub kanalikowych oraz śródmiąższu nerki prowadząc do upośledzenia lub usprawnienia ich funkcji;
- b. kształtowanie tempa angiogenezy, którą mogą stymulować przez uwalnianie VEGF-A i tworzenie przestrzeni do migracji, bądź hamować przez cięcie receptorów VEGFR2 i uwalnianie angiostatyny;
- c. udział w formowaniu ognisk stanu zapalnego, poprzez rozszczelnianie złączy komórkowych i ułatwianie infiltracji komórek układu odpornościowego;
- d. potencjalne bezpośrednie i krótkofalowe działanie naczyniorozszerzające.

1.5. Nierozstrzygnięte pytania o sodozależne nadciśnienie tętnicze

Fizjologiczne potrzeby ludzkiego organizmu zaspokaja dzienna dawka sodu na poziomie 10-20 mmol. Jednak wiele dorosłych osób przyjmuje w ciągu doby ponad 100 mmol, a w społeczeństwach azjatyckich nawet ponad 200 mmol jonów Na^+ , co stanowi dziesięcio- a nawet dwudziestokrotne przekroczenie fizjologicznego zapotrzebowania organizmu [Brown IJ *i wsp.*, 2009]. Co prawda obecne zalecenie Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) to nie więcej niż 5 g soli (2 g jonów sodu, czyli 87 mmol) dziennie [raport World Health Organization, 2007], jednak w związku z doniesieniami o pozytywnym wpływie na układ krążenia nawet niewielkiego ograniczenia spożycia sodu [He FJ i MacGregor GA, 2003], wartość

ta jest systematycznie obniżana. W społeczeństwach zachodnich głównym źródłem sodu jest żywność przetworzona; przeciętny ciepły posiłek w stołówce zakładu pracy w Amsterdamie to 7 g soli (140% zalecanej przez WHO dawki dziennej) [Brewster LM *i wsp.*, 2011]. Warto zaznaczyć, że Polacy w badaniach globalnego programu INTERSALT, mającego na celu określenie związku między spożyciem soli a stanem zdrowia różnych społeczności, znajdują się w pierwszej dziesiątce narodów z największym dobowym wydalaniem sodu w moczu [Brown IJ *i wsp.*, 2009].

Udział wymienionych w poprzednich rozdziałach, jak i innych czynników w rozwoju nadciśnienia tętniczego został opisany w różnych modelach doświadczalnych i stanach klinicznych. Były to jednak badania skupione na stanie naczyń obwodowych, czy też wykonane w modelach nadciśnienia związanego np. z zaburzeniami układu renina-angiotensyna-aldosteron lub patologicznym zwężeniem tętnicy nerkowej. W przypadku sodozależnego nadciśnienia tętniczego wiele kwestii nadal pozostaje niejasnych [Aviv A, 2001]. Pomimo, że sód jako czynnik ryzyka w nadciśnieniu został opisany dość dawno, nadal prowadzone są badania wnoszące zupełnie nowe informacje o zależności między jonami sodu a nadciśnieniem tętniczym [Gu JW *i wsp.*, 2008]. Wiele kwestii pozostaje nadal nierozstrzygniętych, chociażby które z obserwowanych zmian czynnościowo-morfologicznych, powstających w następstwie wysokiego spożycia sodu, są przyczyną, a które konsekwencją nadciśnienia. Takie pytanie stawiano sobie także przystępując do niniejszych badań.

Ważnym argumentem przemawiającym za potrzebą takich badań jest zarówno społeczne znaczenie choroby nadciśnieniowej, jak i znaczenie ustalenia natury jej związku z nadmiernym spożyciem soli. Pomimo wzrostu świadomości prawidłowego odżywiania się, problem spożywania dużych ilości soli, a także przyjmowania w pożywieniu wielu związków sodowych (glutaminian sodu, benzoesan sodu) jest ciągle aktualny; praktyki te mogą istotnie przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Wysokie spożycie sodu mogłoby wywołać groźne następstwa szczególnie u osób z różnorodnymi genetycznymi predyspozycjami do nadciśnienia, niekoniecznie sodozależnego. Interesujące więc byłoby przeanalizowanie zmian patologicznych w organizmie zwierząt doświadczalnych, które oprócz środowiskowego czynnika zwiększonej podaży sodu w diecie wykazują genetyczne predyspozycje do rozwoju nadciśnienia. Połączenie obserwacji funkcjonalnych, prowadzonych zarówno na zwierzętach czuwających, jak i w doświadczeniach ostrych w narkozie (z zastosowaniem

precyzyjnych pomiarów, np. ukrwienia nerki), z obserwacją zmian aktywności czynników biochemicznych pozwoliłoby uzyskać szerszą wiedzę na temat roli indukowanych zwiększoną podażą sodu przekształceń strukturalnych w nerce oraz udziału czynnych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej w tych procesach. Ponadto bardzo interesujące byłoby przybliżenie się do rozstrzygnięcia wątpliwości, które z obserwowanych procesów są bezpośrednio zależną od sodu przyczyną nadciśnienia tętniczego.

2. Cel badań

1. Określenie wpływu wysokiej podaży sodu w diecie na kształtowanie się ciśnienia tętniczego krwi, a także na parametry hemodynamiczne i czynność wydalniczą nerek szczurów o różnych predyspozycjach do rozwoju nadciśnienia tętniczego (szczury Wistar nieobciążone genetycznymi predyspozycjami do rozwoju nadciśnienia tętniczego i szczury SHR z takimi predyspozycjami);
2. Ustalenie związku między obserwowanymi zmianami w krążeniu nerkowym i w czynności wydalniczej ze zmianami morfologicznymi w obrębie nerek;
3. Próba znalezienia czynników biochemicznych obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej, które mogłyby uczestniczyć w kształtowaniu zmian czynnościowo-morfologicznych.

3. Materiały i metody

Doświadczenia wykonano na samcach szczurów ze stada Wistar ze zwierzętarni IMDiK PAN (n = 56) i szczepu SHR – szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem, ze zwierzętarni Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi (n = 33). Procedury doświadczalne zostały zaaprobowane przez I Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie.

3.1. Doświadczenia chroniczne i ostre

3.1.1. Doświadczenie chroniczne

W chwili rozpoczęcia doświadczenia chronicznego szczury SHR były w wieku ok. 8-10 tyg.; zgodnie z ogólną charakterystyką szczepu szczury w tym wieku powinny charakteryzować się ustabilizowanym nadciśnieniem tętniczym [Okamoto K i Aoki K, 1963; Tanase H *i wsp.*, 1982]. Szczury Wistar (normotensyjne) i SHR były karmione paszą (SSNIFF GmbH, Soest, Niemcy) standardową (STD, 0,25% Na, w/w) lub paszą o wysokiej zawartości sodu (HS, 4% Na, w/w) przez 21 dni. Powstałe w ten sposób grupy w dalszym tekście skrótowo określane będą jako:

- Wistar STD – szczury Wistar na diecie standardowej;
- Wistar HS21 – szczury Wistar na 21-dniowej diecie wysokosodowej;
- SHR STD – szczury SHR na diecie standardowej;
- SHR HS21 – szczury SHR na 21-dniowej diecie wysokosodowej.

W dodatkowych doświadczeniach kontrolnych, sprawdzających założenia metodyczne, wykorzystano również grupy:

- Wistar HS10 – szczury Wistar na 10-dniowej diecie wysokosodowej;
- Wistar HS28 – szczury Wistar na 28-dniowej diecie wysokosodowej.

Zwierzęta przetrzymywane były w klatkach hodowlanych w systemie oświetlenia dzień : noc = 12:12, ze stałym dostępem do pożywienia i wody. Podczas diety dwa razy w tygodniu czuwającym szczurom pobierano z żyły ogonowej krew w celu oznaczenia stężenia jonów Na^+ (P_{Na}) oraz substancji osmotycznie czynnych (P_{osm}) w osoczu oraz mierzono skurczowe ciśnienie krwi tętniczej (SBP; nieinwazyjna technika mankietów okluzyjnych zakładanych na ogon, system CODA, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA). W czasie pomiaru SBP zwierzęta były częściowo

unieruchomione, a na ogony zakładano im mankiety okluzyjne z wbudowanym czujnikiem określającym obok ciśnienia krwi również częstość tętna i przepływ krwi przez tętnicę ogonową. W ciągu tygodnia przed rozpoczęciem właściwych pomiarów zwierzęta były poddawane systematycznemu treningowi, który miał na celu ograniczenie stresu i przyzwyczajenie zwierzęcia do spokojnego przebywania w rurce pomiarowej. Pomiar ciśnienia był weryfikowany przez obserwację częstości tętna (HR) – zgodnie z zaleceniami producenta przy HR wyższym niż 500 skurczów/min pomiar ciśnienia odrzucano, uznając go za zbyt zafałszowany przez stres psychiczny, wynikający m.in. z unieruchomienia zwierzęcia.

3.1.2. Chirurgiczne przygotowanie do doświadczenia ostrego

W ostatnim dniu doświadczenia szczury usypiano za pomocą tiopentalu sodu (100 mg/kg i.p.; Thiopental, Sandoz GmbH, Kundl, Austria), który w zastosowanej dawce zapewnia stabilne znieczulenie przez kilka godzin. Podczas całego doświadczenia monitorowano odruch rogówkowy oraz sztywność ogona i w razie potrzeby dodawano dożylnie odpowiednią objętość (ok. 0,5-1 ml) rozcieńczonego środka znieczulającego.

Uwaga metodyczna: U zwierząt po diecie wysokosodowej zaobserwowano zwiększenie wrażliwości na stosowaną narkozę. Wyżej wymieniona dawka, skuteczna i bezpieczna dla zwierząt po diecie STD, u zwierząt po diecie wysokosodowej w większości przypadków prowadziła do zgonu. Dlatego też ostatecznie zwierzętom ze zwiększoną podażą sodu w diecie podawano ok. 2/3 zalecanej dawki.

Temperatura ciała szczura była utrzymywana na poziomie ok. 37 °C przy użyciu automatycznego systemu grzewczego (Fine Science Tools TR-200 21052-00 Animal Temperature Controller, Biodirect Inc, Taunton, MA, USA). Wykonywano tracheotomię, po czym umieszczano w tchawicy rurkę polietylenową zapewniając swobodną wymianę gazową. W czasie zabiegu chirurgicznego ubytek płynów był wyrównywany poprzez infuzję dożylną (kaniula polietylenowa wprowadzona do żyły udowej) 3% roztworu albuminy bydlęcej (albumina, frakcja V, AppliChem GmbH, Darmstadt, Niemcy) w płynie Ringera (10 ml/kg/h; Baxter Polska Sp. z o. o., Warszawa, Polska). Kaniulę teflonową wprowadzano poprzez tętnicę udową do aorty celem pomiaru średniego ciśnienia krwi tętniczej (MBP; Transducer M1567A, Philips Medizin Systeme Böblingen GmbH, Böblingen, Niemcy); zależne od zmian ciśnienia odkształcenia membrany czujnika były przetwarzane na zmiany napięcia elektrycznego i rejestrowane w sposób

ciągły. Następnie wykonywano cięcie lędźwiowe, delikatnie uwalniano lewą nerkę z otaczających tkanek i tłuszczu, pozostawiając nienaruszoną torebkę włóknistą oraz szypułkę nerkową. Tak przygotowany narząd umieszczano w holderze stosowanym do badań mikropunkcyjnych. Moczowód, po delikatnym usunięciu tkanki tłuszczowej, kaniulowano w celu dokonania zbiórki moczu, a także zapewnienia swobodnego odpływu moczu z nerki. Na tętnicę nerkową (po częściowym jej oddzieleniu od żyły nerkowej) zakładano sondę elektroakustyczną typu MAPRB1 która, współpracując z przepływomierzem ultradźwiękowym (model T106, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA), umożliwiała pomiar całkowitego przepływu krwi przez nerkę (RBF). Przepływy krwi przez trzy strefy nerki mierzono z użyciem sond światłowodowych współpracujących z miernikiem przepływu typu laser-Doppler (system Periflux 4001, Perimed AB, Jarfalla, Szwecja): sondy powierzchniowej (korowy przepływ krwi, CBF) i sond igłowych (zewnątrzrdzeniowy i wewnątrzrdzeniowy przepływ krwi, odpowiednio OMBF i IMBF). Po wstępnej ocenie wielkości nerki sondy igłowe były wbijane na głębokość 3 i 5 mm (odpowiednio sonda OMBF i IMBF, w przypadku nerki o standardowej wielkości) lub 4 i 6 mm (w przypadku nerki o większych rozmiarach). Przepływ krwi wyrażano w umownych jednostkach PU (Perfusion Unit). Wcześniejsze kalibrowanie sond w płynie kalibracyjnym (sygnał pomiarowy swobodnych ruchów Browna = 250 PU) umożliwiała porównywanie pomiarów pomiędzy różnymi doświadczeniami/ zwierzętami. Położenie sond weryfikowano po zakończeniu doświadczenia wykonując cięcie podłużne nerki. Nerki ważono.

3.1.3. Doświadczenie ostre

Po zakończeniu przygotowania chirurgicznego i umiejscowieniu sond laser-Doppler infuzję roztworu albuminy zastępowano infuzją izotonicznego roztworu soli fizjologicznej (10 ml/kg/h; Fresenius Kabi Polska Sp. z o. o., Warszawa, Polska). Po ustabilizowaniu się parametrów hemodynamicznych nerki rozpoczynano ciągły pomiar ciśnienia krwi, całkowitego przepływu krwi przez lewą nerkę oraz przepływów strefowych, a także prowadzono zbiórkę moczu przez 30 minut. W zebranej próbce moczu określano diurezę minutową (objętość moczu/czas zbiórki moczu w min), a także stężenie, a następnie wydalanie sodu ($U_{Na}V$) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$).

3.1.4. Pobranie materiału na skrawki histologiczne i na oznaczenia biochemiczne

W przypadku grupy zwierząt przeznaczonych do pobrania materiału do oznaczeń biochemicznych i do wykonania skrawków histologicznych, po zakończeniu obserwacji chronicznych nie przeprowadzono doświadczenia ostrego z poprzedzającym przygotowaniem chirurgicznym. Bezpośrednio po uśpieniu zwierząt tiopentalem sodu (100 mg/kg i.p.) pobierano mocz z pęcherza. Prawą nerkę wycinano, ważono, rozcinano wzdłuż i utrwalano w celu późniejszego wykorzystania do sporządzenia preparatów mikroskopowych: jedną połowę nerki utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA; Eurochem BGD Sp. z o. o., Tarnów, Polska), drugą mrożono w izopentanie (2-metylbutan, SIGMA-Aldrich, St Louis, MO, USA) schłodzonym ciekłym azotem i przechowywano w temp. -80°C . Za pomocą igły iniekcyjnej pobierano z aorty krew.

3.2. Analiza próbek moczu i krwi

3.2.1. Pobranie próbek i oznaczanie parametrów wydalniczych

Po określeniu objętości moczu poprzez ważenie (zakładając gęstość moczu równą gęstości wody) próbkę wirowano (800 g, 5 min). Krew wirowano (1500 g, 15 min, 4°C), zachowywano osocze. W próbkach moczu i osocza oznaczano zawartość substancji osmotycznie czynnych za pomocą osmometru (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Niemcy), mierząc obniżenie punktu zamarzania próbki względem punktu zamarzania wody. Stężenie sodu mierzono przy użyciu fotometru płomieniowego (model PFP7, Jenway, Essex, UK), po czym odczytywano z krzywej standardowej wykreślonej na podstawie pomiarów roztworów standardowych o znanym stężeniu sodu. Pozostałą objętość próbek przechowywano w -80°C w celu późniejszego wykorzystania do oznaczeń biochemicznych.

3.2.2. Wykonanie testów ELISA na próbkach moczu i osocza

Zebrane próbki moczu i osocza wykorzystano do oznaczenia stężenia VEGF-A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*), NGAL (ang. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*), metabolitów NO (NO_2/NO_3) i 8-izoprostanu (8-izoprostaglandyny $\text{F}2\alpha$). Oznaczenia zostały wykonane za pomocą testów enzymatycznych ELISA według instrukcji załączonych przez producentów:

- VEGF-A: nr kat. E90143Ra, Usen Life Science Inc., Wuhan, Chiny;
- NGAL: nr kat. KIT 041, BioPorto Diagnostic, Gentofte, Dania;
- NO₂/NO₃: nr kat. 917-020, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA;
- 8-izoprostan: nr kat. 516351, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA.

Pomiary zostały wykonane za pomocą aparatu FLUOstar Omega z oprogramowaniem do pomiarów Omega 1.30 i oprogramowaniem do analizy MARS 2.10 R3 (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Niemcy). Ponieważ stężenie substancji w moczu zależne jest nie tylko od ilości powstającej substancji, ale również od stopnia zagęszczania moczu (osmolalności), wyniki otrzymane dla moczu standaryzowano poprzez przeliczenie ich na osmolalność moczu.

3.3. Analiza histologiczna z użyciem skrawków parafinowych

3.3.1. Wykonanie barwień i znakowań na skrawkach parafinowych

Przygotowanie preparatów na skrawkach parafinowych odbyło się we współpracy z zespołem pani prof. dr hab. Janiny Rafałowskiej z Zakładu Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej IMDiK PAN.

Połówki nerek utrwalane przez tydzień w 4% PFA odwadniano i zalewano parafiną. Z uzyskanych bloczków wykonywano skrawki (mikrotom SM 2000R, Leica Microsystems Newcastle Ltd, Sheffield, South Yorkshire, UK) grubości 5 µm, które suszono w 56 °C. Przed barwieniem ze skrawków usuwano parafinę, a następnie uwadniano. Na tak przygotowanych skrawkach wykonano barwienia hematoksylina-eozyna (HE; hematoksylina, Fluka AG, Buchs SG, Szwajcaria; eozyna, Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska) celem uzyskania ogólnej informacji o cechach morfologicznych. Drugą grupę skrawków przeznaczono na wykonanie znakowania przeciwciałami skierowanymi przeciwko:

- VEGF-A (1:400 w 1% BSA; królicze poliklonalne, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK). Przeciwciało II-rzędowe: goat F(ab')₂ Fragment Anti-Rabbit IgG (H+L)-Biotin (Beckman Coulter Inc., Marsylia, Francja);
- PCNA (1:200 w 1% BSA; mysie monoklonalne przeciwciało NCL-L-PCNA, Leica Biosystem Newcastle Ltd, Sheffield, South Yorkshire, UK). Przeciwciało

II-rzędowe: goat F(ab')₂ Fragment Anti-Mouse IgG (H+L)-Biotin (Beckman Coulter Inc., Marsylia, Francja).

Wykonano również negatywną kontrolę metody, sporządzając preparaty według powyższych procedur, lecz bez użycia przeciwciał pierwszorzędowych.

3.3.2. Obliczenie indeksu uszkodzenia kłębuszków nerkowych

Do obliczenia indeksu uszkodzenia kłębuszków [Sandberg MC i Laborde C, 2004] wykorzystano skrawki wybarwione hematoksyliną i eozyną. Pięćdziesiąt losowo wybranych kłębuszków z każdej nerki zostało oszacowanych pod mikroskopem świetlnym (obrazy w powiększeniu 200x, fluorescencyjny mikroskop odwrócony Axiovert 25 z kamerą cyfrową AxioCam MRc 5 i oprogramowaniem Axio Vision w wersji 4.8.2; Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) wg półilościowej skali uszkodzenia: stopień 0 – cały kłębuszek prawidłowy, 1 – uszkodzone do 25% powierzchni kłębuszka, 2 – uszkodzenie w granicach 25-50% powierzchni kłębuszka, 3 – uszkodzenie w granicach 50-75% powierzchni kłębuszka, 4 – uszkodzone 75-100% kłębuszka. Indeks uszkodzenia kłębuszków (IUK) policzono według wzoru $IUK = [(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$, gdzie n_x jest liczbą kłębuszków w każdym ze stopni zniszczenia. Wynik IUK mieścił się w skali od 0 do 4.

3.3.3. Obliczenie stopnia uszkodzenia rdzenia nerkowego

Do określenia stopnia uszkodzenia obydwu obszarów rdzenia (zewnętrznego i wewnętrznego) wykorzystano preparaty parafinowe wyznakowane przeciwko PCNA. Wykonano zdjęcia dwudziestu losowo wybranych obszarów z każdej nerki (dziesięć z obszaru rdzenia zewnętrznego i dziesięć z obszaru rdzenia wewnętrznego, pole widzenia 315 x 210 μm). Za pomocą programu ImageJ (wersja 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) obliczono całkowitą liczbę jąder oraz udział jąder wyznakowanych przeciwko PCNA w ogólnej ich puli.

3.4. Analiza tkanek nerki z użyciem skrawków mrożeniowych

3.4.1. Wykonanie skrawków mrożeniowych

Połówkę nerki zamrożoną w izopentanie schłodzonym ciekłym azotem zatapiano w medium mrożeniowym (NEG 50, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), po czym w mikrotomie niskotemperaturowym (Microm HM 550, GMI Inc., Minneapolis, MN, USA) wykonywano skrawki grubości 14 μm . Skrawki przeznaczono do wykonania zymografii żelatynowej *in situ* celem uwidocznienia struktur wykazujących aktywność żelatynolityczną.

3.4.2. Zymografia żelatynowa *in situ*

Aktywność żelatynolityczną metaloproteinaz (MMP2 i MMP9) określano za pomocą zymografii żelatynowej *in situ*; metoda ta opiera się na traktowaniu skrawków mrożeniowych żelatyną skoniugowaną z fitochromem FITC (nr kat. D12054, Invitrogen, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), której degradacja wyzwała świecenie. Żelatynę rozpuszczano w buforze aktywującym (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 ; końcowe stężenie żelatyny 100 $\mu\text{g/mL}$). Skrawki mrożeniowe suszono w temperaturze pokojowej, pokrywano roztworem żelatyny i inkubowano w zaciemnionej wilgotnej komorze (2 h, 37 $^{\circ}\text{C}$), po czym utrwalano świeżo przygotowanym zimnym roztworem PFA w PBS (4%, 15 min; PBS: Gibco, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA). Znakowanie jąder wykonywano za pomocą roztworu Hoechst 33258 (1:150, 15 min; SIGMA-Aldrich, St Louis, MO, USA). Preparaty pokrywano zamykaczem do preparatów fluorescencyjnych (Fluorescent Mounting Medium, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), nakładano szkiełka nakrywkowe, suszono 12 h w temperaturze pokojowej i przechowywano w zaciemnionych kasetkach w temp. 4 $^{\circ}\text{C}$. W celu wykluczenia niespecyficznego świecenia na części preparatów wykonano negatywną kontrolę: do buforu aktywującego dodano 1,10-O-fenantrolinę (Invitrogen, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), inhibitor metaloproteinaz (chelator jonów cynku) o szerokim spektrum działania w końcowym stężeniu 1 mM.

Wyniki badań oceniano w mikroskopie konfokalnym (LSM 580 z oprogramowaniem Zen 2008, Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA). Dla wzbudzenia fluorescencji FITC korzystano z lasera argonowego 488 nm, a do

wzbudzenia fluorescencji Hoechst 33258 lasera 405 nm. Obraz rejestrowano za pomocą kamery cyfrowej CCD-4230. Dalsza analiza zdjęć odbywała się z użyciem programu ImageJ.

3.5. Analiza statystyczna

W analizie statystycznej posłużono się programem Statistica (wersja 10, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Do oceny statystycznej profilów mierzonych zmiennych w czasie (wewnątrz jednej grupy) stosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów. Wartości dla indywidualnych punktów w czasie porównywano za pomocą testu t Studenta dla zmiennych zależnych. Do porównania między grupami stosowano klasyczną odmianę ANOVA, a następnie zmodyfikowany test t Studenta dla zmiennych niezależnych lub test *post-hoc* Newmana i Keulsa; unikano wielokrotnych porównań. Dla wybranych parametrów obliczano również korelacje. W tekście, tabelach i na rycinach zaznaczano średnią (ang. *mean*) oraz błąd standardowy średniej (SEM, ang. *Standard Error of the Mean*) jako miarę rozrzutu danych. Za istotną statystycznie różnicę przyjmowano poziom istotności $p \leq 0,05$. Na rycinach zaznaczano trzy stopnie istotności: $p < 0,05$ (* lub #), $p < 0,01$ (** lub ##), $p < 0,001$ (***) lub ####).

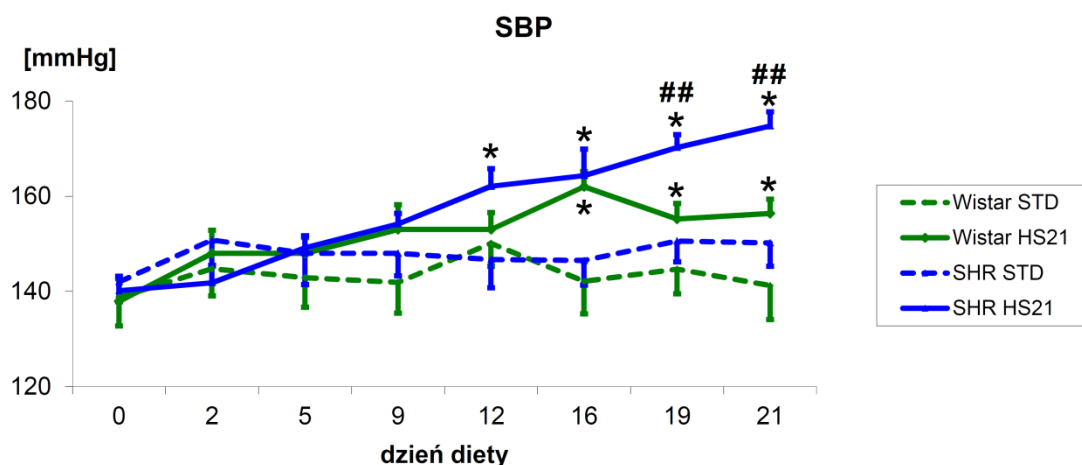
4. Wyniki

4.1. Wpływ wysokiej podaży sodu w diecie na ciśnienie krwi tętniczej i parametry osocza u zwierząt czuwających (doświadczenia chroniczne)

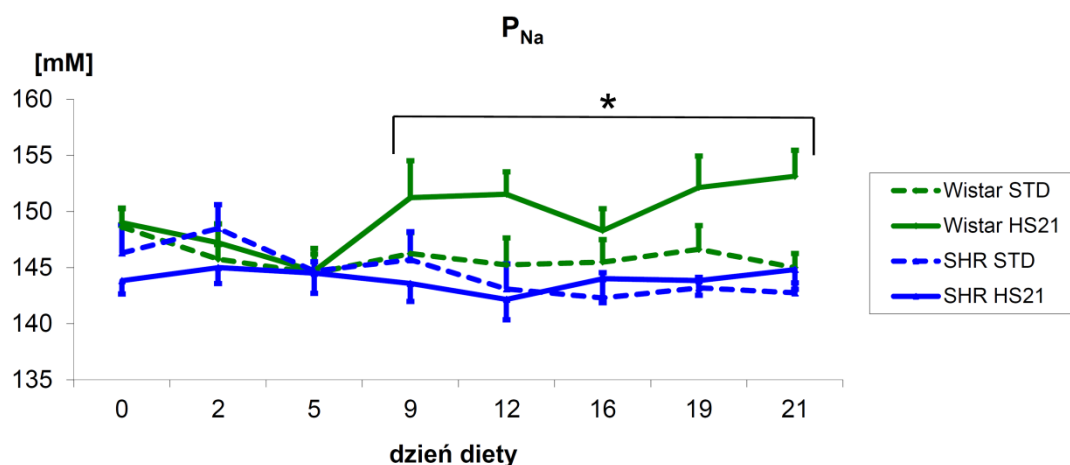
W dniu rozpoczęcia doświadczenia chronicznego szczury obydwu stad miały porównywalne wartości ciśnienia skurczowego krwi (138 ± 5 mmHg dla szczurów Wistar, 140 ± 3 mmHg dla szczurów SHR). W ciągu stosowania diety wysokosodowej skurczowe ciśnienie krwi tętniczej stopniowo rosło, osiągając wartości znamienne różne względem dnia 0 już w drugim dniu dla szczurów Wistar (148 ± 5 mmHg; $p < 0,05$) i w piątym dniu dla szczurów SHR (149 ± 2 mmHg; $p < 0,05$). Szczury SHR reagowały na dietę wysokosodową silniejszym wzrostem ciśnienia tętniczego niż szczury Wistar; od dnia dziewiętnastego różnica między grupami była statystycznie istotna (155 ± 3 mmHg dla Wistar, 170 ± 3 mmHg dla SHR; $p < 0,01$), natomiast opisana tendencja była widoczna już od dnia dwunastego (Ryc. 6).

U szczurów SHR stężenie jonów sodu w osoczu nie było zależne od rodzaju diety. Jedynie szczury Wistar zareagowały na dietę wysokosodową wzrostem stężenia jonów Na^+ w osoczu, począwszy od dnia dziewiątego, osiągając zarazem wartości wyższe niż u szczurów SHR na tej samej diecie (151 ± 3 mM vs 144 ± 2 mM; $p < 0,05$; Ryc. 7), natomiast zwiększona podaż sodu nie miała wpływu na stężenie ogółu substancji osmotycznie czynnych w osoczu u żadnej z grup; u badanych zwierząt parametr ten wahał się w granicach 296-307 mOsm/kg H_2O .

Przez trzy tygodnie doświadczenia chronicznego szczury na diecie wysokosodowej przybierały na wadze znacznie mniej (Wistar, Δ : 51 ± 4 g HS21 vs 84 ± 5 g STD; SHR, Δ : 39 ± 4 g HS21 vs 68 ± 4 g STD; $p < 0,001$), ponadto szczury SHR na diecie STD rosły znacznie wolniej niż szczury Wistar na tej samej diecie (Δ : 68 ± 4 g vs 84 ± 5 g; $p < 0,05$; Ryc. 8).



Ryc. 6. Wpływ diety wysokosodowej na skurczowe ciśnienie krwi tętniczej (SBP) u czuwających szczurów. Zaznaczono istotnie różnice w tych samych punktach czasowych: * – w obrębie stada (Wistar STD vs Wistar HS21 lub SHR STD vs SHR HS21; $p < 0,05$), ## – w obrębie diety (Wistar STD vs SHR STD lub Wistar HS21 vs SHR HS21; $p < 0,01$). Istotnych różnic względem dnia 0 nie zaznaczono dla lepszej czytelności ryciny (Wistar HS21 od dnia 2., SHR HS21 od dnia 5.; $p < 0,05$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 9$, Wistar HS21 $n = 14$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 12$.



Ryc. 7. Wpływ diety wysokosodowej na stężenie jonów sodu w osoczu (P_{Na}) u czuwających szczurów. * – wartości dla Wistar HS21 istotnie różne od wartości dla SHR HS21 mierzonych w tych samych dniach ($p < 0,05$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 8$, Wistar HS21 $n = 13$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 12$. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 6.

4.2. Zmiany morfologiczne nerki powstające w następstwie działania diety wysokosodowej

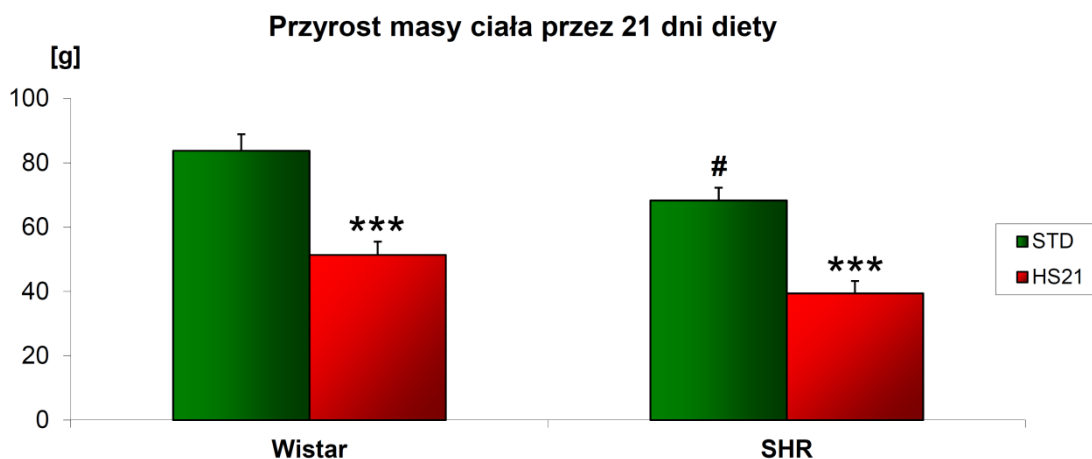
U szczurów obydwu stad zaobserwowano zwiększenie masy nerki w odpowiedzi na dietę wysokosodową, jednak wzrost masy nerki szczurów SHR był około dwukrotnie mniejszy niż u szczurów Wistar (Ryc. 9). Ponadto, podczas przygotowania chirurgicznego, wyraźnie zarysowywała się różnica w stanie największych naczyń krwionośnych, które u zwierząt po diecie wysokosodowej były kruche, a ich ściany ulegały rozwarstwianiu. Obserwowano również wzrost wrażliwości zwierząt na narkozę (uwaga w Rozdz. 3.1.2).

4.2.1. Zmiany w obrębie kory nerki – obraz morfologiczny z oceną stopnia uszkodzenia

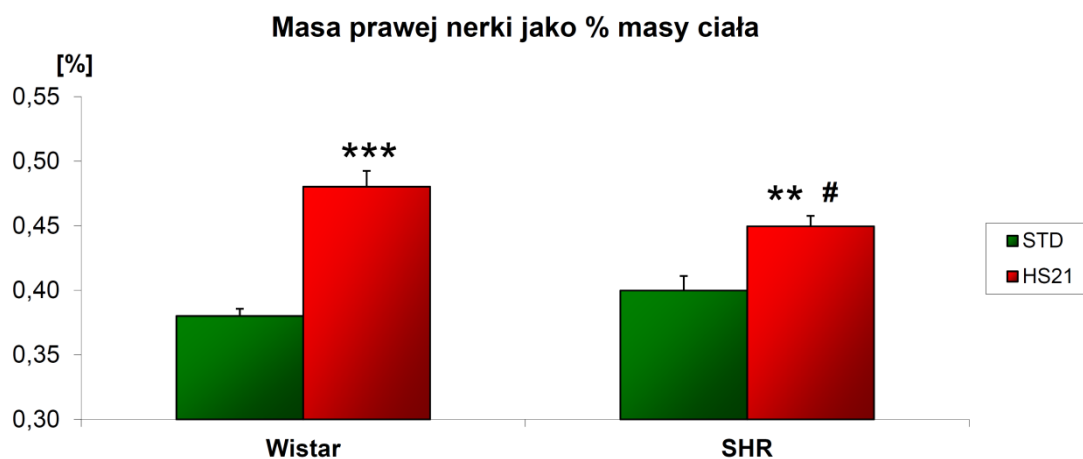
Kora nerki szczurów Wistar na diecie standardowej wybarwiona hematoksyliną i eozyną wykazywała prawidłową uporządkowaną strukturę. Dało się w niej wyróżnić struktury kłębuszków oraz kanalików krętych, a także niewielkie obszary śródmiąższu. Komórki ścian kanalików były foremne, zbliżone do prostopadłościanu, z centralnym okrągłym jądrem (Ryc. 10a). Komórki śródbłonka naczyń kłębuszka miały typowe, lekko wydłużone jądra; w świetle naczyń widoczne były eryocyty. Komórki nabłonkowe torebki kłębuszka były podłużne z wałeczkowatym jądrem (Ryc. 11a). Znakowanie przeciwko PCNA wykazało jedynie pojedyncze jądra wyznakowane pozytywnie – pojawiały się one zarówno w strukturach kłębuszka (Ryc. 11e), jak i kanalików (Ryc. 10d).

Zwiększenie podaży sodu w diecie u szczurów Wistar owocowało zmianami w strukturze morfologicznej kłębuszków, która ulegała nieznacznemu rozrzedzeniu. W niektórych kłębuszkach pojawiała się wakuolizacja, czasem obkurczenie struktur naczyniowych kłębuszka (Ryc. 10b). Równocześnie liczba jąder wyznakowanych przeciwko PCNA była znacznie większa; tak wyznakowane jądra obserwowano zarówno w strukturach kłębuszków (Ryc. 11f), jak i kanalików (Ryc. 10j).

Morfologia kory szczurów SHR na diecie standardowej odbiegała znacznie od morfologii szczurów Wistar na tej samej diecie. Obserwowano liczne obszary z komórkami o trudnych do określenia granicach, co sugerowałoby występowanie lokalnego obrzęku tkanki (Ryc. 13a). Wyraźne było również uszkodzenie kłębuszków, w których rozrzedzenie struktur występowało wraz z utratą prawidłowego kształtu jąder



Ryc. 8. Porównanie przyrostu masy ciała w zależności od diety. *** – porównanie w obrębie stada ($p < 0,001$), # – porównanie w obrębie diety ($p < 0,05$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 13$, Wistar HS21 $n = 19$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 12$.



Ryc. 9. Przyrost masy nerki po 21 dniach diety wysokosodowej wyrażony jako procent masy ciała. * – porównanie w obrębie stada (***) – $p < 0,001$ dla szczurów Wistar, ** – $p < 0,01$ dla SHR), # – porównanie w obrębie diety ($p < 0,05$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 17$, Wistar HS21 $n = 16$, SHR STD $n = 8$, SHR HS21 $n = 12$.

(Ryc. 11c). Jądra wyznakowane przeciwko PCNA występowały zarówno w ścianach kanalików, komórkach kłębuszka, jak i komórkach nabłonkowych torebki kłębuszka (Ryc. 11g), lecz nie w śródmiaższu (Ryc. 13d). W obrębie kory nerki szczurów SHR po diecie wysokosodowej pojawiały się liczne obszary silnie zwakuolizowane (Ryc. 13g). Struktury kłębuszka były znacząco zniszczone (Ryc. 11d). Zmianom tym towarzyszył znaczny udział jąder wyznakowanych przeciwko PCNA (Ryc. 11h, 13j).

4.2.2. Indeks uszkodzenia kłębuszków

Oszacowanie indeksu uszkodzenia kłębuszków w czterech omawianych grupach pokazało, że zniszczenie kłębuszków pod wpływem diety wysokosodowej jest znacznie większe u SHR ($1,74 \pm 0,18$ vs $0,78 \pm 0,17$; $p < 0,01$), których kłębuszki już wyjściowo są bardziej uszkodzone niż u szczurów Wistar (SHR: $0,95 \pm 0,12$ vs $0,51 \pm 0,03$; $p < 0,01$). Interesujące jest, że indeks uszkodzenia kłębuszków dla szczurów SHR na diecie STD zbliżony jest do wartości tego indeksu dla szczurów Wistar na diecie wysokosodowej (Ryc. 12).

4.2.3. Zmiany w obrębie rdzenia nerki – obraz morfologiczny

Rdzeń nerki szczurów Wistar na diecie standardowej w barwieniu hematoksylina-eozyna wykazywał uporządkowaną strukturę odmienną od struktur kory. Wiązki kanalików i naczyń przebiegały w nim równolegle, zbiegając w dół do brodawki nerkowej, a następnie wracając w równie regularny sposób w górę, do kory. Wyraźne rozgraniczenie między zewnętrznym a wewnętrznym obszarem rdzenia było łatwo zauważalne w obrazie mikroskopowym.

W obrębie rdzenia dało się wyróżnić trzy rodzaje struktur. Ściany grubych odcinków kanalików złożone były z komórek o morfologii zbliżonej do korowych odcinków kanalików (komórki sześciennie z centralnie położonym okrągłym jądrem). Cienkie odcinki kanalików charakteryzowały komórki o objętości znacznie mniejszej niż komórki ścian grubego odcinka, z położonym peryferyjnie jądrem o kształcie lekko wydłużonym, lecz zbliżonym w przekroju do koła. Trzecią kategorią struktur były naczynia włosowate, których ściany zbudowane były z pojedynczej warstwy komórek śródbłonkowych – silnie spłaszczonych o przecinkowatych jądrach (Ryc. 10b, 10c).

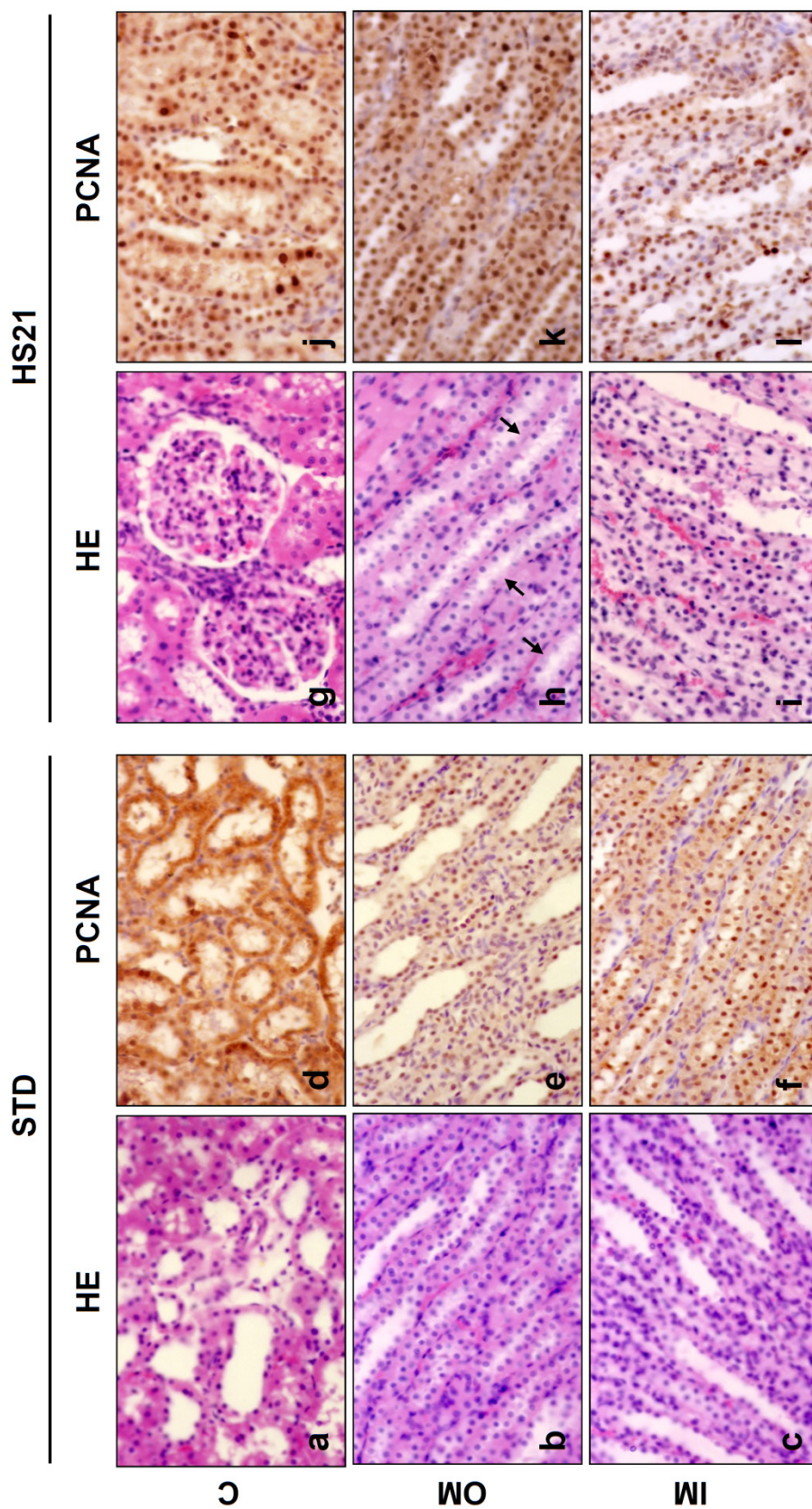
Różnice w stopniu wyznakowania przeciwko PCNA były widoczne już przy niewielkich powiększeniach – granica między rdzeniem zewnętrznym a wewnętrznym

rysowała się jeszcze wyraźniej, bowiem zewnętrzny obszar rdzenia zawierał znacznie więcej jąder wyznakowanych. Dało się wyraźnie odróżnić blade, niewyznakowane pasma naczyń krwionośnych. Jądra wyznakowane przeciwko PCNA występowały stosunkowo licznie w ścianach kanalików (w porównaniu z korą), jednakże nie w ścianach naczyń (Ryc. 10e, 10f).

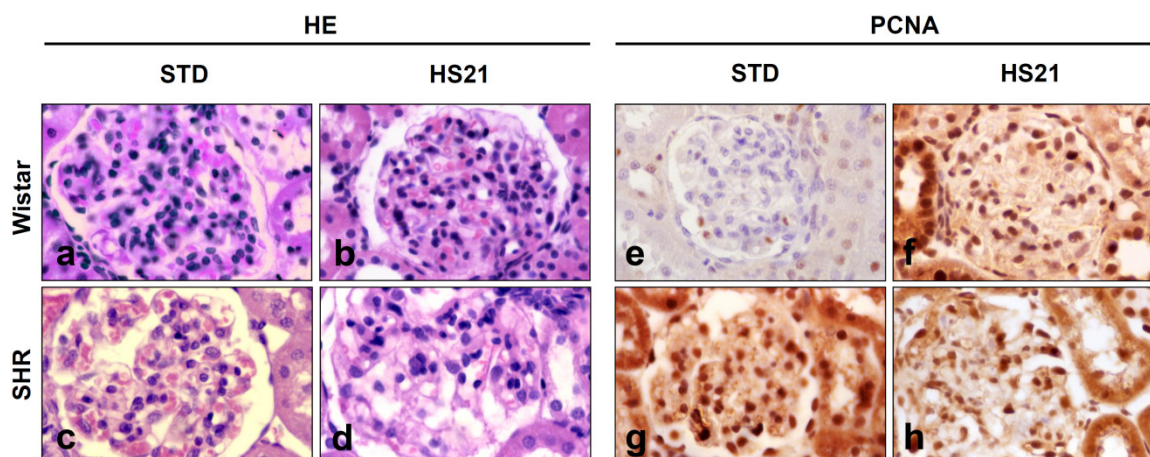
Dieta wysokosodowa zwiększała u szczurów Wistar stopień wypełnienia naczyń krwionośnych krwią w obydwu obszarach rdzenia (Ryc. 10h, 10i). Dodatkowo w ścianach kanalików obserwowano lokalny ubytek komórek (Ryc. 10h, strzałki). Zwiększenie podaży sodu równocześnie wiązało się ze wzrostem liczby jąder wyznakowanych przeciwko PCNA. Różnica wyznakowania rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego nadal była widoczna, lecz nie tak wyraźnie (Ryc. 10k, 10l).

Obszar rdzenia zewnętrznego (OM) u szczurów SHR na diecie standardowej cechowały liczne obrzmienia, zamykające światło kanalików. Przekrwienia, które u szczurów Wistar pojawiły się po diecie wysokosodowej, tu obserwowane były nawet bez podwyższonej podaży sodu w diecie (Ryc. 13b, 13c). Liczba jąder wyznakowanych przeciwko PCNA była znaczna (Ryc. 13e, 13f), z tym, że w obrębie rdzenia wewnętrznego (IM) w grupie jąder wyznakowanych dominowały przecinkowate jądra komórek śródbłonkowych naczyń. Ponadto w rdzeniu wewnętrznym wyraźnie zarysowywało się przerzedzenie tkanki oraz liczne ubytki komórek w ścianie kanalików (Ryc. 13f, strzałki).

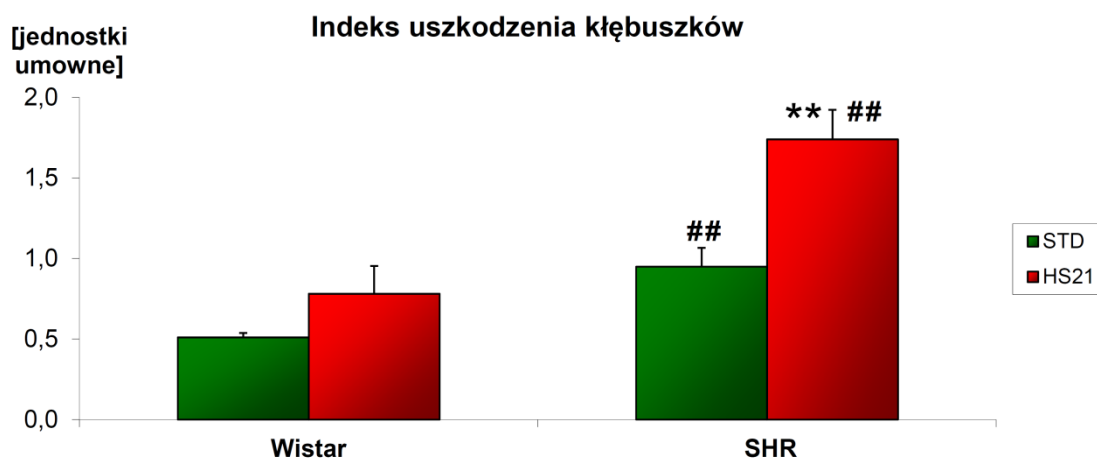
W wyniku zwiększonej podaży sodu struktury rdzenia nerek szczurów SHR ulegały dalszym uszkodzeniom; znajdowano np. liczne kanaliki o cienkich ścianach z miejscowym ubytkiem komórek (Ryc. 13h, strzałki). Rdzeń zewnętrzny charakteryzował się dość przerzedzoną strukturą (Ryc. 13h). Obserwowane u szczurów Wistar na diecie standardowej pasma naczyń z niewyznakowanymi jądrami u szczurów SHR na tej samej diecie występowały rzadziej, a tworzące je naczynia miały cienkie ściany. Przecinkowate jądra były wyznakowane przeciwko PCNA (Ryc. 13k). W rdzeniu wewnętrznym natomiast wyznakowane były głównie okrągłe jądra komórek ścian kanalików (Ryc. 13l). Pomędzy kanalikami przeważały niewyznakowane okrągłe jądra, prawdopodobnie jądra komórek śródmiąższu.



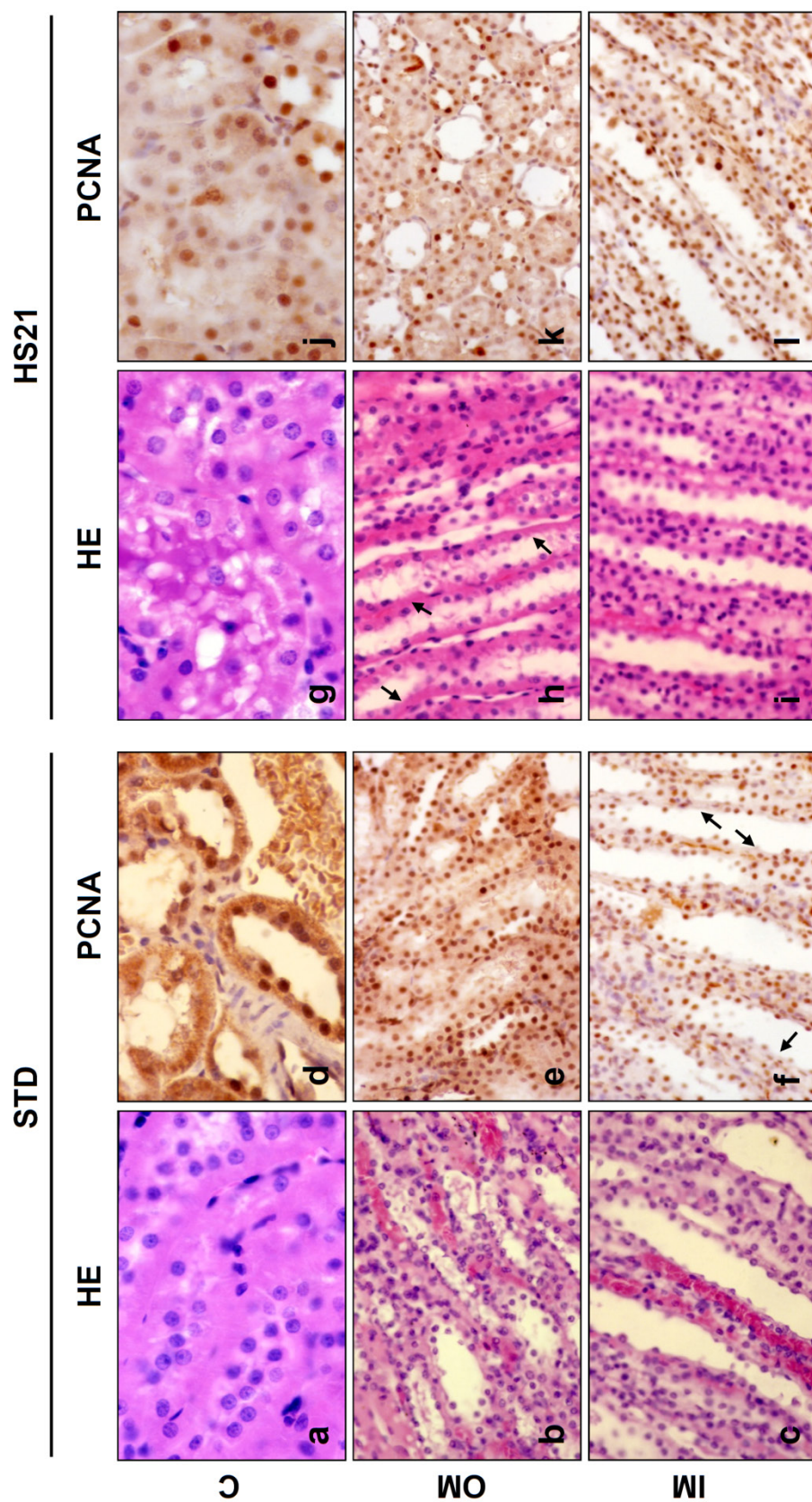
Ryc. 10. Wpływ diety wysokosodowej na morfologię nerki u szczurów stada Wistar. Powiększenie 100x. HE – barwienie hematoksylina-eozyna, PCNA – znakowanie przeciwciałem jądrowemu antygenowi komórek proliferujących. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy $n = 5$. a-c – poszczególne warstwy nerki wykazują uporządkowaną strukturę z krętą siecią kanalików (kora, C), która przybiera postać równoległych wiązek kanalików i naczyń w warstwach głębszych (oba obszary rdzenia, rdzeń zewnętrzny OM; rdzeń wewnętrzny, IM); d – jądra struktur korowych pozostają niewyznakowane przeciwciałem PCNA; e, f – znaczny udział wyznakowanych przeciwciałem PCNA jąder komórek ścian kanalików, jądra śródbłonka pozostają niewyznakowane; g-i – w strukturach nerek pojawiają się lokalne przekrwienia i ubytek komórek kanalików (strzałki); j-l – liczba jąder wyznakowanych przeciwciałem PCNA znacznie wzrasta po diecie wysokosodowej.



Ryc. 11. Zmiany w morfologii kłębuszków nerkowych w zależności od podaży sodu w diecie u szczurów Wistar i SHR. Powiększenie 200x. HE – barwienie hematoksyliną-eozyna, PCNA – znakowanie przeciwno jądrowemu antygenowi komórek proliferujących. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy $n = 5$. a – prawidłowy kłębuszek; b – lekko obkurczony kłębuszek z pojedynczymi wakuolami; c, d – uszkodzenia kłębuszków u szczurów SHR są obecne niezależnie od diety, po diecie HS zniszczenia są pogłębione; e – komórki prawidłowego kłębuszka nie ulegają wyznakowaniu przeciwno PCNA; f – liczne wyznakowane przeciwno PCNA jądra komórkowe różnych struktur kłębuszka; g, h – znakowanie przeciwno PCNA u szczurów SHR jest pozytywne niezależnie od diety.



Ryc.12. Stopień uszkodzenia szczurzych kłębuszków nerkowych w zależności od podaży sodu w diecie. ** – różnica istotna w obrębie stada, ## – różnica istotna w obrębie diety ($p < 0,01$). Skala uszkodzenia: od 0 (0% uszkodzonej powierzchni kłębuszków) do 4 (100% uszkodzonej powierzchni kłębuszków). Liczebność każdej grupy: $n = 5$ (z każdego zwierzęcia oceniono stan 50 kłębuszków wybranych losowo).

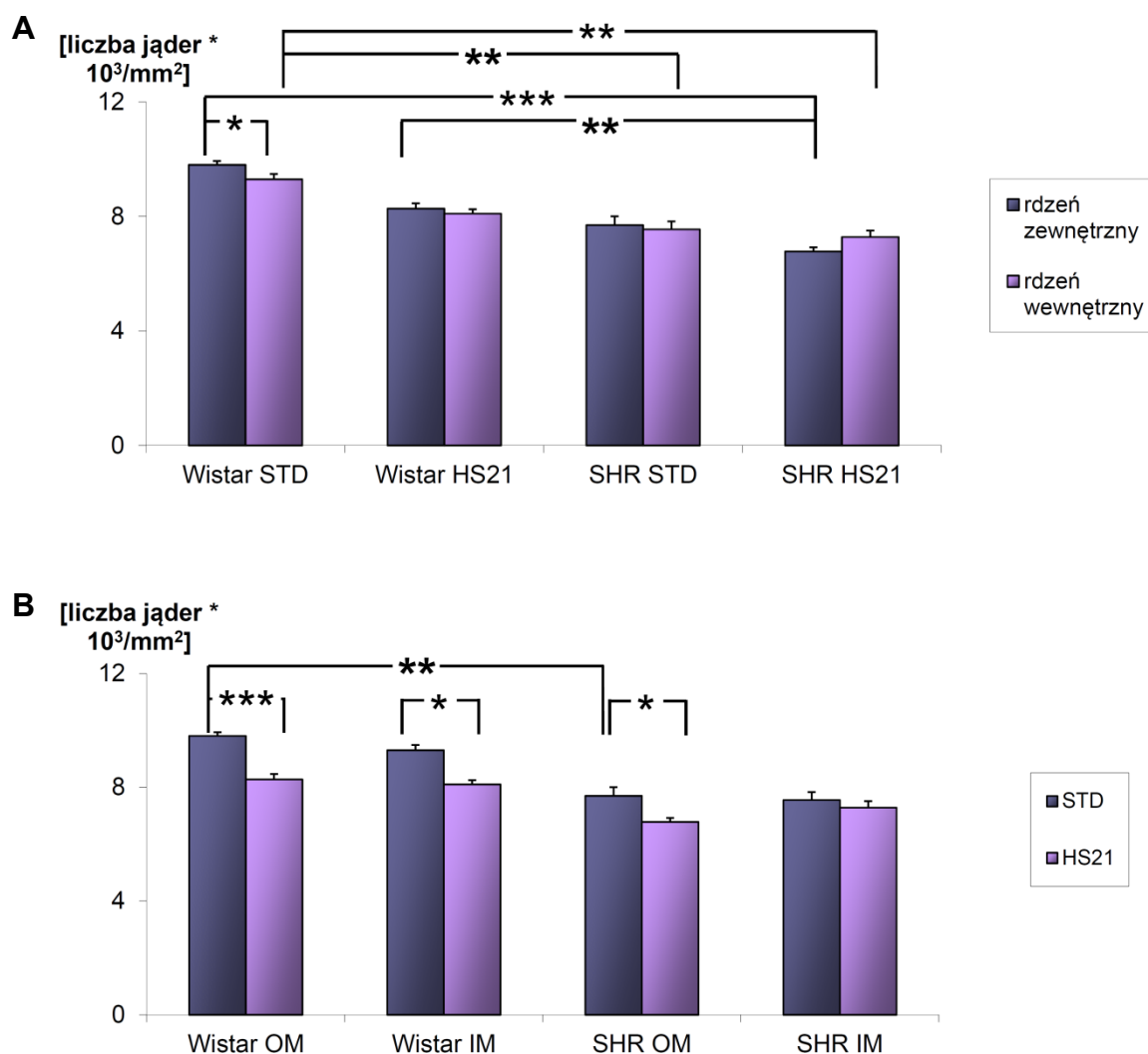


Ryc. 13. Wpływ diety wysokosodowej na morfologię nerki u szczurów stada SHR. Powiększenie 100x. HE – barwienie hematoksylina-eoazyne, PCNA – znakowanie przeciwciała jądrowemu antygenowi komórek proliferujących. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy $n = 5$. a – obrzmienie struktur kory; b, c – liczne rozdęte kanaliki, obszary przekrwień; d – komórki z jądrami wyznakowanymi przeciwciałem PCNA pojawiają się w ścianach kanalików, ale nie w środku; e, f – znaczny udział jąder wyznakowanych przeciwciałem PCNA w obydwu warstwach rdzenia, jednak ich liczba jest większa w rdzeniu zewnętrznym (OM); g – obraz kory pogorszony po diecie; h, i – ubytek komórek w ścianach kanalików; j – liczba jąder wyznakowanych przeciwciałem PCNA znacznie wzrasta; k, l – brak wyraźnych różnic w wyznakowaniu przeciwciałem PCNA w obrębie struktur rdzenia wewnętrznego (IM).

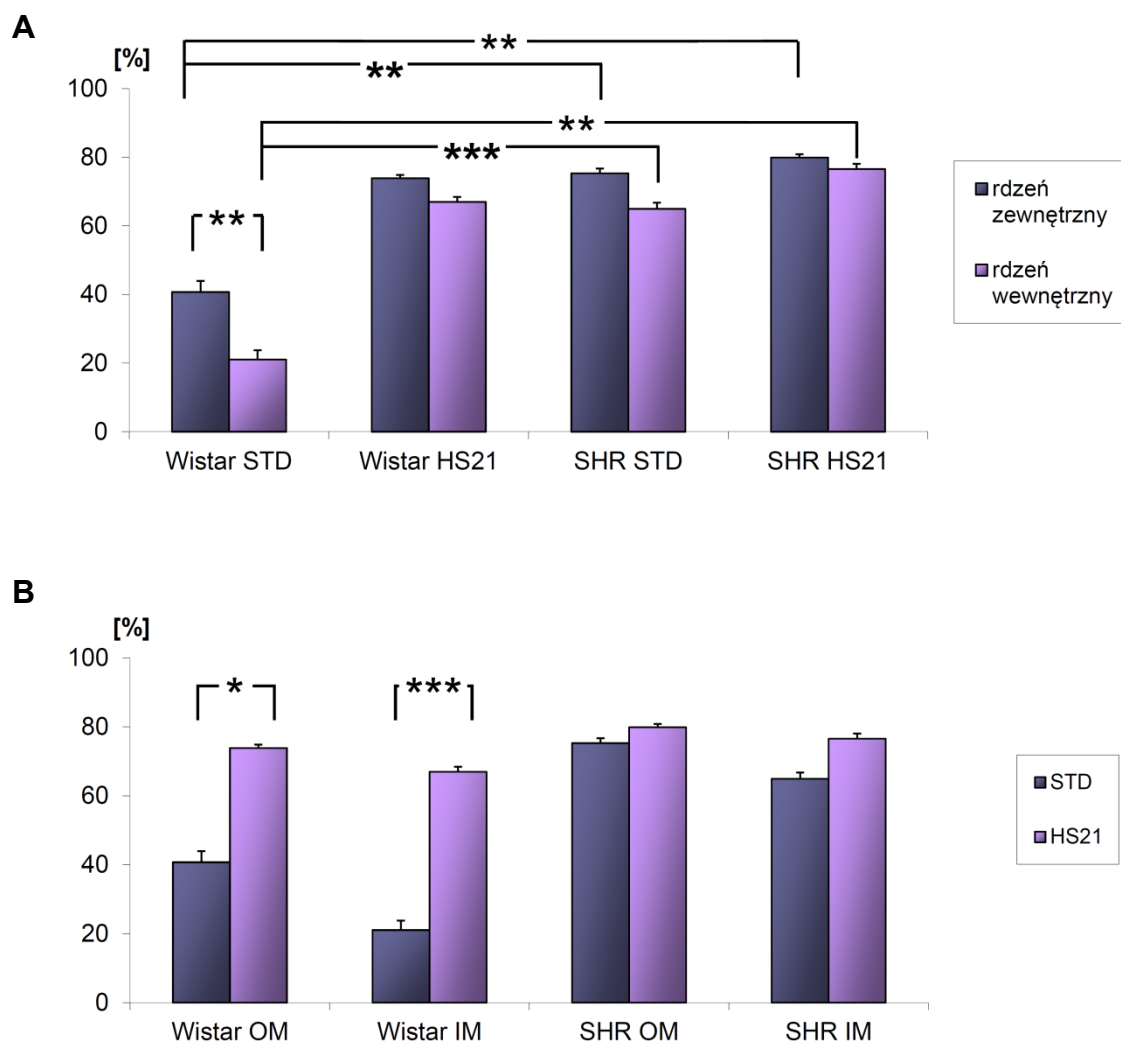
4.2.4. Liczebność jąder i indeks jąder wyznakowanych przeciwko PCNA – rdzeń zewnętrzny i wewnętrzny

Ze wszystkich czterech grup tylko szczury Wistar na diecie STD cechowała różnica ogólnej liczby jąder komórkowych (wszystkich zliczonych razem, bez względu na różnice morfologiczne) pomiędzy rdzeniem zewnętrznym a wewnętrznym (9809 ± 130 jąder/ mm^2 vs 9304 ± 184 jąder/ mm^2 ; $p < 0,05$; Ryc. 14A). Również tylko w tej grupie rdzeń zewnętrzny różnił się od rdzenia wewnętrznego odsetkiem jąder wyznakowanych przeciwko PCNA ($41 \pm 3\%$ vs $21 \pm 3\%$; $p < 0,01$; Ryc. 15A). Po diecie wysokosodowej u szczurów Wistar obserwowano obniżenie liczby jąder w obydwu strefach rdzenia (OM do wartości 8278 ± 188 jąder/ mm^2 ; $p < 0,001$; IM do wartości 8102 ± 153 jąder/ mm^2 ; $p < 0,05$; Ryc. 14B). Wzrastał też znacznie udział jąder wyznakowanych przeciwko PCNA w ogólnej puli jąder (OM do wartości $74 \pm 1\%$; $p < 0,05$; IM do wartości $67 \pm 1\%$; $p < 0,001$). Szczury SHR na dietę wysokosodową reagowały w odmienny sposób: obniżenie ogólnej liczby jąder dotyczyło tylko rdzenia zewnętrznego (6783 ± 142 jąder/ mm^2 dla SHR HS21 vs 7701 ± 308 jąder/ mm^2 dla SHR STD; $p < 0,05$), w rdzeniu wewnętrznym obserwowano jedynie pewną tendencję do takiego zróżnicowania. Udział jąder wyznakowanych przeciwko PCNA w ogólnej puli jąder również nie ulegał wyraźnej zmianie w obydwu warstwach, zaznaczała się tylko lekka tendencja wzrostowa (Ryc. 15B).

Na diecie STD szczury Wistar charakteryzowały się większą liczbą jąder w obydwu obszarach rdzenia niż szczury SHR (9809 ± 130 jąder/ mm^2 dla Wistar STD OM vs 7701 ± 308 jąder/ mm^2 dla SHR STD OM; $p < 0,001$; 9304 ± 184 jąder/ mm^2 dla Wistar STD IM vs 7554 ± 280 jąder/ mm^2 dla SHR STD IM; $p < 0,01$; Ryc. 14A). Pomimo, że dieta wysokosodowa obniżała stosunek liczby jąder obydwu obszarów rdzenia niezależnie od stada, nadal rysowała się różnica między szczurami Wistar i SHR; te pierwsze po diecie wysokosodowej miały w dalszym ciągu więcej jąder komórkowych na 1 mm^2 skrawka rdzenia zewnętrznego niż SHR (Wistar HS21 OM 8278 ± 188 vs SHR HS21 OM 6783 ± 142 ; $p < 0,01$). Podobną tendencję obserwowano w rdzeniu wewnętrznym (Ryc. 14A).



Ryc. 14. Liczebność jąder komórkowych – porównanie obszaru rdzenia zewnętrznego (OM) i wewnętrznego (IM) (A), porównanie wpływu wysokiej podaży sodu w diecie (B). Porównania statystyczne: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,001$. Liczba $n = 5$ dla każdej z czterech grup (w obszarach OM i IM zliczano jądra z dziesięciu pól widzenia o powierzchni ok. $66\ 150\ \mu\text{m}^2$ każde).**



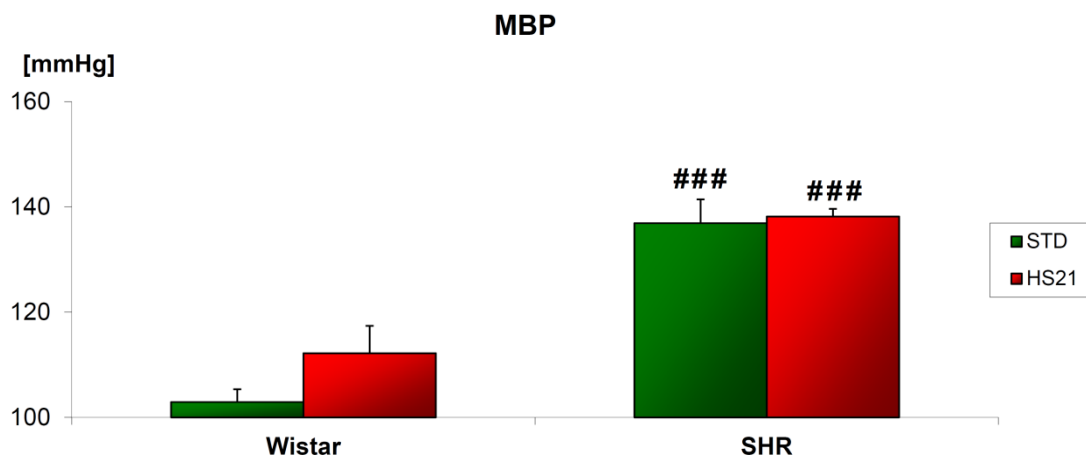
Ryc. 15. Udział jąder wyznakowanych przeciwko PCNA w ogólnej liczbie jąder – porównanie obszaru rdzenia zewnętrznego (OM) i wewnętrznego (IM) (A), porównanie wpływu wysokiej podaży sodu w diecie (B). Porównania statystyczne zostały wykonane na wartościach absolutnych. Wszystkie oznaczenia jak na Ryc. 14.

4.3. Doświadczenia ostre – parametry hemodynamiczne

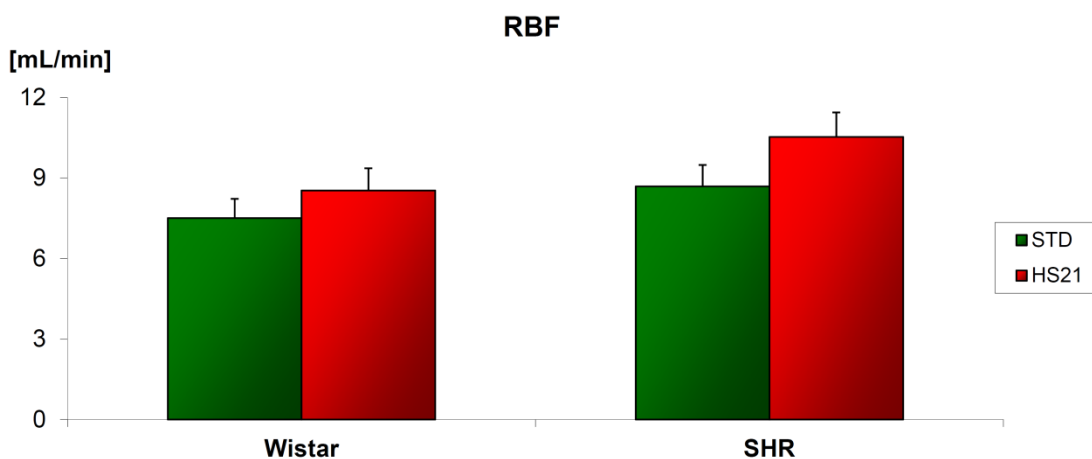
Średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP) mierzone w aorcji u SHR, bez względu na dietę, było znacznie wyższe niż u szczurów Wistar (137 ± 5 vs. 103 ± 2 vs dla STD; 138 ± 1 vs. 112 ± 5 mmHg dla HS21; $p < 0,001$; Ryc. 16). Podobnie przepływ korowy (CBF) u SHR na diecie standardowej był znamienne wyższy niż u szczurów Wistar (665 ± 61 PU vs 589 ± 40 PU; $p < 0,01$; Ryc. 18), mimo że masa nerki i przepływ całkowity (RBF) – wielkości, od których przepływ korowy powinien być zależny – u obydwu grup były zbliżone. Szczury SHR na podwyższonej podaży sodu zareagowały niewielkim obniżeniem CBF, podczas gdy u szczurów Wistar pozostał on na zbliżonym poziomie (Ryc. 18) W obydwu stadach zaobserwowano niewielki wzrost RBF (Ryc. 17).

Dieta wysokosodowa obniżyła stosunek ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego niezależnie od stada (Ryc. 19A), jednakże jest to wynik zmiany różnych składowych tego stosunku; u szczurów Wistar jest to głównie spowodowane wzrostem ukrwienia rdzenia wewnętrznego, podczas gdy u SHR następstwem obniżenia ukrwienia rdzenia zewnętrznego (Ryc. 19B). Obniżenie stosunku ukrwienia różnych warstw rdzenia postępowało wraz z długością stosowania diety ($1,16 \pm 0,20$ dla STD, $1,03 \pm 0,20$ dla HS10, $0,84 \pm 0,12$ dla HS21, $0,7 \pm 0,13$ dla HS28; $r = -0,35$, $p < 0,05$; Ryc. 20).

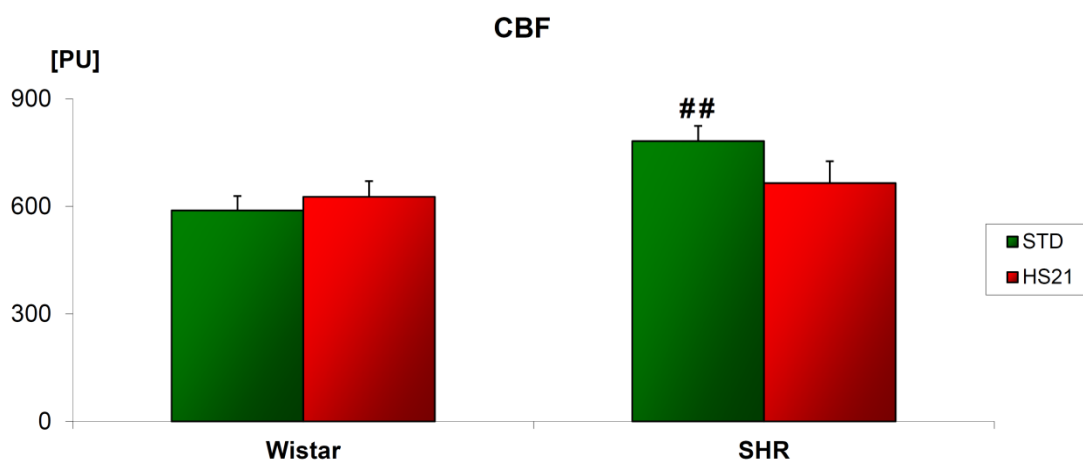
Ponieważ pomiar ukrwienia rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego wykonywano niezależnymi sondami, by potwierdzić wiarygodność otrzymanego związku pomiędzy długością trwania diety a obniżeniem się stosunku OMBF/IMBF wykonano serię doświadczeń na szczurach Wistar, w których obydwie przepływy mierzone były tą samą sondą przesuwaną za pomocą mikromanipulatora między pożądanymi warstwami. Uzyskane wyniki były zbliżone do tych obliczonych na podstawie pomiarów dokonanych niezależnymi sondami. Co więcej, szczury Wistar o wydłużonej długości diety wysokosodowej do 28 dni wykazywały jeszcze głębszy spadek stosunku OMBF/IMBF niż szczury Wistar po diecie HS21 ($1,22 \pm 0,19$ dla STD, $0,75 \pm 0,04$ dla HS21, $0,59 \pm 0,23$ dla HS28; Ryc. 21A). Stosunek ukrwienia obu obszarów rdzenia również wykazywał ujemną korelację z czasem trwania diety (dla pomiarów dwiema sondami: $r = -0,35$; $p < 0,05$; dla pomiarów jedną sondą: $r = -0,77$; $p < 0,05$; Ryc. 21B, 22B).



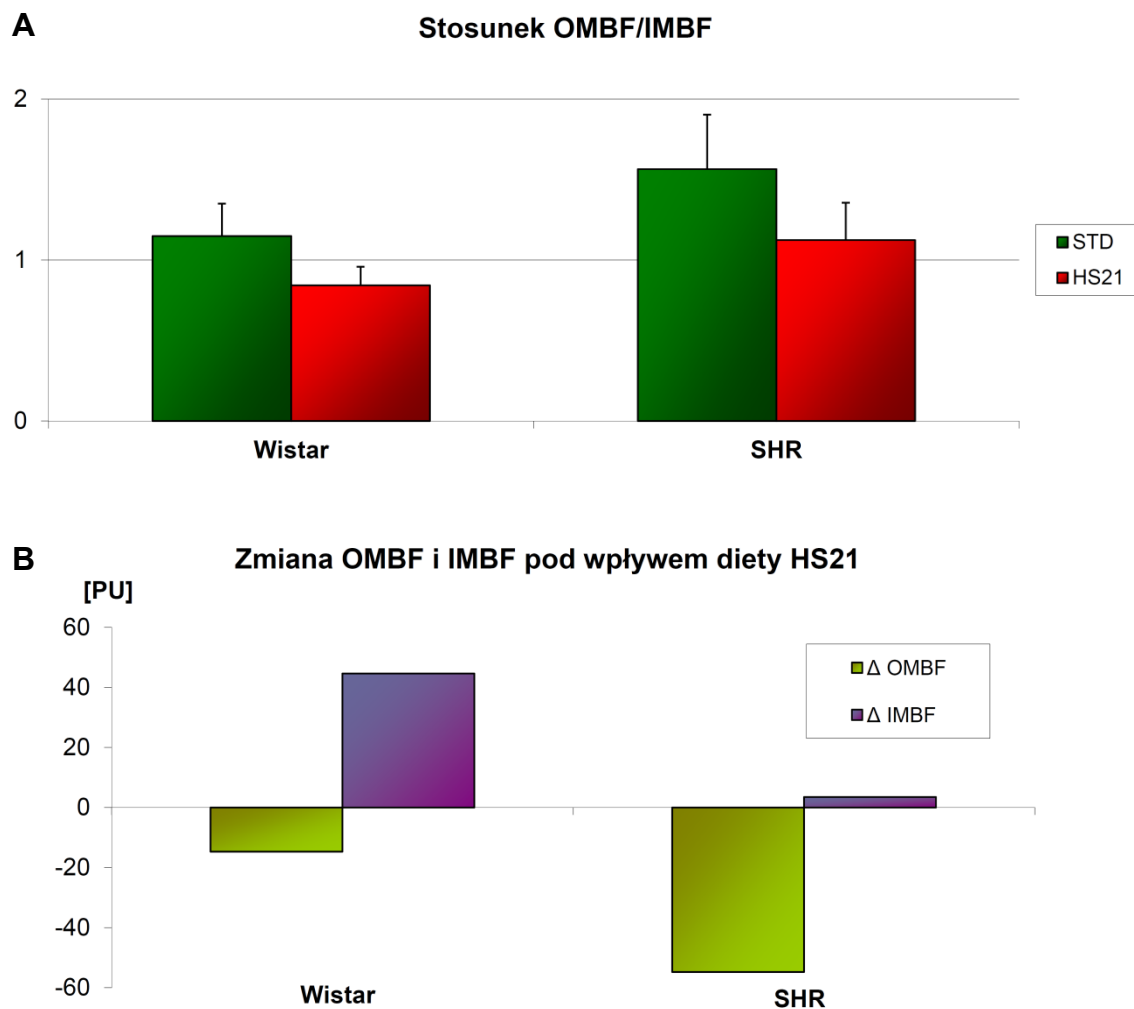
Ryc. 16. Wpływ diety wysokosodowej na średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP) u szczurów w narkozie. ### – istotna różnica między grupami SHR i Wistar w obrębie tej samej diety ($p < 0,001$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 12$, Wistar HS21 $n = 11$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 6$.



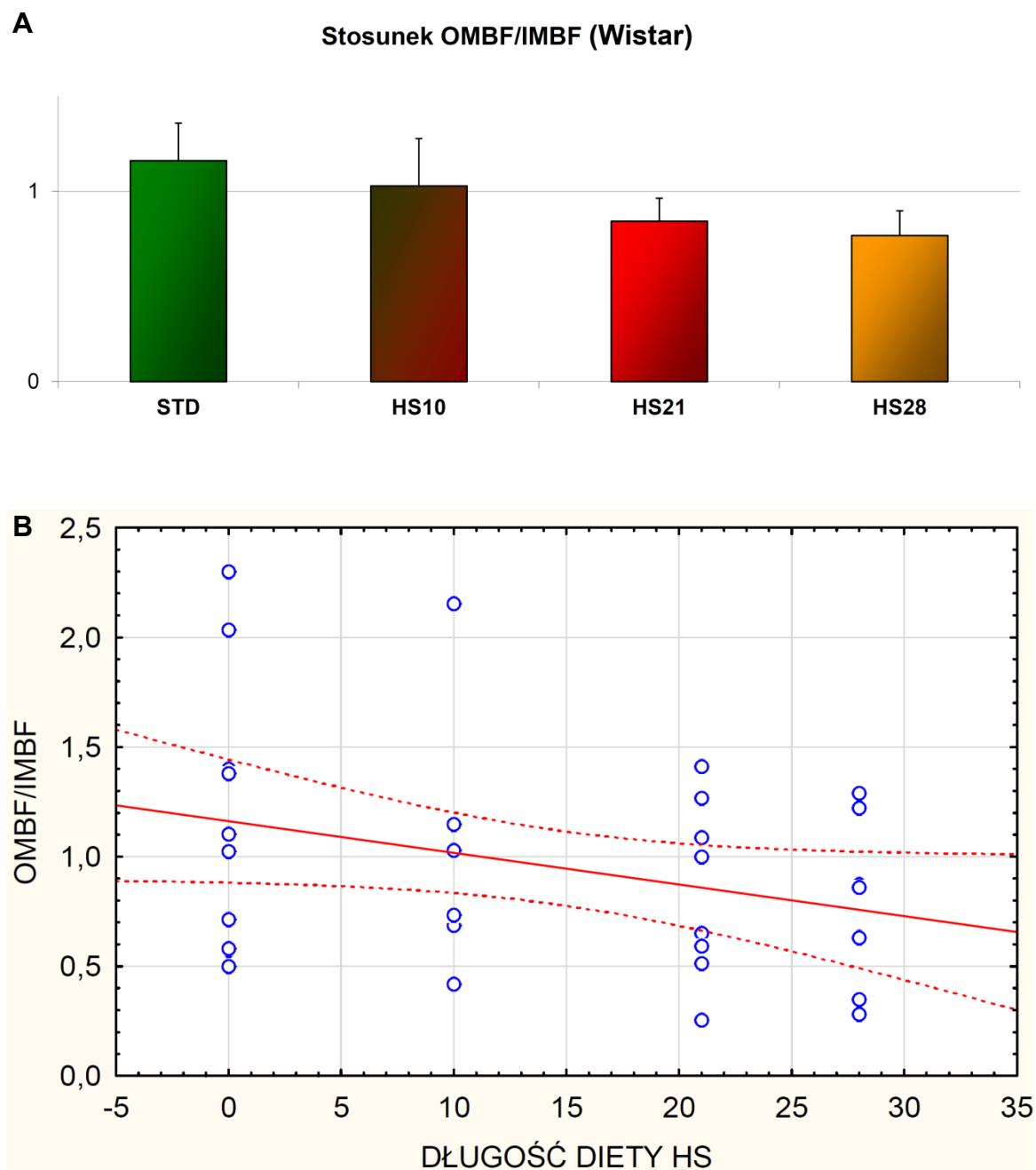
Ryc. 17. Wpływ zwiększonej podaży sodu w diecie na całkowity przepływ krwi przez nerkę mierzony u szczurów w narkozie. Liczebność grup: Wistar STD $n = 12$, Wistar HS21 $n = 11$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 6$.



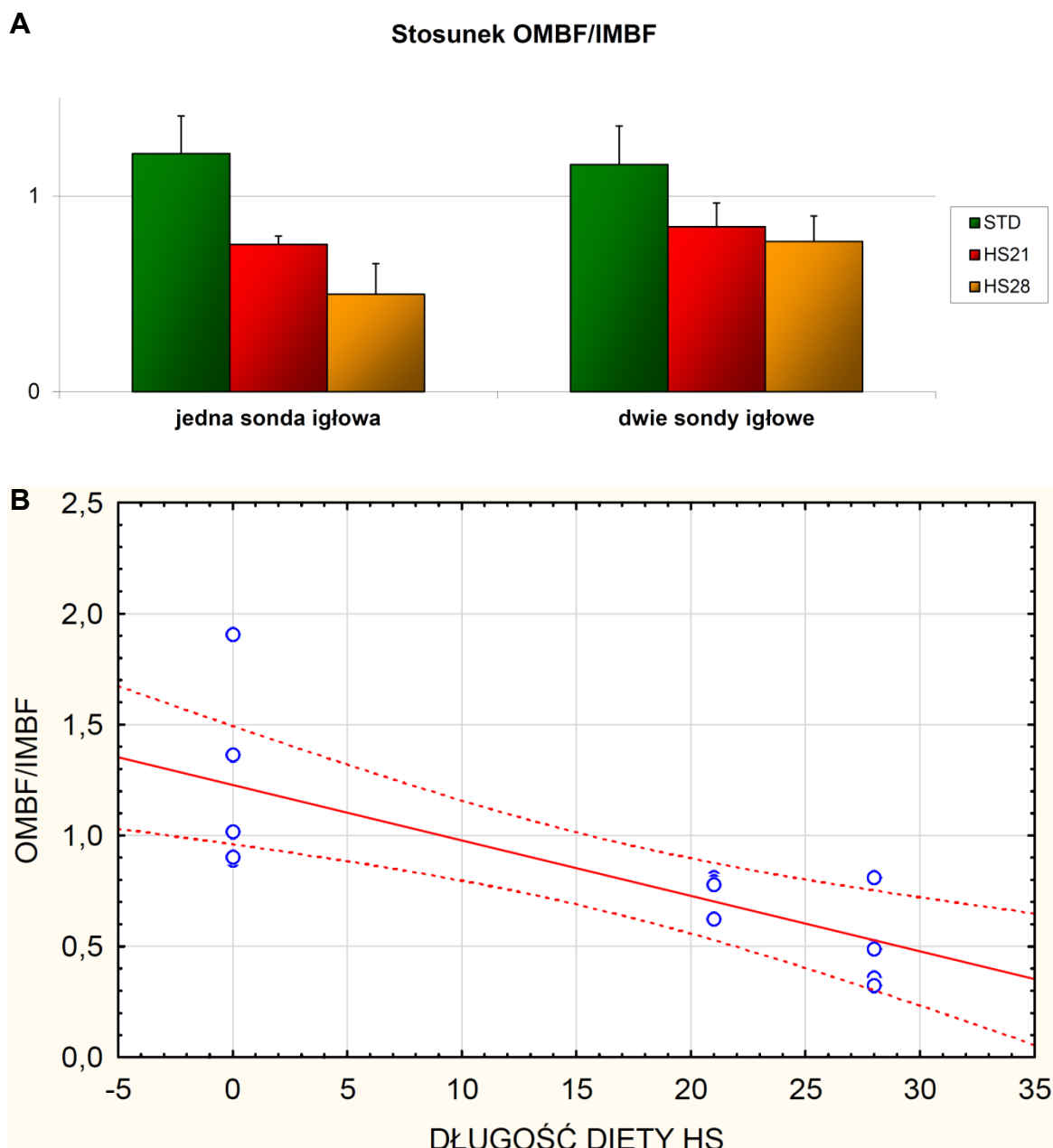
Ryc. 18. Wartości przepływu krwi przez korę nerki w zależności od rodzaju diety. ## – SHR vs Wistar ($p < 0,01$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 12$, Wistar HS21 $n = 11$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 6$.



Ryc. 19. Charakterystyka ukrwienia róznych obszarów rdzenia nerki – stosunek ukrwienia rdzenia zewnêtrznego (OMBF) do wewnêtrznego (IMBF) (A), kierunki zmian w ukrwieniu róznych stref rdzenia nerki w zale¿noœci od diety wysokosodowej (B). Liczebnoœć grup: Wistar STD n = 10, Wistar HS21 n = 10, SHR STD n = 10, SHR HS21 n = 6.



Ryc. 20. Zmiany w proporcjach ukrwienia dwóch obszarów rdzenia w zależności od długości trwania diety wysokosodowej. Oba parametry wykazują korelację ($r = -0,35$; $p < 0,05$). Wartości dla grupy STD potraktowano jako dzień 0 diety HS. Linia ciągła na wykresie B przedstawia linię trendu, linie przerywane – przedział ufności (0,95). Liczebność grup: STD $n = 10$, HS10 $n = 6$, HS21 $n = 10$, HS28 $n = 8$.



Ryc. 21. Porównanie stosunku ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego (OMBf/IMBF) uzyskanego z pomiarów przeprowadzonych jedną lub dwiema niezależnymi sondami igłowymi u szczurów stada Wistar (A) oraz korelacja zmian w zależności od długości diety (B). Szczury utrzymywane były na diecie standardowej (STD), wysokosodowej przez 21 (HS21) lub 28 (HS28) dni. Parametry dla pomiarów dwiema sondami igłowymi są tożsame z Ryc. 20A. Korelację dla nich przedstawia Ryc. 20B. Korelacja dla pomiarów wykonanych jedną sondą przedstawia wykres 21B: stosunek OMBf/IMBF mierzony jedną sondą igłową wykazuje korelację z długością diety wysokosodowej ($r = -0,77$; $p < 0,05$). Wartości dla grupy STD potraktowano jako dzień 0 diety HS. Linia ciągła na wykresie B przedstawia linię trendu, linie przerywane – przedział ufności (0,95). Liczebność grup: STD $n = 5$, HS21 $n = 4$, HS28 $n = 5$ (dla pomiarów wykonywanych za pomocą jednej sondy igłowej); STD $n = 10$, HS21 $n = 10$, HS28 $n = 8$ (dla pomiarów wykonywanych za pomocą dwóch sond igłowych).

4.4. Doświadczenie ostre – parametry wydalinicze

Zwiększona podaż sodu w diecie nasilała także procesy wydalinicze, prowadząc u obydwu stad zwierząt do zwiększenia diurezy (V), wydalania sodu (U_{NaV}) i ogółu substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$; Rys. 22). SHR zareagowały na dietę znacznie bardziej wzmożonym wydalaniem wody ($13,3 \pm 3,9 \mu\text{L}/\text{min}$ vs $6,7 \pm 1,0 \mu\text{L}/\text{min}$; $p < 0,05$; Ryc. 22A) i większym wzrostem wydalania sodu ($4,03 \pm 1,15 \mu\text{mol}/\text{min}$ vs $1,88 \pm 0,40 \mu\text{mol}/\text{min}$; $p < 0,05$; Ryc. 22B) niż szczury Wistar. Warto zwrócić uwagę, że wydalanie sodu u szczurów SHR było już wyjściowo dwukrotnie wyższe niż u szczurów Wistar ($0,18 \pm 0,03 \mu\text{mol}/\text{min}$ vs $0,09 \pm 0,01 \mu\text{mol}/\text{min}$; $p < 0,01$).

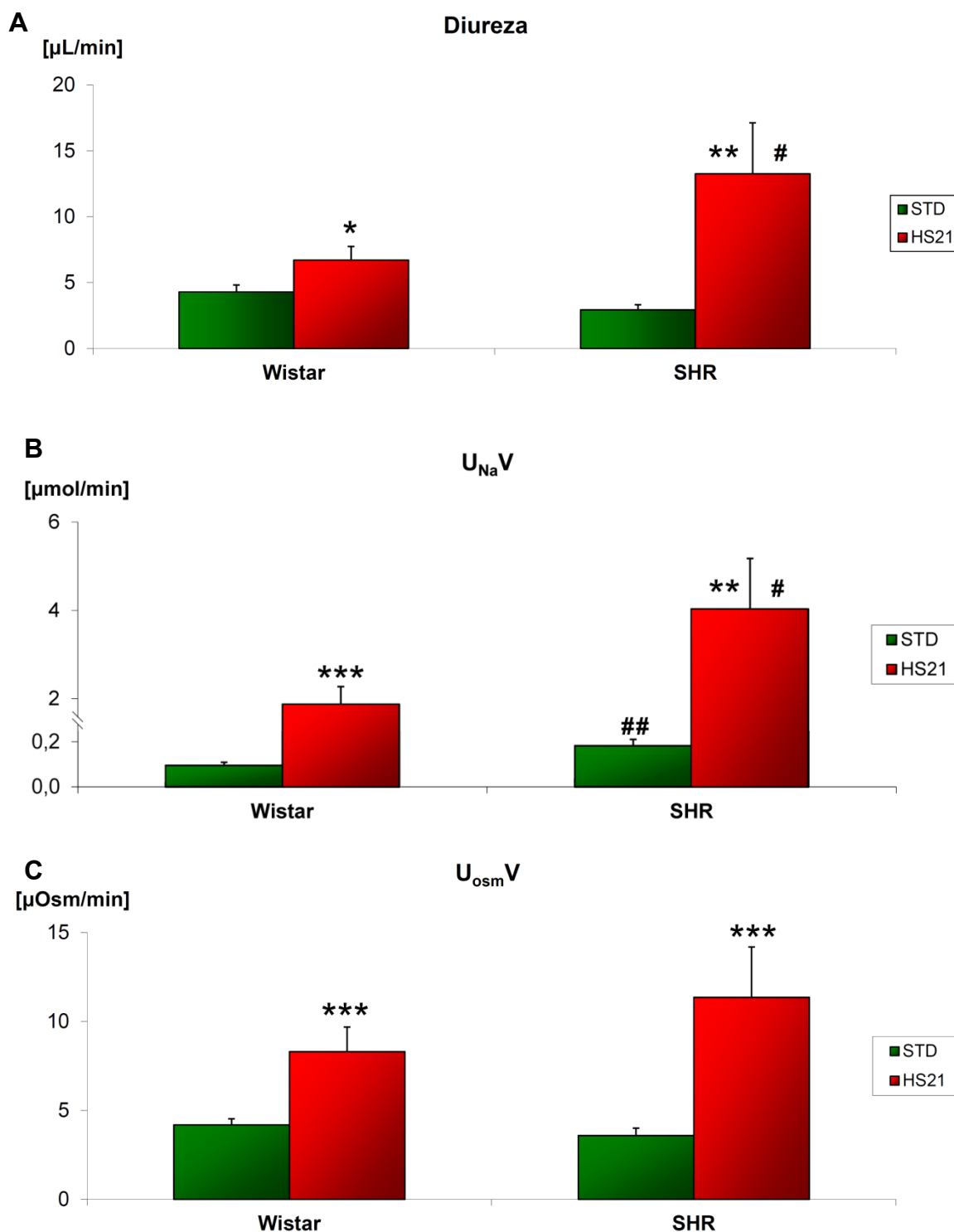
4.5. Analiza osocza i moczu z wykorzystaniem testów ELISA

Zastosowanie testu ELISA do oznaczenia stężenia NGAL pozwoliło stwierdzić, że wydalanie tego związku nie zmienia się wyraźnie pod wpływem diety (Ryc. 23B). Jego stężenie w osoczu było wyższe u szczurów SHR po diecie wysokosodowej niż u szczurów Wistar na tej samej diecie ($210 \pm 12 \text{ U}/\text{mL}$ vs $138 \pm 18 \text{ U}/\text{mL}$; $p < 0,01$; Ryc. 23A).

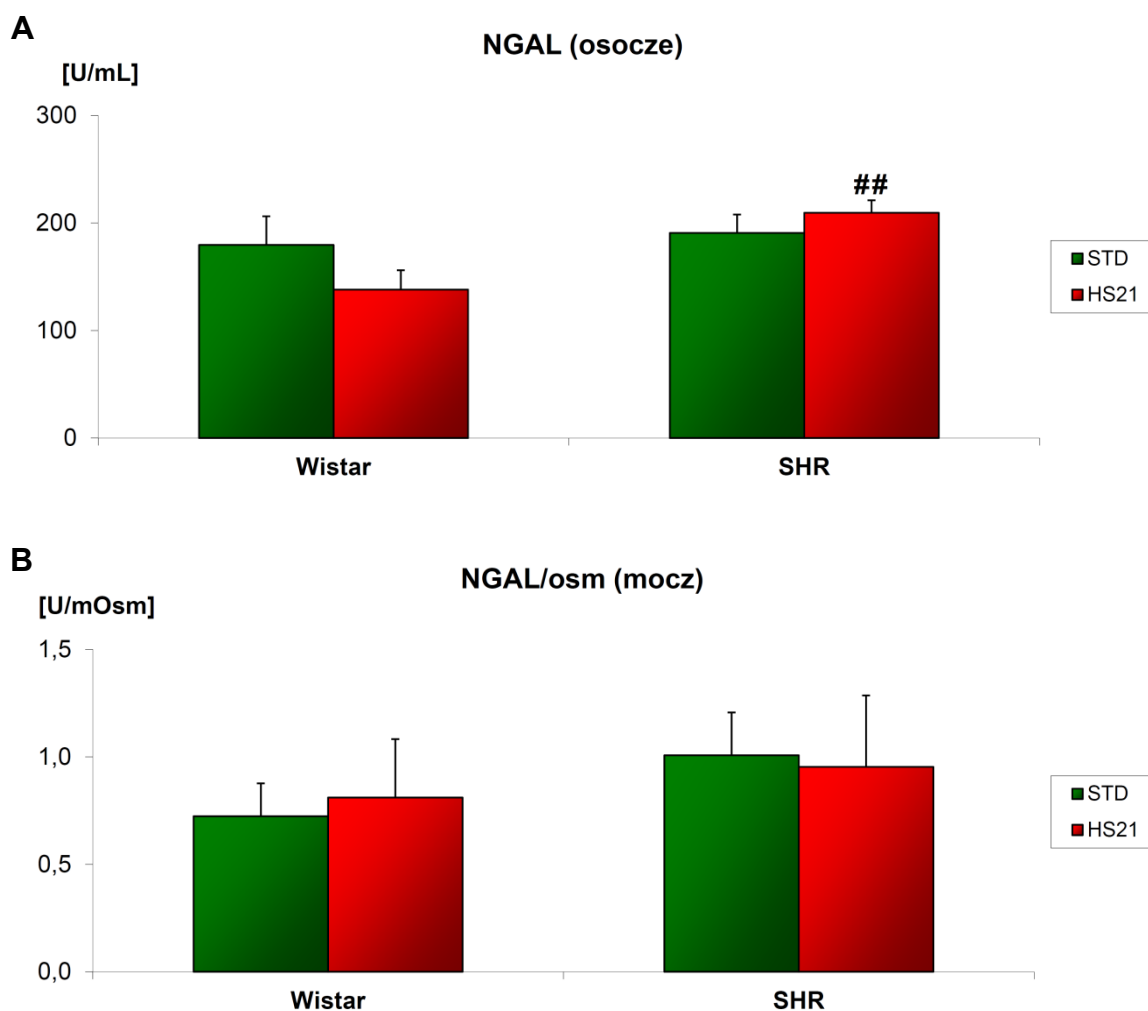
Dieta wysokosodowa podwyższyła znacznie poziom metabolitów tlenu azotu (NO_2/NO_3) w osoczu zarówno u szczurów Wistar, jak i SHR (Ryc. 24A). Zmiany tej nie obserwowano w moczu (Ryc. 24B).

Oznaczenie stężenia wolnej frakcji 8-izoprostanu (8-izoprostaglandyny $\text{F}_2\alpha$) w osoczu wykonano wyłącznie dla szczurów Wistar przebywających na diecie wysokosodowej 10, 21 lub 28 dni. Wolny 8-izoprostan osiągał najwyższe stężenie w osoczu u szczurów po 10 dniach diety HS, po czym wracał do wartości zbliżonych dla grupy kontrolnej (Ryc. 25).

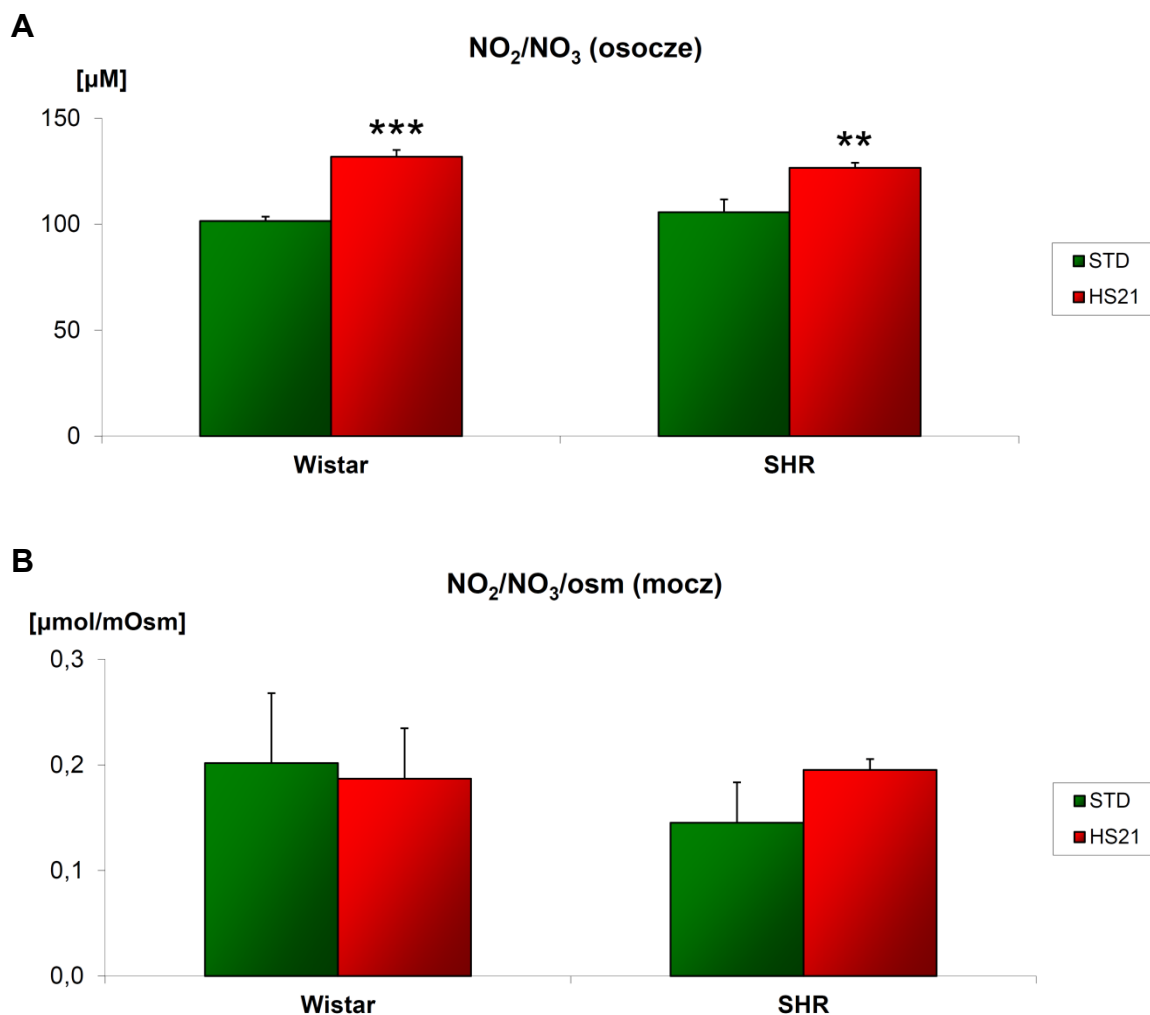
Wysoka podaż sodu pociągała za sobą bardziej intensywne wydalanie VEGF-A w moczu u szczurów z obydwu stad. Jednakże przy podobnych wartościach kontrolnych (u zwierząt na diecie STD) wzrost ten był znacznie większy u szczurów SHR niż Wistar ($16,61 \pm 1,77 \text{ ng}/\text{mOsm}$ vs $7,63 \pm 3,83 \text{ ng}/\text{mOsm}$; $p < 0,05$; Ryc. 26). Wydalanie VEGF-A pozostawało w silnej korelacji z indeksem uszkodzenia kłębuszków ($r = 0,67$; $p < 0,02$; Ryc. 27).



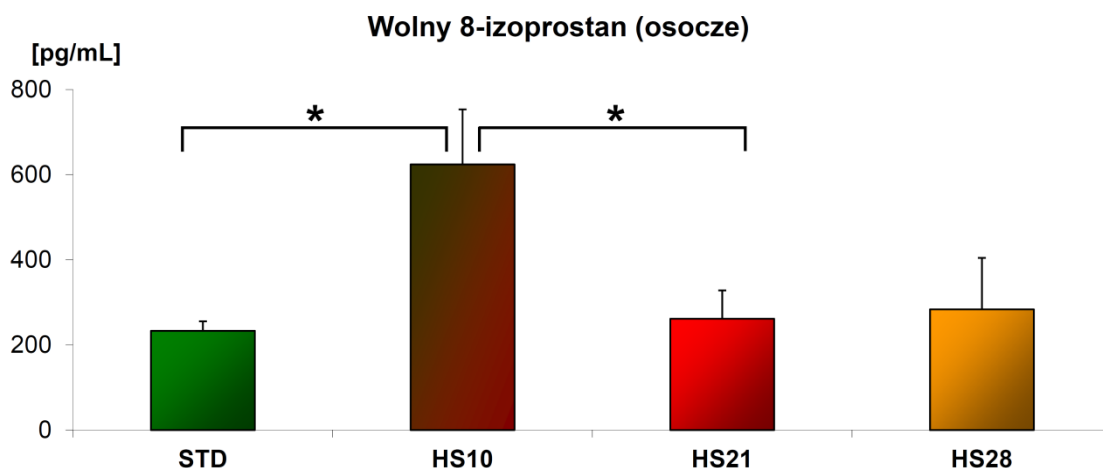
Ryc. 22. Wpływ wysokiej podaży sodu w diecie na wydalanie nerkowe u szczurów Wistar i SHR – wydalanie wody, diureza (A), wydalanie jonów sodu, $U_{Na}V$ (B) i ogółu substancji osmotycznie czynnych, $U_{osm}V$ (C). * – istotnie różne od wartości uzyskanych na diecie STD ($p < 0,001$ dla szczurów Wistar, $p < 0,01$ dla SHR), # – istotnie różne od wartości uzyskanych dla szczurów Wistar ($p < 0,01$ dla diety STD, $p < 0,05$ dla diety HS). Liczebność grup: Wistar STD $n = 22$, Wistar HS21 $n = 9$, SHR STD $n = 10$, SHR HS21 $n = 6$.



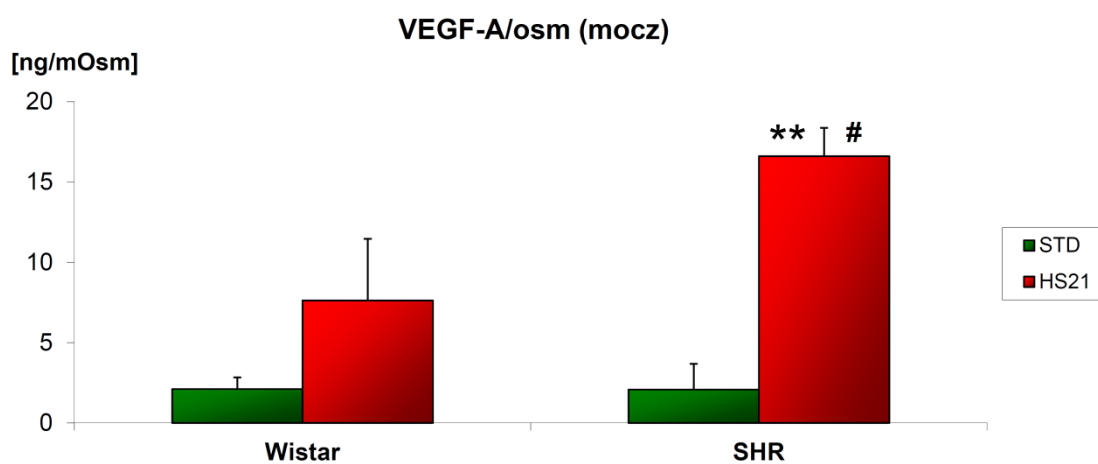
Ryc. 23. Zawartość NGAL (ang. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*) w osoczu (A) i moczu (B) w zależności od podaży sodu w diecie (test ELISA). Wartości dla moczu ustandaryzowano poprzez przeliczenie na osmolalność próbek. ## – SHR HS21 vs Wistar HS21 ($p < 0,01$). Liczebność każdej grupy: $n = 5$.



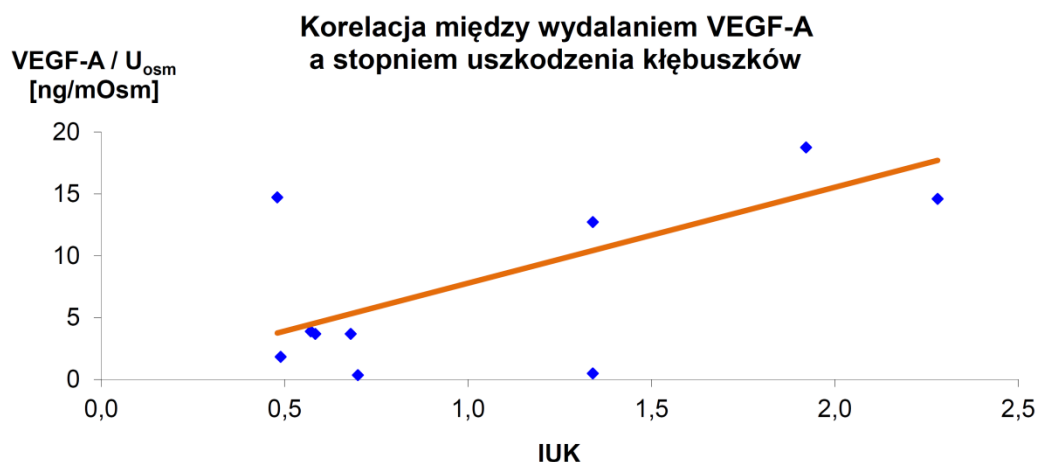
Ryc. 24. Zawartość metabolitów NO w osoczu (A) i moczu (B) w zależności od podaży sodu w diecie (test ELISA). Wartości dla moczu ustandaryzowano poprzez przeliczenie na osmolalność próbki. ** – STD vs HS21 ($p < 0,01$). Liczebność każdej grupy: $n = 5$.



Ryc. 25. Stężenie wolnej frakcji 8-izoprostanu (8-izoprostaglandyny F_{2α}) w osoczu szczurów Wistar w zależności od długości stosowania diety HS. * – wartość znamienne wyższa niż wartości dla diety STD i HS21 ($p < 0,05$). Liczebność grup $n = 4$.



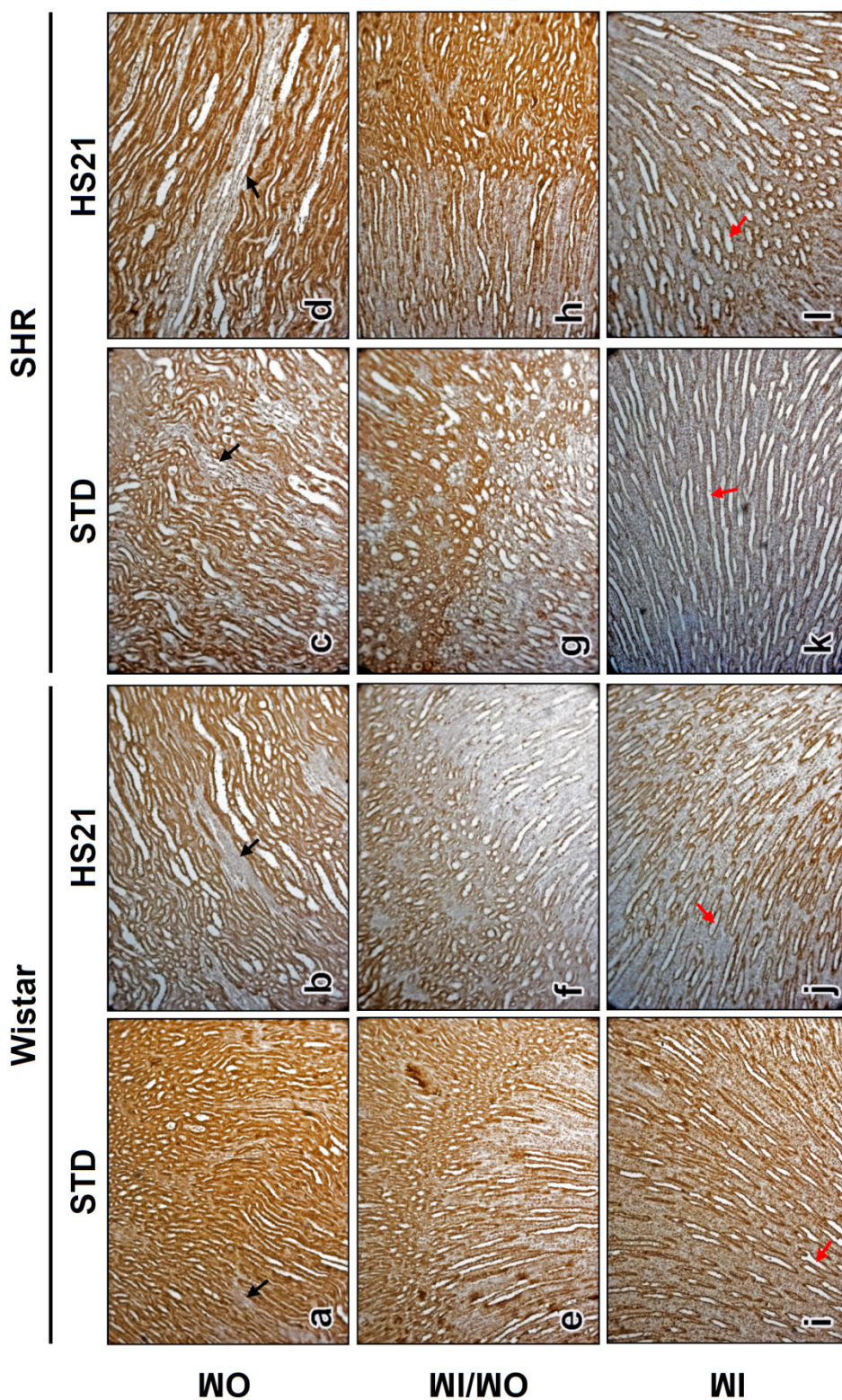
Ryc. 26. Zawartość VEGF-A w moczu w zależności od podaży sodu w diecie (test ELISA) ustandaryzowana poprzez przeliczenie na osmolalność moczu (U_{osm}). * – STD vs HS21, # - Wistar vs SHR ($p < 0,05$). Liczebność grup: Wistar STD $n = 5$, Wistar HS21 $n = 4$, SHR STD $n = 2$, SHR HS21 $n = 4$.



Ryc. 27. Korelacja pomiędzy wydalaniem VEGF-A (Ryc. 20) a indeksem uszkodzenia kłębuszków (Ryc. 8). $r = 0,67$, $p < 0,02$.

4.6. Znakowanie przeciwko VEGF-A wykonane na skrawkach parafinowych

Skrawki parafinowe wykonane z nerek szczurów Wistar wyznakowane zostały z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko VEGF-A. Oglądane w niewielkim powiększeniu uwidaczniały strefową immunoreaktywność: we wszystkich grupach wyznakowanie w obszarze rdzenia zewnętrznego dominowało nad pozostałymi warstwami. Zastosowanie większych powiększeń pozwoliło stwierdzić, że największe różnice pomiędzy czterema grupami dotyczyły rdzenia wewnętrznego. W korze wyznakowane były komórki wszystkich kanalików oraz pojedyncze komórki kłębuszków, natomiast pasma śródmiąższu pozostały niewyznakowane. W obrębie rdzenia zewnętrznego wyznakowanie kanalików przypominało sytuację zaobserwowaną w korze, lecz wiązki naczyń pozostawały niewyznakowane (Ryc. 28a-28d; czarne strzałki wskazują wiązki naczyń). W rdzeniu wewnętrznym niezależnie od grupy wyraźne znakowanie przeciwko VEGF-A obserwowano w komórkach kanalików zbiorczych (Ryc. 28i-28l; czerwone strzałki wskazują przykładowe kanaliki zbiorcze). Tylko w grupie szczurów Wistar na diecie STD pojawiało się wyraźne wyznakowanie części innych wewnątrzrdzeniowych struktur kanalikowych (Ryc. 28i). W ten sposób we wszystkich grupach wyraźnie zarysowana była granica między zewnętrznym a wewnętrznym obszarem rdzenia (Ryc. 28e-28h), co najslabiej dało się zaobserwować w grupie Wistar STD (Ryc. 28i).



Ryc. 28. Obecność białka VEGF-A w nerwie w zależności od podaży sodu w diecie. Powiększenie 100x. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej, OM – rdzeń zewnętrzny, OM/IM granica zewnętrznego i wewnętrznego, IM – rdzeń wewnętrzny. Liczebność każdej grupy $n = 5$. a-d – w OM wszystkich grup widoczne są wyznakowane komórki kanalików, ale nie wiązek naczyń (czarne strzałki); e-h – we wszystkich grupach wyraźnie zarysowuje się różnica między obydwojoma obszarami rdzenia; i – znakowanie przeciwno VEGF-A pojawia się głównie w komórkach kanalików zbiorczych, a także w części pozostałych kanalików; j-l – znakowanie przeciwno VEGF-A widoczne w komórkach kanalików zbiorczych (czerwone strzałki).

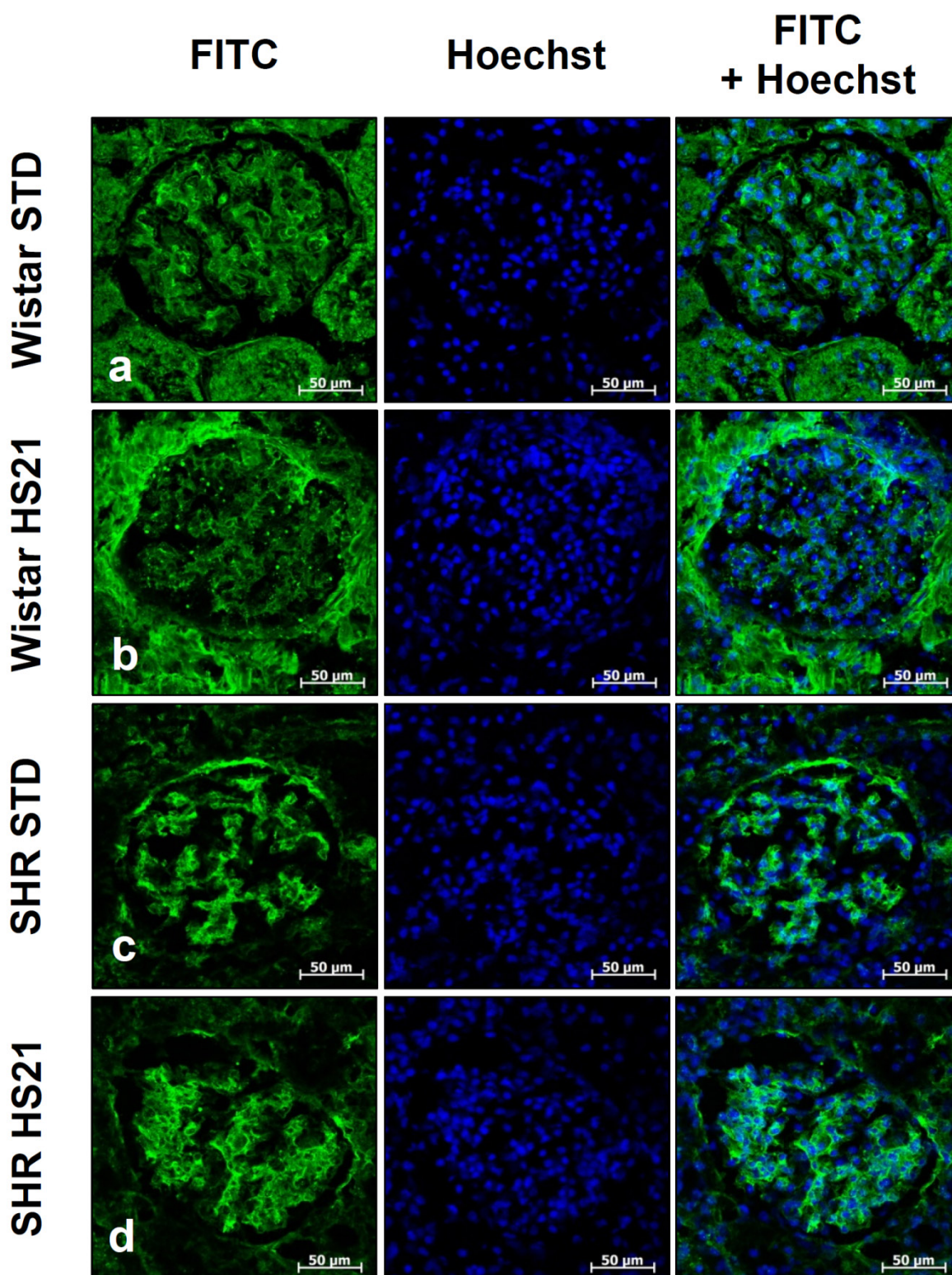
4.7. Zymografia żelatynowa *in situ*

4.7.1. Obserwacje jakościowe

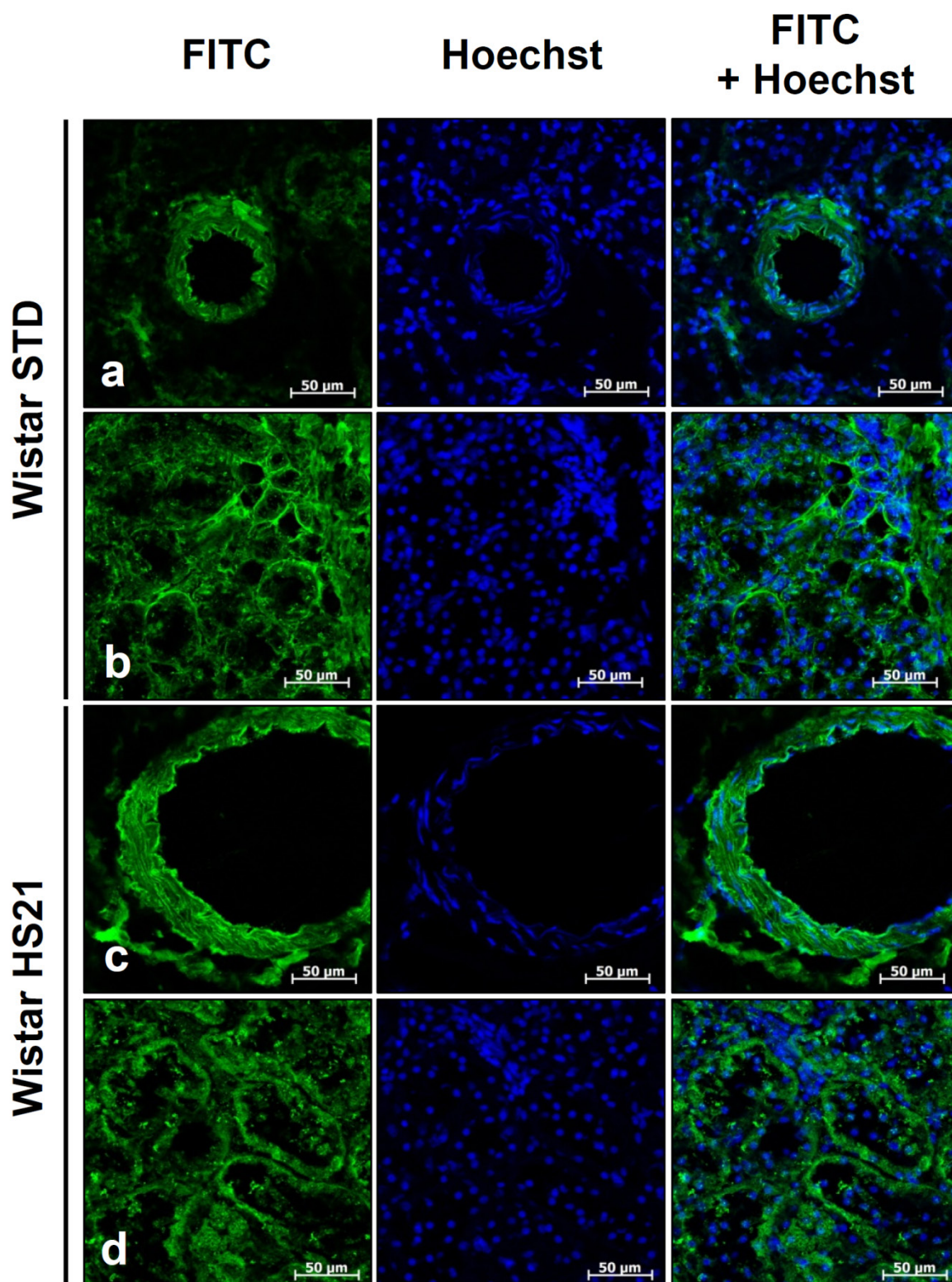
Zymografia żelatynowa *in situ* wykonana na skrawkach mrożeniowych uwidoczniła różnice w aktywności żelatynolitycznej w różnych strukturach trzech warstw nerki. W korze obecna była we wszystkich strukturach naczyniowych, niezależnie od grupy – zarówno w większych naczyniach krwionośnych, prawdopodobnie międzypłatowych i międzypłatikowych (Ryc. 30a, 30c), jak i w sieci tętniczek w kłębuszkach (Ryc. 29). Co interesujące, aktywność w ścianach dużych naczyń była na tyle intensywna, że optymalizacja parametrów rejestracji fluorescencji na przekrój naczynia często skutkowała odcięciem sygnału z okolicznych struktur (Ryc. 30a). Aktywność żelatynolityczna pojawiała się również w innych strukturach nefronu – torebkach niektórych kłębuszków (Ryc. 29) i w znacznej części kanalików (Ryc. 30b, 30d). U szczurów Wistar STD zaobserwowano pojawiającą się lokalnie fluorescencję na obrzeżach jąder komórkowych. Było to jednak zjawisko miejscowe i ograniczone do głębszych warstw kory, tzw. kory przyrdzeniowej. Z kolei u szczurów z grupy Wistar HS21 rzadziej niż w innych grupach udawało się zaobserwować aktywność w pasmach macierzy zewnątrzkomórkowej (Ryc. 30d).

W rdzeniu zewnętrznym we wszystkich czterech grupach zaobserwowano aktywność żelatynolityczną w macierzy zewnątrzkomórkowej, układającą się w charakterystyczne pasma (Ryc. 31). Zarówno u szczurów Wistar STD, jak i SHR STD zdarzała się aktywność jądrowa, jednak innego typu – o ile jądra komórkowe szczurów Wistar STD emitowały fluorescencję całą powierzchnią (Ryc. 31a), w grupie SHR STD obserwowano jedynie wyraźne lokalne wzbudzenia świecenia (Ryc. 31c). Co więcej, aktywność jądrowa u szczurów SHR STD wydawała się bardziej powszechna niż u szczurów Wistar STD (Ryc. 31a). Zarówno u szczurów Wistar, jak i SHR, dieta wysokosodowa zmniejszała ilość przypadków zaobserwowanej aktywności jądrowej – w grupie SHR HS21 została mocno ograniczona (Ryc. 31d), zaś w grupie Wistar HS21 nie zdarzała się w ogóle (Ryc. 31b).

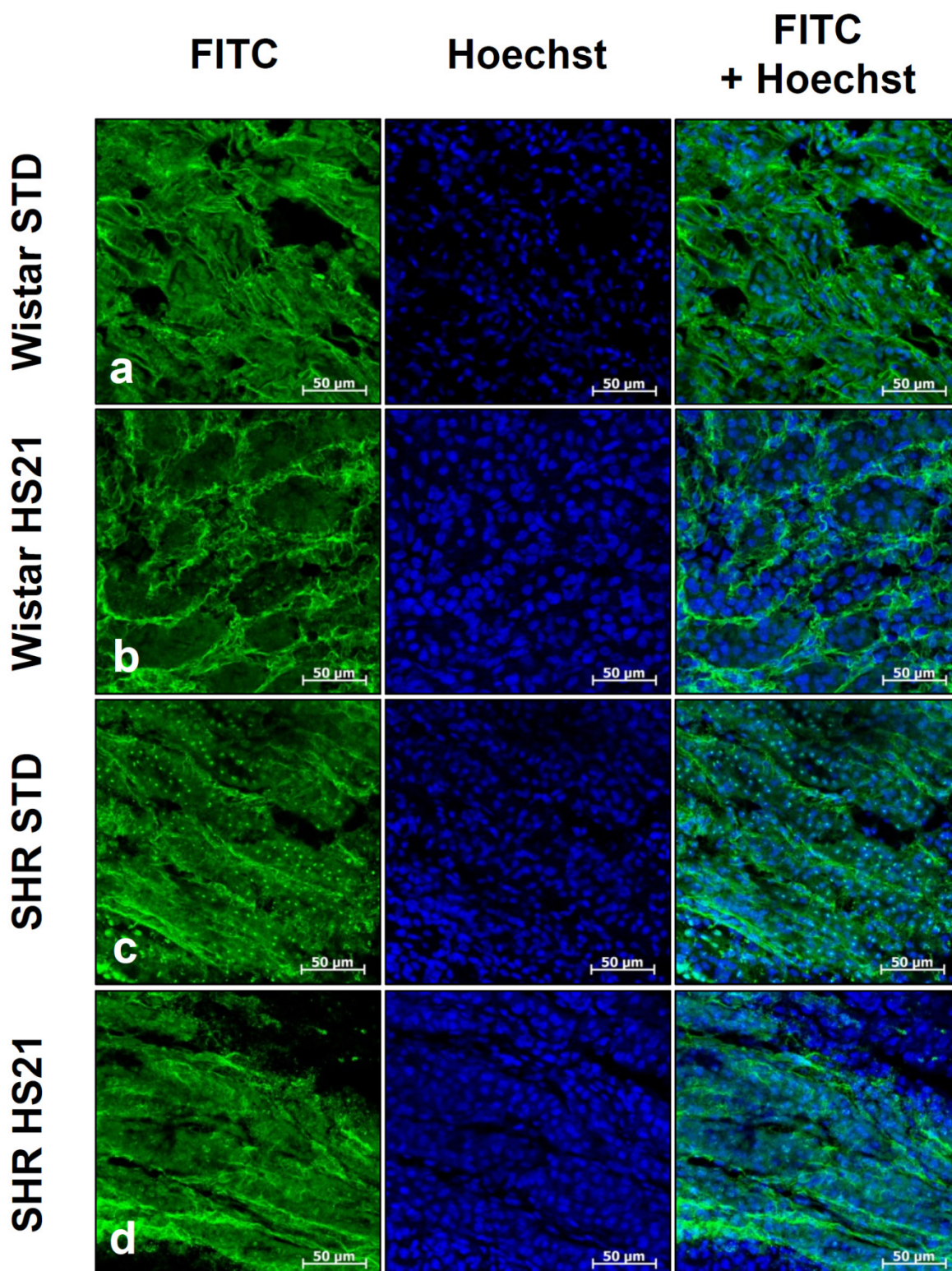
Podobne różnice we wzorze aktywności żelatynolitycznej zaobserwowano w rdzeniu wewnętrznym. Szczury Wistar i SHR na diecie standardowej również cechowała aktywność jądrowa, u szczurów Wistar jednak znacznie bardziej powszechna w rdzeniu



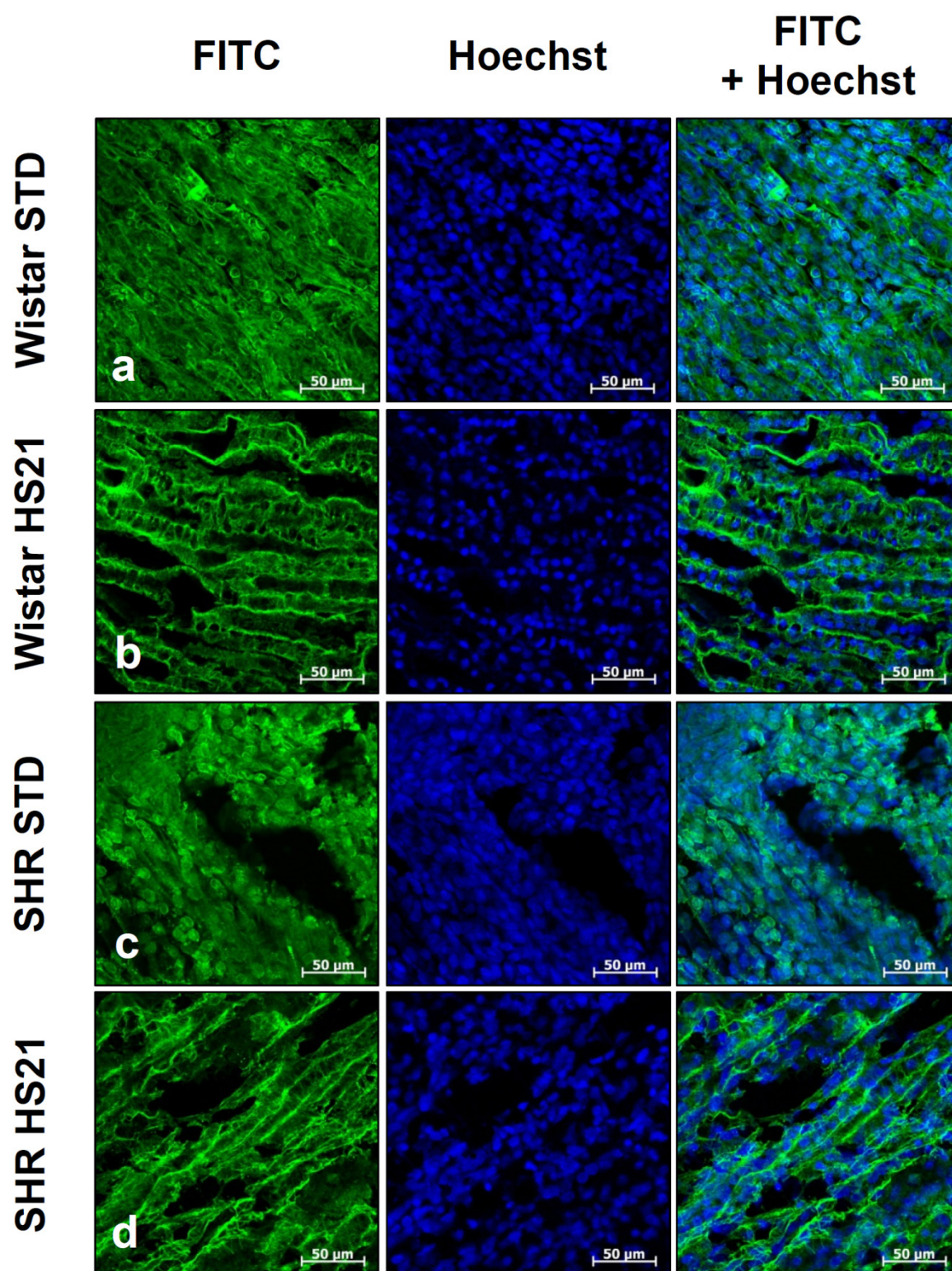
Ryc. 29. Zmiany aktywności żelatynolitycznej w korze nerki (kłębuszki) szczurów z różną podażą sodu w pożywieniu zobrazone za pomocą zymografii żelatynowej *in situ*. Kolor zielony – fluorescencja FITC obrazująca aktywność żelatynolityczną, kolor niebieski – jądra obrazowane z użyciem Hoechst 33258. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy n = 5.



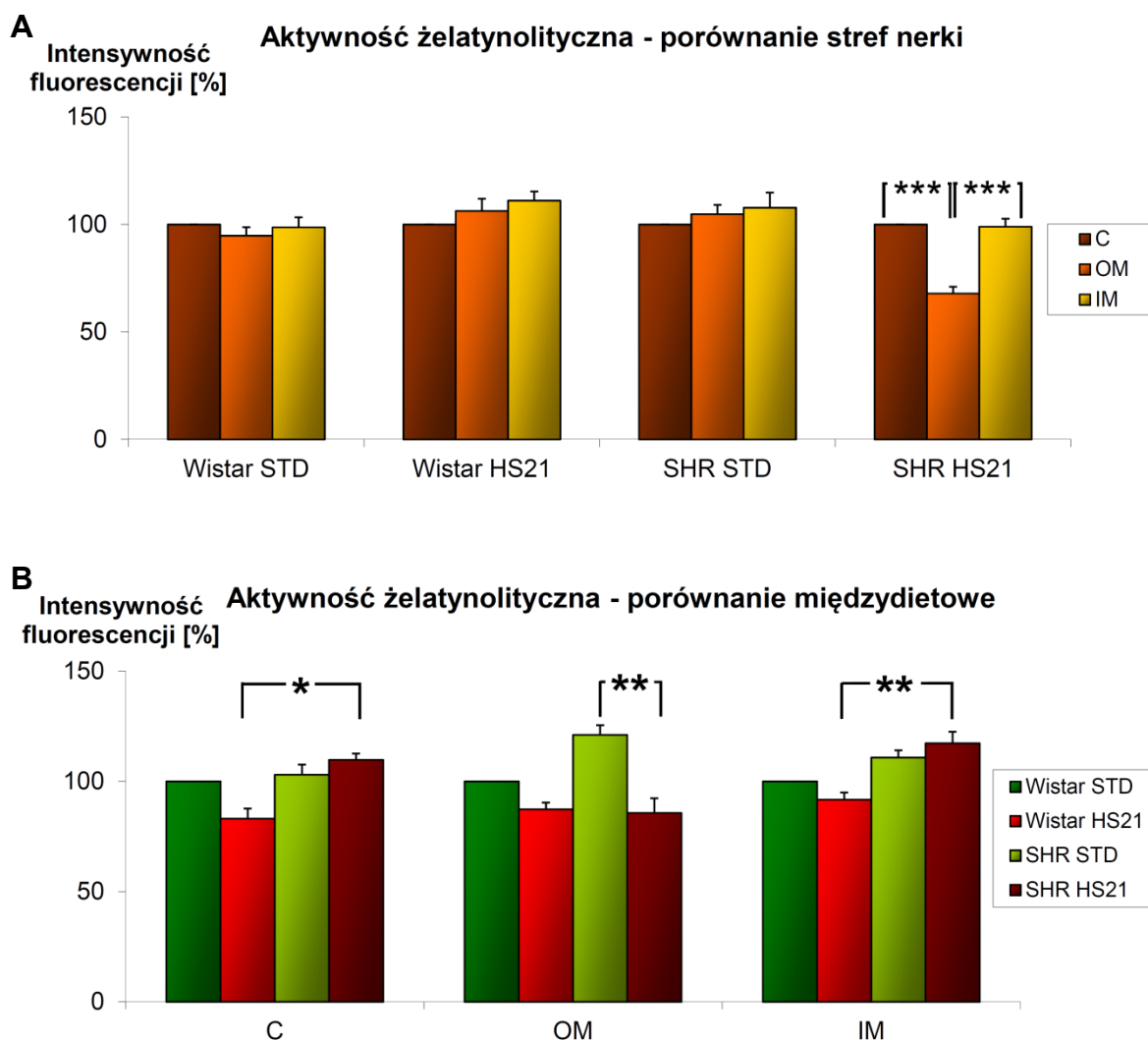
Ryc. 30. Zmiany aktywności żelatynolitycznej w korze nerki (struktury naczyniowe i kanalikowe) szczurów z różną podażą sodu w żywieniu zobrazowane za pomocą zymografii żelatynowej *in situ*. Kolor zielony – fluorescencja FITC obrazująca aktywność żelatynolityczną, kolor niebieski – jądra obrazowane z użyciem Hoechst 33258. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy $n = 5$.



Ryc. 31. Zmiany aktywności żelatynolitycznej w rdzeniu zewnętrznym (OM) nerki szczurów z różną podażą sodu w żywieniu zobrazowane za pomocą zymografii żelatynowej *in situ*. Kolor zielony – fluorescencja FITC obrazująca aktywność żelatynolityczną, kolor niebieski – jądra obrazowane z użyciem Hoechst 33258. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy $n = 5$.



Ryc. 32. Zmiany aktywności żelatynolitycznej w rdzeniu wewnętrznym (IM) nerki szczurów z różną podażą sodu w pożywieniu zobrazowane za pomocą zymografii żelatynowej *in situ*. Kolor zielony – fluorescencja FITC obrazująca aktywność żelatynolityczną, kolor niebieski – jądra obrazowane z użyciem Hoechst 33258. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy n = 5.



Ryc. 33. Zmiany aktywności żelatynolitycznej w różnych obszarach nerki szczurów w zależności od podaży sodu w diecie – porównanie różnych stref nerki w obrębie grup (A), porównanie analogicznych stref nerki między grupami zwierząt (B). Szacowanie półilościowe w oparciu o pomiar intensywności fluorescencji preparatu po wykonaniu zymografii żelatynowej *in situ* i wyrażone procentowo: A – za 100% przyjęto aktywność żelatynolityczną kory danej nerki (słupki brązowe), B – za 100% przyjęto aktywność żelatynolityczną tej samej warstwy nerki u szczurów Wistar STD (słupki zielone). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. STD – dieta standardowa, HS21 – szczury po 21 dniach diety wysokosodowej. Liczebność każdej grupy $n = 5$. Dla każdego szczura zliczano 9 powierzchni z każdej z trzech warstw.

wewnętrznym (Ryc. 32a), niż w rdzeniu zewnętrznym (Ryc. 31a). Zmienił się jednak jej obraz – zarówno w grupie Wistar STD, jak i SHR STD fluorescencję obserwowano wyraźnie na obrzeżach jąder (Ryc. 32a, 32c). Podobnie jak w OM dieta wysokosodowa wpłynęła negatywnie na aktywność żelatynolityczną w tych strukturach, znosząc ją do niewykrywalnego poziomu (Ryc. 32b, 32d). Oprócz aktywności jądrowej, odróżniającej poszczególne strefy nerki, we wszystkich czterech grupach łatwo dostrzegalne były pasma aktywności żelatynolitycznej w macierzy zewnątrzkomórkowej.

Uwaga metodyczna: Długie przechowywanie nerek w -80°C w różnym stopniu ograniczało przydatność tkanki do późniejszej analizy. Uwidaczniało to znakowanie z użyciem Hoechst 33258, który w zdrowych komórkach wbudowuje się do DNA, zaś w uszkodzonych może wiązać się niespecyficznym z różnymi jej elementami. Obserwacje poczynione na skrawkach mrożeniowych pozwoliły stwierdzić, że najszybciej degradującą warstwą nerki jest kora, lecz co interesujące degradacja tkanek kory pojawiała się u szczurów SHR po znacznie krótszym czasie przechowywania niż u szczurów Wistar (niezależnie od diety). W samej preparatyce (przygotowanie skrawków i przeprowadzenie zymografii żelatynowej *in situ*), pojawiał się zupełnie odwrotny problem – kora (bez względu na stopień zachowania) zawsze ściśle przylegała do szkiełek podstawowych, natomiast rdzeń, zwłaszcza jego obszar wewnętrzny, bardzo często ulegał odklejeniu.

4.7.2. Analiza ilościowa

Wyniki opisane w niniejszym akapicie przedstawiono na Ryc. 33 na dwa sposoby. Wykres A prezentuje intensywność fluorescencji wyrażoną jako procent aktywności kory tej samej grupy (brązowe słupki, położone skrajnie od lewej strony). W ten sposób możliwe jest porównanie ze sobą trzech warstw nerek w obrębie każdej z grup. Wykres B przedstawia tę samą intensywność fluorescencji wyrażoną jako procent aktywności tej samej warstwy u szczurów Wistar STD. Dzięki temu możliwe jest międzygrupowe porównanie aktywności w obrębie danego typu warstwy: kory, rdzenia zewnętrznego i rdzenia wewnętrznego.

U szczurów Wistar, niezależnie od diety, intensywność fluorescencji trzech warstw nerki była zbliżona. Również u szczurów SHR STD wszystkie warstwy nerki wykazywały zbliżoną intensywność fluorescencji, jednakże dieta wysokosodowa obniżała selektywnie fluorescencję w rdzeniu zewnętrznym ($68 \pm 3\%$ aktywności w korze; $p < 0,001$; Ryc. 33A).

U szczurów Wistar zaobserwowano ujawniającą się po diecie wysokosodowej słabą tendencję do obniżania aktywności żelatynolitycznej we wszystkich trzech warstwach. U szczurów SHR dieta wysokosodowa obniżała selektywnie tylko aktywność żelatynolityczną w obrębie rdzenia zewnętrznego ($86 \pm 5\%$ SHR HS21 vs $121 \pm 10\%$ SHR STD; $p < 0,01$; Ryc. 33B), zaś w obrębie kory i rdzenia wewnętrznego widać było słabą tendencję wzrostową. Grupy szczurów na diecie STD różniły się intensywnością fluorescencji w obrębie rdzenia wewnętrznego (SHR STD: $111 \pm 3\%$ aktywności Wistar STD; $p < 0,01$; Ryc. 33B). Grupy szczurów na diecie wysokosodowej różniły się intensywnością fluorescencji w korze, znów na korzyść SHR ($110 \pm 5\%$ SHR HS21 vs $83 \pm 11\%$ Wistar HS21; $p < 0,05$), podobna tendencja zarysowała się również w obrębie rdzenia wewnętrznego (Ryc. 33B).

4.8. Całościowe zestawienie zgromadzonych wyników

Tab. 1. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup Wistar STD, Wistar HS21, SHR STD, SHR HS21. Δ oznacza zmianę parametru w czasie od 0. do 21. dnia doświadczenia chronicznego. Δ MC – zmiana w masie ciała, Δ SBP – zmiana w skurczowym ciśnieniu krwi, Δ P_{osm} – zmiana w stężeniu substancji osmotycznie czynnych (osmolalności) we krwi, Δ P_{Na} – zmiana w stężeniu jonów sodu we krwi, M_{PN} (% MC) – masa prawej nerki jako % masy ciała, IUK – indeks uszkodzenia kłębuszków, liczebność jąder OM/IM – liczebność jąder na 1 mm² obszaru rdzenia zewnętrznego/ wewnętrznego, jądra PCNA⁺ OM/ jądra PCNA⁺ IM – udział jąder wyznakowanych przeciwko PCNA w ogólnej puli jąder rdzenia zewnętrznego/ wewnętrznego, MBP – średnie ciśnienie tętnicze, RBF – całkowity przepływ krwi przez nerkę, CBF – korowy przepływ krwi, OMBF – zewnątrzrdzeniowy przepływ krwi, IMBF – wewnątrzrdzeniowy przepływ krwi, OMBF/IMBF – stosunek ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego, V – diureza, U_{osm}V – wydalanie substancji osmotycznie czynnych, U_{Na}V – wydalanie jonów sodu, P_{NGAL} – stężenie NGAL w osoczu, U_{NGAL}/U_{osm} – stężenie NGAL w moczu przeliczone na jego osmolalność, P_(NO₂/NO₃) – stężenie metabolitów tlenu azotu w osoczu, U_(NO₂/NO₃)/U_{osm} – stężenie metabolitów tlenu azotu w moczu przeliczone na jego osmolalność, U_{VEGF-A}/U_{osm} – stężenie VEGF-A w moczu przeliczone na jego osmolalność, C_{akt}/ OM_{akt}/ IM_{akt} – aktywność żelatynolityczna w rejonie kory/ rdzenia zewnętrznego/ rdzenia wewnętrznego. Gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie w obrębie stada (STD vs HS21), krzyżyki – w obrębie diety (SHR vs Wistar). Stopień istotności oznaczono zwielokrotniając znak: * lub # – $p < 0,05$, ** lub ## – $p < 0,01$, *** lub ### – $p < 0,001$.

Parametr	Wistar STD	Wistar HS21	SHR STD	SHR HS21
Δ MC [g]	84 ± 5	51 ± 4 ***	68 ± 4 #	39 ± 4 ***
Δ SBP [mmHg]	2 ± 7	18 ± 6 *	8 ± 6	35 ± 5 **#
Δ P _{osm} [mOsm/kg]	-1 ± 3	2 ± 3	-2 ± 4	-4 ± 3
Δ P _{Na} [mM]	-4 ± 2	4 ± 2 *	-1 ± 3	1 ± 1
M _{PN} (% MC) [%]	0,38 ± 0,01	0,48 ± 0,01 ***	0,40 ± 0,01	0,45 ± 0,01 **#
IUK [jednostki umowne]	0,51 ± 0,03	0,78 ± 0,17	0,95 ± 0,12 ##	1,74 ± 0,18 ** ##
Liczebność jąder OM [jądra/mm ²]	9809 ± 130	8278 ± 188 ***	7701 ± 308 ###	6783 ± 142 * ##
Liczebność jąder IM [jądra/mm ²]	9304 ± 184	8102 ± 153 *	7554 ± 280 ##	7284 ± 226
Jądra PCNA ⁺ OM [%]	41 ± 3	74 ± 1 *	75 ± 1 ##	80 ± 1
Jądra PCNA ⁺ IM [%]	21 ± 3	67 ± 1 ***	65 ± 2 ###	77 ± 1

MBP [mmHg]	103 ± 2	112 ± 5	137 ± 5 ^{###}	138 ± 1 ^{###}
RBF [mL/min]	7,5 ± 0,7	8,5 ± 0,8	8,7 ± 0,8	10,5 ± 0,9
CBF [PU]	589 ± 40	627 ± 42 ^{##}	782 ± 44	665 ± 61
OMBF [PU]	191 ± 30	176 ± 24	277 ± 48	222 ± 40
IMBF [PU]	180 ± 20	224 ± 23	202 ± 26	205 ± 17
OMBF/IMBF	1,16 ± 0,20	0,84 ± 0,12	1,56 ± 0,34	1,12 ± 0,23
V [μL/min]	4,29 ± 0,52	6,7 ± 1,0 [*]	2,9 ± 0,4	13,3 ± 3,9 ^{*** #}
U_{osm}V [μOsm/min]	4,19 ± 0,34	8,30 ± 1,39 ^{***}	3,59 ± 0,42	11,36 ± 2,84 ^{***}
U_{Na}V [μmol/min]	0,09 ± 0,01	1,88 ± 0,40 ^{***}	0,18 ± 0,03 ^{##}	4,03 ± 1,15 ^{*** #}
P_{NGAL} [U/mL]	179,6 ± 27	138,0 ± 18	190,7 ± 17	209,5 ± 12 ^{##}
U_{NGAL}/U_{osm} [U/mOsm]	0,72 ± 0,15	0,81 ± 0,27	1,01 ± 0,20	0,95 ± 0,33
P_(NO₂/NO₃)[μM]	101 ± 2	132 ± 3 ^{***}	106 ± 6	127 ± 2 ^{**}
U_(NO₂/NO₃)/U_{osm} [μmol/mOsm]	0,20 ± 0,07	0,19 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,20 ± 0,01
U_{VEGF-A}/U_{osm} [ng/mOsm]	2,11 ± 0,72	7,63 ± 3,83	2,08 ± 1,60	16,61 ± 1,77 ^{** #}
C_{akt} [100% = C_{akt} Wistar STD]	100 ± 0	83 ± 11	103 ± 10	110 ± 5 [#]
OM_{akt} [100% = OM_{akt} Wistar STD]	100 ± 0	87 ± 9	121 ± 10	86 ± 5 ^{**}
IM_{akt} [100% = IM_{akt} Wistar STD]	100 ± 0	92 ± 11	111 ± 3 ^{##}	117 ± 7
OM_{akt} [100% = C_{akt} tej grupy]	95 ± 9	106 ± 17	105 ± 6	68 ± 3
IM_{akt} [100% = C_{akt} tej grupy]	99 ± 9	111 ± 11	108 ± 15	99 ± 6

Tab. 2. Zestawienie wyników pomiarów dla dodatkowych grup Wistar 10 i Wistar 28. OMBF/IMBF dwie sondy – stosunek ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego wyliczony z pomiarów dokonanych dwiema niezależnymi sondami laserowymi, OMBF/IMBF jedna sonda – stosunek ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego wyliczony z pomiarów dokonanych jedną sondą laserową, $U_{8\text{-izoPGF}2\alpha}$ – stężenie wolnej 8-izoprostaglandyny $F2\alpha$ w moczu. Gwiazdka oznacza różnicę istotną statystycznie vs Wistar STD (* – $p < 0,05$).

Parametr	Wistar STD	Wistar HS10	Wistar HS21	Wistar HS28
OMBF/IMBF dwie sondy	1,16 ± 0,20	1,03 ± 0,25	0,84 ± 0,12	0,77 ± 0,13
OMBF/IMBF jedna sonda	1,22 ± 0,19	-	0,75 ± 0,04	0,50 ± 0,16
$U_{8\text{-izoPGF}2\alpha}$ [pg/mL]	233 ± 22	624 ± 129 *	262 ± 67	284 ± 121

Tab. 3. Zestawienie korelacji obliczonych dla wybranych parametrów. $U_{\text{VEGF-A}}/U_{\text{osm}}$ – stężenie VEGF-A w moczu przeliczone na jego osmolalność, IUK – indeks uszkodzenia kłębuszków, OMBF/IMBF dwie sondy – stosunek ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego wyliczony z pomiarów dokonanych niezależnymi sondami laserowymi, HS – dieta wysokosodowa.

Parametry	Korelacja r	Prawdopodobieństwo p
$U_{\text{VEGF-A}}/U_{\text{osm}}$ + IUK	0,67	< 0,02
OMBF/IMBF dwie sondy + długość diety HS	-0,35	< 0,05
OMBF/IMBF jedna sonda + długość diety HS	-0,77	< 0,05

5. Dyskusja

Choroba nadciśnieniowa przyczynia się do rozwoju wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym udaru mózgu i zawału serca, a także prowadzi do wielonarządowej niewydolności (ang. *multiple organ failure*). Istotnym składnikiem ryzyka rozwoju nadciśnienia tętniczego jest wysokie spożycie sodu. Pomimo, że związek sodu z ciśnieniem krwi jest znany od dawna, wysoki współczynnik zapadalności i wysokiej śmiertelności w grupie chorób krążeniowych zobowiązuje do dalszych poszukiwań podstawowych mechanizmów patologicznych. Cel niniejszej pracy wynikał z potrzeby kompleksowego spojrzenia na udział nerki w kształtowaniu ciśnienia krwi w zależności od podaży sodu w diecie, ze szczególnym uwzględnieniem prawdopodobnych różnic między zwierzętami normotensyjnymi, bez żadnych predyspozycji do nadciśnienia oraz zwierzętami, u których wczesna faza choroby nadciśnieniowej, o podłożu genetycznym, była już rozwinięta. Połączenie precyzyjnych technik pomiarowych parametrów fizjologicznych z oznaczeniami wskaźników biochemicznych, poparte analizą histopatologiczną umożliwiło szersze spojrzenie na zjawiska zachodzące w nerkach organizmu eksponowanego na wysoką podaż sodu.

5.1. Zmiany ciśnienia w zależności od podaży sodu w diecie i cech użytego zwierzęcia doświadczalnego

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch stad szczurów. Szczury Wistar zgodnie z charakterystyką stada są zwierzętami normotensyjnymi, u których prawdopodobieństwo wystąpienia predyspozycji do rozwoju nadciśnienia jest typowe dla przeciętnej populacji szczurów. Szczury SHR, początkowo normotensyjne, rozwijają nadciśnienie stopniowo, uzyskując według twórcy stada wartości ciśnienia znacznie wyższe od normotensyjnej kontroli do 10 tygodnia życia [Okamoto K i Aoki K, 1963]. Firma Charles River, z której pierwotnie (szczep założycielski) pochodziły badane SHR, umieszcza jednak na swojej witrynie internetowej charakterystykę odbiegającą od wyników uzyskanych przez grupę pod kierownictwem K Okamoto. Według firmy szczury SHR rozwijają nadciśnienie między 9 a 15 tygodniem życia (http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_08_bp_characterization_of_hypertensive_and_cardiovascular_studies.pdf; dostęp 06.12.2012). W tym czasie ich

ciśnienie skurczowe wzrasta z 172 mmHg do 203 mmHg (pomiar techniką mankietów okluzyjnych). Szczury SHR wykorzystane w niniejszej pracy rozpoczynały doświadczenie chroniczne w wieku 8-10 tygodni, a więc doświadczenie ostre oraz pobranie próbek do dalszej analizy wypadło w 11.-13. tygodniu życia. Ten zakres wiekowy został dobrany z powodu limitu masy ciała zwierząt, narzucanego przez aparaturę pomiarową; sprzęt służący do przeprowadzenia doświadczeń ostrych dostosowany jest do zwierząt o masie ciała ok. 280-300 g. U szczurów SHR na diecie standardowej w ciągu pierwszych dwóch tygodni doświadczenia chronicznego obserwowano pewną tendencję wzrostową w zakresie ciśnienia tętniczego krwi, aczkolwiek ostatecznie wartości ich ciśnienia skurczowego nie różniły się od wartości tego parametru w grupie Wistar STD (Ryc. 6). Różnice ujawniły się dopiero w odpowiedzi na dietę wysokosodową, po której szczury SHR wykazywały znacznie większy wzrost SBP niż szczury Wistar (Ryc. 6). Jednakże zgodnie z charakterystyką producenta szczury znajdowały się w fazie rozwoju nadciśnienia. Odstąpienie od pierwotnego założenia projektu, w którym planowano wykorzystanie zwierząt z utrwalonym nadciśnieniem tętniczym miało istotne zalety dla ostatecznej interpretacji uzyskanych wyników. Wydaje się, że szczury z rozwiniętym nadciśnieniem mogą mieć tak duże uszkodzenia morfologiczne i czynnościowe, że odróżnienie efektu wysokiej podaży sodu od działającego często w tym samym kierunku wpływu wysokiego ciśnienia krwi byłoby niemożliwe (późniejsze doświadczenia przeprowadzone przez mnie na szczurach SHR z SBP w okolicach 200-210 mmHg potwierdziły to przypuszczenie).

Kolejną zaskakującą obserwacją w przeprowadzonych badaniach jest wzrost ciśnienia krwi tętniczej (tu SBP) u szczurów Wistar utrzymywanych na diecie wysokosodowej. W oparciu o szeroki przegląd literatury można było założyć, że zwierzęta pochodzące z tego stada nie powinny reagować na zwiększenie podaży sodu wzrostem ciśnienia krwi, a przynajmniej nie w tak krótkim czasie. Szczury Sprague-Dawley, podobnie jak szczury Wistar normotensyjne, na diecie wysokosodowej mają znamienne wyższe ciśnienie skurczowe dopiero w 6. tygodniu diety, a albuminuria pojawia się w 4. tygodniu [Gu JW *i wsp.*, 2008]. Z drugiej jednak strony podwyższenie stężenia jonów Na^+ w hodowlach komórek śródbłonna bardzo szybko wywoływało zmiany podobne do tych występujących w naczyniach [Nickenig G *i wsp.*, 1998; Gu JW *i wsp.*, 2000; Touyz RM i Schiffrin EL, 2000]. Reakcja szczurów Wistar może wskazywać na obecność cech sodowrażliwości. Warto pamiętać, że stado to jest hodowane z unikaniem krzyżowania

wsobnego, a więc uzyskane rozkłady cech w jego populacji powinny być zbliżone do rozkładu cech w populacji naturalnej. W takiej populacji również zdarzają się skłonności do rozwoju tzw. nadciśnienia sodozależnego, lecz z pewnością nie są one zjawiskiem powszechnym. Kwestia sodowrażliwości zostanie poruszona w Rozdz. 5.2.

Warto zwrócić uwagę, że pomiar ciśnienia krwi techniką mankietów okluzyjnych zakładanych na ogon nie jest metodą wysoce precyzyjną. Jej plusem jest bez wątpienia nieinwazyjność, minusem – stres zwierzęcia wynikający z unieruchomienia podczas pomiaru. By zwiększyć wiarygodność pomiaru szczury były przyzwyczajane do pomiaru przez co najmniej 7 dni. Pomiary SBP były weryfikowane w oparciu o wartość częstości tętna – zgodnie z zaleceniem producenta aparatu zapisy wiarygodne dla zwierząt normotensyjnych mieściły się w przedziale 350-500 skurczów/min (dla SHR przedział ten ustalono na 450-600 skurczów/min). Drugim wskaźnikiem weryfikującym była wartość przepływu krwi przez ogon (ponieważ technika pomiaru oparta jest na okluzji przepływu, powinien być on wyższy niż 10 mL/min). Pomimo zachowanych środków minimalizujących stres zwierzęcia i maksymalizujących wiarygodność zebranych danych, technika mankietów okluzyjnych z pewnością jest mniej czuła niż inwazyjne techniki pomiarowe – wspomniana w poprzednim akapicie charakterystyka SHR przygotowana przez firmę Charles River wskazywała na zmianę SBP na przestrzeni 6 tygodni z 172 mmHg do 203 mmHg (pomiar techniką mankietów okluzyjnych), podczas gdy u takich samych zwierząt z SBP mierzonym telemetrycznie (inwazyjnie) zarejestrowano wzrost z 164 mmHg do 185 mmHg. Jednakże niedoskonałości techniki okluzyjnego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi wynagradza jego nieinwazyjność i prostota pomiaru.

5.2. Zmiany stężenia sodu w osoczu i ich związek z sodowrażliwością

U szczurów Wistar na diecie wysokosodowej około dziewiątego dnia obserwowano niespodziewany wzrost stężenia jonów sodu w osoczu, niewystępujący u szczurów SHR (Ryc. 7). Obserwacja ta jest zaskakująca, ponieważ wydaje się, że mechanizmy związane z detekcją i usuwaniem sodu z organizmu działały poprawnie. Szczury Wistar reagowały na dietę wysokosodową wzrostem stężenia metabolitów NO w osoczu (Ryc. 24A), co może wskazywać na zwiększenie uwalniania NO ze śródbłonka. Mogło być to spowodowane kilkoma czynnikami. Po pierwsze mogła być to reakcja przeciwstawiająca się wzrostowi ciśnienia. Po drugie mógł być to wynik przeciwdziałania rosnącemu stężeniu

ROS [Vanhoute PM *i wsp.*, 2005]. Jednakże ten kierunek zmian w świetle dotychczasowych badań był niespodziewany. Typową odpowiedzią na wzrost stężenia sodu w osoczu był spadek uwalniania NO ze śródbłonka [Cubeddu LX *i wsp.*, 2000]. Co prawda wzrost stężenia sodu w osoczu obserwowano jedynie u szczurów Wistar (Ryc. 6), jednak zarówno u tych szczurów, jak i szczurów SHR wzrost stężenia metabolitów tlenu azotu w osoczu może sugerować niewłaściwe działanie śródbłonka jako detektora jonów sodowych. Interesujące jest również, dlaczego pomimo różnic w stężeniu P_{Na} między grupami Wistar HS21 i SHR HS21 (Ryc. 7) zmiany w uwalnianiu NO ze śródbłonka przebiegają w tym samym kierunku (Ryc. 24A). Pomimo jednak tej nietypowej reakcji wzrost ciśnienia krwi wywołał istotny wzrost wydalania wody (Ryc. 22A) i sodu (podobne zwielokrotnienie $U_{Na}V$ w obu stadach, Ryc. 22B), co wskazuje na zachowanie prawidłowego procesu diurezy i natriurezy z nadciśnienia. Mechanizm usuwania sodu z ustroju w ogóle i z osocza wydaje się więc zachowany. Dysfunkcja śródbłonka jest jednak jedną z wielu przyczyn sodowrażliwości; być może szczury Wistar i SHR różnią się typem dysfunkcji śródbłonka, bądź dysfunkcją innych mechanizmów kształtujących ciśnienie krwi tętniczej w zależności od podaży jonów sodowych w pożywieniu [Campese VM *i wsp.*, 1996; Higashi *i wsp.*, 2001]. Wiadomo na przykład, że SHR mają uboższą sieć naczyń krwionośnych niż szczury normotensyjne, a jej zagęszczenie na drodze farmakologicznej zmniejsza nadciśnienie [Tran E *i wsp.*, 2010].

Interesujące jest, że u szczurów SHR po diecie wysokosodowej obserwuje się wzrost ciśnienia tętniczego krwi, pomimo sprawnego usuwania nadmiaru jonów sodowych z osocza (Ryc. 7, 22B). Wydaje się, że mimo braku retencji sodu w osoczu (brak wzrostu P_{Na} u SHR HS21), sam sól indukował zmiany, być może o podobnym charakterze do obserwowanych w doświadczeniach *in vitro* na komórkach śródbłonka. Wyniki tych badań sugerowały, że pewne zmiany zależne bezpośrednio od sodu (indukcja ekspresji genów odpowiedzialnych za przerost komórek śródbłonka, uwrażliwienie śródbłonka i mięśniówki na skurczowe i mitogenne działanie Ang II) są pierwotne w stosunku do zmian zależnych od nadciśnienia [Nickenig G *i wsp.*, 1998; Gu JW *i wsp.*, 2000; Touyz RM i Schiffrin EL, 2000]. Ponieważ ciśnienie w grupie SHR HS21 wzrasta znacznie bardziej niż w grupie Wistar HS21 (Ryc. 6), w której obserwuje się kumulację jonów sodowych (Ryc. 7) należy przypuszczać, że zwiększenie stężenia sodu w osoczu (P_{Na}), a także wtórne do niego zwiększenie objętości osocza, same z siebie nie są jedynymi czynnikami zwiększającymi ciśnienie tętnicze. Wydaje się, że sól za pośrednictwem

innych mechanizmów lub działając w innych przestrzeniach tkankowych może indukować niekorzystne zmiany prowadzące do wzrostu ciśnienia krwi. Już w 1982 roku zaobserwowano większą koncentrację jonów K^+ i Na^+ w płynach tkankowych i limfie niż w osoczu [Szabó G i Magyar Z, 1982]. Takie magazynowanie sodu odbywało się poprzez zastępowanie atomów wodoru w cząsteczkach białek jonami Na^+ . Mechanizm ten powoduje uwalnianie dużej ilości protonów, prowadząc do kwasicy; co więcej, pacjentów sodowrażliwych cechowała korelacja pomiędzy wzrostem ciśnienia krwi a spadkiem pH osocza [Sharma AM *i wsp.*, 1990]. Taka forma kumulacji sodu mogłaby więc nie przekładać się na jego stężenie w osoczu, jednak pomimo tego silnie oddziaływać na wiele procesów fizjologicznych, czy też wpływać na strukturę narządów, przyczyniając się do rozwoju nadciśnienia.

5.3. Wczesny wpływ wysokiej podaży sodu; przełomowe zmiany w dziewiątym/ dziesiątym dniu

Warto zauważyć, że wzrost P_{Na} następuje u szczurów Wistar w dziewiątym dniu diety (Ryc. 7). Wiele najnowszych obserwacji, w tym i badań prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, wskazuje na istnienie przełomowego punktu odpowiedzi na dietę wysokosodową właśnie w okolicach 10. dnia (szczury po diecie dziesięciodniowej były znacznie bardziej wrażliwe na narkozę niż szczury po diecie innej długości), po którym odpowiedź na wysoką podaż sodu wkracza w drugą fazę. Przypuszcza się, że jest to faza, w której nie da się już zahamować wzrostu ciśnienia krwi poprzez farmakologiczne zwiększanie biodostępności tlenu azotu, czy hipotensyjnie działających metabolitów cytochromu P450 [badania własne]. Kolejną interesującą przesłanką wskazującą na punkt przełomowy w okolicach dziesiątego dnia jest pomiar wskaźnika stresu oksydacyjnego, 8-izoprostaglandyny $F2\alpha$. Powstawanie tej substancji jest efektem lipooksygenacji, zachodzącej z udziałem reaktywnych form tlenu. Zintensyfikowanie procesów formowania 8-izoprostaglandyny $F2\alpha$ osiąga maksimum właśnie w dziesiątym dniu (w badaniach nad ekspozycją na dietę wysokosodową o różnej długości; Ryc. 25). Pojawienie się 8-izoprostaglandyny $F2\alpha$ w moczu wskazuje na wysokie jej stężenie w tkankach nerki, co nie pozostaje bez wpływu na wydalanie sodu. W różnych typach komórek wzrost 8-izo-PGF 2α wpływa na ścieżki przekazywania zależne od cAMP [Khasawneh FT *i wsp.*, 2008]. W komórkach cienkiego odcinka ramienia wstępującego

pętli nefronu wzrost poziomu cAMP intensyfikuje transport NaCl [Ortiz PA, 2006] i w ten sposób może przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia [Meng S *i wsp.*, 2002]. Co prawda w grupach zwierząt przebywających na diecie wysokosodowej 21 i 28 dni wydalanie 8-izo-PGF₂ α wraca do poziomu wyjściowego, jednak może zaobserwowane współzaistnienie wysokiego wydalania tego związku w dniu 10 (Ryc. 25) i początku wysokich wartości P_{Na} dzień wcześniej (Ryc. 7) rzutują na dalszy rozwój nadciśnienia sodozależnego. W ten sposób nadciśnienie to zależne byłoby również od produkcji reaktywnych form tlenu. Być może to właśnie ROS są tym czynnikiem, który prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi w grupie SHR STD (Ryc. 6), pomimo efektywnego usuwania nadmiaru jonów sodowych (Ryc. 22B).

5.4. Zmiany masy ciała i proporcji masy nerek do masy ciała

Zarówno szczury Wistar, jak i SHR, odpowiedziały na dietę wysokosodową mniejszym przyrostem masy ciała (Ryc. 8). Krzywe przyrostu masy ciała w obu przypadkach stawały się istotnie różne od krzywych przyrostu dla odpowiednich grup szczurów pozostających na diecie standardowej już drugiego dnia diety. Można sugerować, że pasza o wysokiej zawartości sodu była dla zwierząt mniej atrakcyjna; dostępność sodu w pożywieniu wpływała bowiem na zmianę preferencji smakowych szczurów powodując np. zwiększony apetyt na słoną wodę u zwierząt utrzymywanych na diecie niskosodowej [Mecawi AS *i wsp.*, 2012] lub z farmakologicznie obniżoną zawartością sodu w ustroju sodu [Lu B *i wsp.*, 2012]. Mechanizm ten działał za pośrednictwem układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Być może w naszym układzie doświadczalnym zwierzęta zareagowały odwrotnie – ich apetyt na pokarm z dużą zawartością sodu zmalał wraz ze zwiększeniem ilości soli w pożywieniu. Jednakże poboczne doświadczenie niniejszego projektu badawczego, nie włączone do rozprawy, wydaje się tę sugestię poddawać w wątpliwość. W doświadczeniu tym szczury SHR na diecie wysokosodowej otrzymywały w wodzie do picia niespecyficzny inhibitor metaloproteinaz doksycyklinę. Doksycyklina zwiększa gęstość małych naczyń krwionośnych w tkankach, a przez to obniża ciśnienie tętnicze u SHR [Tran E *i wsp.*, 2010]. Po trzech tygodniach diety wysokosodowej i przyjmowaniu doksycykliny grupa ta nie odbiegała od grupy SHR HS21 w żadnym z mierzonych parametrów (zbliżone wartości SBP mierzone chronicznie, parametry hemodynamiczne i wydalnicze), z wyjątkiem masy

ciała. Krzywa dla tego parametru nie różniła się bowiem od krzywej wzrostu masy ciała grupy SHR STD, różniąc się istotnie od krzywej grupy SHR HS21. Ta zaskakująca obserwacja może sugerować, że smak paszy nie jest jedynym czynnikiem determinującym niższą masę ciała szczurów po diecie HS, jak również może stać się przyczynkiem do dodatkowych badań nad skutkami diety wysokosodowej.

Masy nerki przeliczone w stosunku do masy ciała przedstawiały przeciwne tendencje do zmian w masie ciała – kiedy przyrost masy ciała szczurów po diecie wysokosodowej malał (Ryc. 8), masa nerki w stosunku do ciała rosła (Ryc. 9). Zmiana tego stosunku nie była wynikiem jedynie słabszego przyrostu masy ciała, lecz rzeczywistego zwiększenia masy nerek (średnio o 26% u szczurów Wistar i o 12% u szczurów SHR). Nie jest to obserwacja zaskakująca, ponieważ wywołane wzrostem ciśnienia tętniczego krwi i przesączonego w kłębuszkach ładunku sodu (a w następstwie wielokrotne zwiększenie diurezy – Ryc. 22A – i natriurezy – Ryc. 22B) zmuszają nerki do intensywniejszej pracy. Jednakże zastanawiające jest, dlaczego szczury SHR, które w odpowiedzi na dietę wysokosodową miały zdecydowanie większą diurezę i wydalanie sodu niż szczury Wistar HS21 (Ryc. 22A, 22B) wykazywały znacznie mniejszy bezwzględny przyrost masy nerek (Ryc. 9). Być może wiązało się to z większymi uszkodzeniami w strukturach nerki, głównie w korze (zwiększony indeks uszkodzenia kłębuszków, Ryc. 12). Zwiększenie proporcjonalnej (a także bezwzględnej) masy nerek w odpowiedzi na dietę u obydwu typów szczurów nie wiązało się jednak z przyrostem liczby komórek w obydwu warstwach rdzenia (Ryc. 14A). Co więcej, liczba komórek obniżała się, zarówno w rdzeniu zewnętrznym, jak i wewnętrznym (Ryc. 14B). Wydaje się więc, że powiększenie nerek nie jest spowodowane zwiększeniem liczby komórek (hiperplazją), a przerostem już istniejących (hipertrofią). Może to stworzyć problem dystrybucji tlenu, ponieważ takie powiększenie struktur zwiększa odległość, na jaką musi dyfundować tlen z naczyń krwionośnych. Biorąc pod uwagę fakt, że obszary rdzeniowe nerki funkcjonują w stanie „fizjologicznej hipoksji” [Brezis M *i wsp.*, 1994], dalsze ograniczanie dostępności tlenu może niekorzystnie wpłynąć na ich strukturę i funkcje.

5.5. Zmiany hemodynamiczne w nerkach

W doświadczeniach na zwierzętach uśpionych zaobserwowano kolejny interesujący fakt dotyczący reakcji na narkozę; znosiła ona wykrywane u zwierząt czuwających różnice

w ciśnieniu krwi wynikające z diety, ale nie te wynikające z przynależności do stada/szczepu: pomiary dla Wistar STD nie różniły się od pomiarów dla Wistar HS21, podobnie jak nie różnił się pomiar w grupie SHR STD od SHR HS21; jednak różnica między szczurami Wistar a SHR utrzymała się (Ryc. 16). Spadek ciśnienia w odpowiedzi na narkozę u zwierząt na diecie wysokosodowej był więc relatywnie większy, co może w części tłumaczyć problemy z usypianiem takich zwierząt, poruszone w uwadze metodycznej (Rozdz. 3.1.2). Może to być również sugestia, by uznać sodozależne nadciśnienie tętnicze jako czynnik ryzyka w anestezjologii, jednak poszukiwanie mechanizmów leżących u podłoża tego zjawiska nie było celem niniejszej rozprawy.

Zarówno szczury Wistar, jak i SHR, zareagowały na dietę wysokosodową niewielkim wzrostem całkowitego przepływu krwi przez nerkę (Ryc. 17). Jest to zgodne z przewidywaniami, ponieważ zwiększenie ukrwienia wydaje się być koniecznym następstwem zwiększenia masy nerek (Ryc. 9) oraz intensyfikacji procesów metabolicznych związanej ze zwiększonym transportem. Paradoksalne na pierwszy rzut oka zwiększenie wydalania pozwala chronić równowagę wodno-elektrolitową organizmu, nawet jeśli nie jest ona idealna. Z drugiej strony RBF i CBF, w przeciwieństwie do przepływów rdzeniowych, są objęte dosyć sprawną autoregulacją [Cowley AW *i wsp.*, 1992], dlatego też wysoki wyjściowy (na diecie STD) CBF u szczurów SHR (Ryc. 18) jest interesującą obserwacją, mogącą świadczyć o upośledzeniu mechanizmów autoregulacyjnych. Jednym z takich mechanizmów decydujących o wielkości przepływu krwi przez nerkę jest kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne, a punktem uchwytu w działaniu tego mechanizmu jest tętniczka doprowadzająca kłębuszka. Jej patologiczny skurcz powszechnie obserwowany u szczurów SHR [Bell PD *i wsp.*, 2000], mógłby wymuszać podwyższenie RBF w celu zachowania tempa filtracji kłębuszkowej. Ponadto skurcz tętniczki doprowadzającej prowadzi do rozwoju tzw. nadciśnienia kłębuszkowego [Palmer BF, 2001], co bez wątpliwości jest czynnikiem uszkodzającym, być może związanym ze znacznie większymi uszkodzeniami kłębuszków u szczurów SHR niż u szczurów Wistar na diecie STD (Ryc. 12). Według innej hipotezy mogącej wytłumaczyć podwyższony wyjściowy CBF u szczurów SHR w porównaniu ze szczurami Wistar za punkt wyjścia można by uznać zniszczone kłębuszki, które, by utrzymać filtrację na określonym poziomie, wymagają zwiększonego dopływu krwi. Obserwowany w grupie SHR STD obrzęk struktur kory (Ryc. 13a) mógłby być następstwem takiego długotrwałego zwiększenia przepływu krwi przez korę (Ryc. 18), ponieważ zjawisko to sprzyja filtracji

osocza z naczyń włosowatych do śródmiaższu okolicznych tkanek. Warto też zwrócić uwagę, że szczury Wistar i SHR zareagowały na dietę wysokosodową przeciwstawnym (choć statystycznie nieznamionym) kierunkiem zmian CBF (Ryc. 18). Tendencję wzrostową ukrwienia u szczurów Wistar można wytłumaczyć koniecznością zwiększenia przepływu przez nerki, które wraz z dietą zwiększyły swą masę (Ryc. 9). U szczurów SHR wzrost przepływu, który byłby spodziewanym kierunkiem zmian, nie następuje – być może w wyniku znacznego uszkodzenia kłębuszków (Ryc. 12).

5.6. Zależne od wysokiej podaży sodu uszkodzenia nerek i możliwości regeneracyjne ich struktur

Jako jeden ze wskaźników uszkodzenia struktur nerkowych został użyty antygen jądrowy komórek proliferujących (PCNA). Poprzez współdziałanie z polimerazą delta (Pol δ) zaangażowany jest on w proces syntezy DNA w cyklu komórkowym, dlatego też uznawany jest za klasyczny wskaźnik proliferacji [Leonardi *i wsp.*, 1992]. PCNA jest niezbędny do przejścia komórki z fazy G_1 do S, więc wyznakowane jądra mogą wskazywać komórki w późnej fazie G_1 lub wczesnej fazie S [Connolly KM i Bogdanffy MS, 1993]. Odkąd dowiedziono, że Pol δ zaangażowana jest również w naprawę uszkodzonego DNA, PCNA może być traktowany również jako wskaźnik procesów naprawczych materiału genetycznego [Shivji KK *i wsp.*, 1992; Essers J *i wsp.*, 2005], a co za tym idzie wystąpienia wcześniejszego uszkodzenia, ponieważ związek ten intensyfikuje wycinanie nukleotydów poprzez wzmocnienie funkcji katalitycznych tnących enzymów naprawczych [Nichols AF i Sancar A, 1992].

Procesy regeneracyjne zachodzące w nerkach mogą obejmować oba procesy, w których pojawia się PCNA: proces naprawy uszkodzonej komórki oraz – w chwili, gdy uszkodzenie komórek jest nieodwracalne i prowadzi do ich śmierci – proces naprawy tkanki poprzez powstawanie nowych komórek (proliferyację). Postępujące uszkodzenie komórek kanalików rozpoczyna zmiany w całym nefronie, prowadzące do upośledzenia funkcji wydalniczej nerki. Zmiany te obejmują **a.** niedrożność kanalików, **b.** przeciek filtratu między komórkami uszkodzonego nabłonka kanalików, **c.** obniżenie filtracji kłębuszkowej. Pierwsze dwa zjawiska wydają się być kluczowymi następstwami martwicy (nekrozy) kanalików oraz prowadzą do pojawienia się trzeciego. To właśnie martwica powoduje zapychanie kanalików martwymi elementami komórek oraz powstawanie

rejonów wycieku przesącza i ułatwienie jego powrotu do krążenia. Do tej pory szczegółowo opisano procesy naprawcze kanalików przebiegające po niedokrwieniu. Naprawa uszkodzonych kanalików odbywa się na drodze syntezy uszkodzonych składników komórkowych (kiedy uszkodzenie komórki jest odwracalne) lub na drodze proliferacji (w przypadku uszkodzenia nieodwracalnego). Naprawa poprzez syntezę jest wieloetapowa i pomimo, że rozpoczyna się zaraz po wystąpieniu bodźca niedokrwiennego, a cytoskielet uszkodzonych komórek bliższego kanalika krętego jest zreorganizowany w ciągu 60 minut, to część funkcji pozostaje upośledzona jeszcze w dziesiątym, a nawet w siedemnastym dniu po niedokrwieniu [Bacallao R i Fine LG, 1989]. Zastąpienie struktur kanalikowych uszkodzonych w sposób nieodwracalny trwa do 6 tygodni i obejmuje proliferację, a następnie dojrzewanie struktur, w którym oprócz czynników wzrostu biorą również udział nierozpuszczalne elementy macierzy zewnątrzkomórkowej: kolagen, lamininy, fibronektyna oraz proteoglikany. Pierwsze nieodwracalne zmiany apoptotyczne pojawiają się w ciągu 48 godzin od niedokrwienia [Olsen TS *i wsp.*, 1985]. Regeneracja struktur kanalikowych jest możliwa dzięki subpopulacji niewielkich komórek nabłonka kanalików aktywowanych z okolicznych rejonów uszkodzenia, których proliferacją kierują czynniki wzrostu: nabłonkowy (EGF, ang. *Epidermal Growth Factor*), insulinopodobny (IGF-1, ang. *Insulin-like Growth Factor 1*) i wątrobowy (HGF, ang. *Hepatocyte Growth Factor*) [Humes HD *i wsp.*, 1995]. Nadal nie opisano specyficznych markerów dla komórek macierzystych kanalików, stwierdzono natomiast, że istnieje subpopulacja komórek kanalikowych występująca w segmencie S3 kanalika bliższego o cechach komórek progenitorowych, które biorą udział w naprawie uszkodzeń poniedokrwienych w kanalikach nerki szczura [Maeshima A *i wsp.*, 2003]. Obecność PCNA w jądrze komórkowym może więc wskazywać zarówno na proliferację, jak i na procesy naprawcze, toczące się w uszkodzonej komórce.

Dieta wysokosodowa zwiększała znacznie liczbę jąder wyznakowanych przeciwko PCNA u szczurów Wistar w obu obszarach rdzenia (Ryc. 15B), co być może jest konsekwencją nasilonych procesów transportowych w kanalikach (Ryc. 22), prowadzących do lokalnego niedoboru tlenu. U szczurów SHR już wartości wyjściowe (na diecie STD) wyznakowania przeciwko PCNA były bardzo wysokie, co u tych zwierząt może być efektem złożonym, zależnym od nasilonych procesów transportowych oraz uszkodzeń związanych z nadciśnieniem rozwijającym się u nich spontanicznie. Trudno na tym etapie te ostatnie zmiany związać z wysokim ciśnieniem krwi, gdyż

w naszym przypadku nie różniło się ono istotnie od obserwowanego u zwierząt normotensyjnych na diecie STD, aczkolwiek nie można wykluczyć, że u SHR to właśnie pierwotne uszkodzenia nerek o podłożu genetycznym prowadzą do rozwoju nadciśnienia. Warto jednak zwrócić uwagę, że nie tylko struktury kanalikowe ulegały wyznakowaniu przeciwko PCNA – zdarzało się to również w strukturach kłębuszka (Ryc. 11). Trudno jednak ocenić, jaki typ komórek ulegał wyznakowaniu, ponieważ w kłębuszku, oprócz komórek śródbłonka naczyń, występują inne typy. W obszarze rdzenia wyznakowanie przeciwko PCNA w komórkach śródbłonka pojawiało się głównie u szczurów SHR – na diecie STD dotyczyło tylko strefy wewnętrznej (IM), na diecie wysokosodowej pojawiało się w obydwu warstwach rdzenia. U szczurów Wistar wyznakowanie komórek naczyń nie występowało ani na diecie standardowej, ani wysokosodowej. Wydaje się więc, że uszkodzenie, a więc i procesy naprawcze u szczurów SHR, ale nie Wistar, obejmowało również struktury naczyniowe, co mogło w sposób bezpośredni wpłynąć na stopień ukrwienia rdzenia.

Warto zaznaczyć, że to właśnie krążenie rdzeniowe może być kluczowym elementem procesu diurezy i natriurezy z nadciśnienia [Guyton AC *i wsp.*, 1972; Cowley AR Jr *i wsp.*, 1995]. W świetle nowych hipotez można sądzić, że podstawową składową tego zjawiska jest wzajemne oddziaływanie kanalików i naczyń prostych; prawdopodobnie to kanaliki rdzeniowe uwalniają NO, który buforuje naczyniokurczący efekt Ang II [Dickhout JG *i wsp.*, 2002]. W ten sposób krążenie rdzeniowe w dużej mierze opiera się działaniu Ang II [Mattson DL *i wsp.*, 1991] umożliwiając prawidłowe funkcjonowanie struktur rdzenia – nadmierny skurcz naczyń ograniczyłby dostęp tlenu, którego w rdzeniu już w warunkach fizjologicznych jest bardzo mało.

Ubytek komórek rdzeniowych odcinków kanalików (Ryc. 14B), choć po 21 dniach diety wydaje się nie upośledzać diurezy i natriurezy z nadciśnienia (Ryc. 22A, 22B), z czasem może więc doprowadzić do utraty możliwości długoterminowej kontroli ciśnienia krwi tętniczej. Jednakże zastosowana metoda liczenia nie rozróżnia, jak rozkładają się proporcje ubytku komórek w różnych ich klasach; związane jest to z pojawiającą się czasem trudnością w rozróżnieniu cienkich odcinków pętli nefronu od naczyń krwionośnych. Dlatego też zliczenia takie należy traktować z pewną rezerwą.

5.7. Hemodynamika rdzenia i jej związki ze zmianami morfologicznymi

U szczurów Wistar na diecie standardowej dwie warstwy rdzenia różniły się między sobą liczbą komórek (wyrażaną na jednostkę powierzchni) – znacznie więcej było ich w rdzeniu zewnętrznym (Ryc. 15A). Po diecie wysokosodowej różnica ta zanikała. Być może to zrównanie związane było ze zmianą stosunku ukrwienia warstw rdzenia (OMBF/IMBF), co rzeczywiście miało miejsce i było wynikiem przede wszystkim wzrostu IMBF, przy zachowaniu zbliżonych wartości OMBF. Można spekulować, że równoległy wzrost ukrwienia obu warstw rdzenia mógłby skutecznie zapobiec wzrostowi ciśnienia krwi, natomiast obserwowane uszkodzenia OM (wyraźne ubytki komórek, Ryc. 10h) uniemożliwiają zwiększenie jego ukrwienia prowadząc tym samym do dysfunkcji narządu i wzrostu ciśnienia krwi tętniczej. Z drugiej strony można też przypuszczać, że obserwowany ubytek komórek w rdzeniu zewnętrznym jest nie przyczyną, a następstwem niedokrwienia w tym obszarze. Wydaje się prawdopodobne, że doszło do specyficznego przekierowania napływającej krwi z kory w kierunku rdzenia wewnętrznego z częściowym pominięciem struktur rdzenia zewnętrznego przyczyniając się do ich uszkodzenia. Wzrostowi IMBF towarzyszy spadek wyznakowania przeciwko VEGF-A w obszarze IM (Ryc. 28i, 28j), podczas gdy przepływ, jak i wyznakowanie VEGF-A w OM pozostaje porównywalne (Ryc. 28a, 28b). Jednoczesne zaistnienie tych zmian mogłoby sugerować, że wzrost przepływu wewnątrzrdzeniowego jest zjawiskiem niekorzystnym. Po diecie wysokosodowej w obydwu warstwach rdzenia u szczurów Wistar następował gwałtowny wzrost liczby jąder wyznakowanych przeciwko PCNA (OM: z $41 \pm 3\%$ do $74 \pm 1\%$; $p < 0,05$; IM: z $21 \pm 3\%$ do $67 \pm 1\%$; $p < 0,01$; Ryc. 15B), a zarazem znaczny spadek liczby komórek w tych warstwach. Można przypuszczać, że obecność PCNA w ich jądrach jest wynikiem działań naprawczych, a nie proliferacji. Jednak najnowsze doniesienia wskazują na znaczny wzrost intensywności proliferacji po diecie wysokosodowej w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli nefronu szczurów sodowrażliwych [Yang C *i wsp.*, 2013]. Być może zachodzą równoległe procesy naprawcze oraz podziały komórek, lecz ostateczny (netto) efekt proliferacji i uszkodzenia daje zmniejszenie ich liczebności.

Szczury SHR wykazywały rozleglejsze uszkodzenia po diecie wysokosodowej, przy czym uszkodzenia te były istotne nawet bez zwiększenia podaży sodu (Ryc. 13). Jednakże szczury te nie reagują na dietę wysokosodową wzrostem liczby jąder wyznakowanych przeciwko PCNA (Ryc. 15B), być może dlatego, że wyjściowo liczba ta,

a więc i uszkodzenia są już znaczące. Można sugerować, że powstałe – czy też już istniejące – uszkodzenia uniemożliwiają uruchomienie dalszych procesów naprawczych w tkance. U szczurów SHR w nerce obserwuje się podwyższony poziom ekspresji transformującego czynnika wzrostu (TGF β 1) [Xue H *i wsp.*, 2005]. Cytokina ta, uwalniana np. we wczesnych stanach uszkodzenia niedokrwiennego, zdolna jest do regulacji (pozytywnej bądź negatywnej) proliferacji; może więc wpływać na liczbę jąder wyznakowanych przeciwko PCNA. W warunkach *in vitro* TGF β indukuje proces formowania kanalików nerkowych [Montesano R *i wsp.*, 2007]. Co ważne, różnice w liczbie jąder komórkowych między SHR na różnych dietach (Ryc. 14B) są równoległe do różnic wartości przepływów rdzeniowych (Ryc. 19) – w rdzeniu zewnętrznym zaobserwowano zarazem spadek ukrwienia, jak i spadek liczby jąder (co może sugerować pojawienie się TGF β), podczas gdy w rdzeniu wewnętrznym przepływ i liczba jąder zmieniały się nieznacznie. Należy wspomnieć, że gruby odcinek ramienia wstępującego pętli nefronu uznawany jest za główne źródło nadmiernej produkcji 'O₂' w nadciśnieniu sodozależnym [O'Connor PM *i wsp.*, 2008]. Wzmożona produkcja reaktywnych form tlenu w tym odcinku kanalika może być jedną z przyczyn dużego ubytku komórek zależnego od diety wysokosodowej.

Wydaje się, że zmiany w przepływach rdzeniowych są najważniejszą zmianą hemodynamiczną w nerce zwierząt eksponowanych na wysoką podaż sodu w diecie. Dane literaturowe wskazują na istotny udział naczyń oporowych rdzenia, zwłaszcza zewnętrznego, w kształtowaniu ciśnienia krwi [Pallone TL, 1994]. Również doniesienia o wielu mechanizmach chroniących krążenie rdzeniowe wskazują na istotny jego udział w procesach kształtowania ciśnienia krwi tętniczej [Cowley AW Jr, 2008]. W Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych zdecydowano się na zastosowanie rozdzielnych pomiarów przepływu krwi techniką laser-Doppler przez zewnętrzną i wewnętrzną część rdzenia nerki szczura. Większość zespołów badawczych na świecie stosuje uproszczony model pomiarów, stosując jedną sondę rdzeniową. To nowatorskie podejście jest związane z refleksją, że w związku z różnicą budowy i funkcji kanalików zlokalizowanych w różnych obszarach rdzenia, a także z odmiennym unaczynieniem tych obszarów, w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych ukrwienie tych dwóch rejonów może być regulowane niezależnie. Niespodziewana była obserwacja obniżenia stosunku ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego na diecie wysokosodowej; właśnie to leżało w części u podstawy sformułowania hipotez niniejszego projektu badawczego.

Okazało się, że zarówno u szczurów Wistar, jak i u szczurów SHR, w wyniku podwyższonej podaży sodu w diecie stosunek OMBF/IMBF ulega obniżeniu (Ryc. 19A), jest jednak wynikiem zmiany innej części składowej: u szczurów Wistar zależy od wzrostu IMBF, a u szczurów SHR od wybiórczego spadku OMBF (Ryc. 19B).

Jak wspomniano wcześniej, zmianom hemodynamicznym u szczurów Wistar towarzyszyły zmiany we wzorze występowania VEGF-A (Ryc. 28). O ile wyznakowanie OM pozostawało stałe, niezależnie od diety (Ryc. 28a, 28b), liczba wyznakowanych struktur w IM obniżała się wraz z dietą (Ryc. 28i, 28j), podobnie jak przepływ krwi przez tę strefę rdzenia (IMBF, Ryc. 19B). Z kolei zmiany w przepływach rdzeniowych szczurów SHR zachodziły równoległe ze zmianami liczby jąder komórkowych i aktywności żelatynolitycznej: w rdzeniu zewnętrznym obserwowano zarówno spadek ukrwienia (Ryc. 19B), jak i obniżenie liczby jąder (Ryc. 14B) i aktywności żelatynolitycznej (Ryc. 33B), podczas gdy wartości te pozostawały na stałym poziomie w rdzeniu wewnętrznym.

Pomiar przepływów krwi techniką laser-Doppler jest techniką wysoce czułą, pozwalającą wykonać bardzo precyzyjne pomiary. Warto jednak zwrócić uwagę, że sondy laserowe są sondami punktowymi, tzn. mierzą wartości przepływu tylko w niewielkim obszarze. Czasem więc, wartość pomiaru zależy może od miejsca, w jakim sonda została umiejscowiona (np. duże naczynie poniżej sondy). Ponadto, umiejscowienie dwóch sond w zbyt bliskiej odległości może prowadzić do wzajemnych zakłóceń (światło laserowe jednej sondy może być rejestrowane przez drugą). Ponieważ zróżnicowanie parametrów ukrwienia rdzenia miało w tym projekcie kluczowe znaczenie, zdecydowano się na wykonanie dodatkowych kontrolnych doświadczeń, w których do pomiaru ukrwienia rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego użyto tej samej sondy, umieszczonej w mikromanipulatorze i przemieszczanej na odpowiednią głębokość. Co prawda wartości pomiaru za pomocą dwóch sond można porównywać ze sobą, gdyż sondy są uprzednio kalibrowane, jednakże takie dodatkowe pomiary dokonane jedną sondą pozwoliły potwierdzić zmiany w stosunku ukrwienia obydwu warstw rdzenia (Ryc. 21).

5.8. Wydalanie nerkowe

W parametrach wydalniczych, zgodnie z teorią Guytona, dało się zauważyć zjawiska zwiększonego wydalania wody i sodu w wyniku nadciśnienia. Szczególnie łatwo

było je zaobserwować w grupie szczurów SHR STD, które pomimo braku obciążenia sodem w pożywieniu miały dwukrotnie wyższe jego wydalanie niż grupa Wistar STD (Ryc. 22B; różnica w MBP między tymi grupami to 34 mmHg, Ryc. 16). Wydalanie wody pozostawało na porównywalnym poziomie. Głównym czynnikiem kształtującym ostatecznie objętość wydalanej wody jest wazopresyna; jej stężenie u szczurów SHR jest porównywalne z normotensyjną kontrolą [Sladek CS *i wsp.*, 1987], a więc brak różnic w wydalaniu wody między grupami Wistar STD i SHR STD nie jest niczym zaskakującym (Ryc. 22A).

Zarówno u szczurów Wistar, jak i SHR wzrostowi ciśnienia będącemu wynikiem zwiększonej podaży sodu w diecie towarzyszy wzrost wydalania wody, sodu, a także ogółu substancji osmotycznie czynnych (oznaczenie to również uwzględnia jony Na^+ , ale także np. mocznik). Duży wzrost wydalania sodu u szczurów SHR w odpowiedzi na dietę wysokosodową pokazuje, że szczury te prawidłowo reagują na nadmiar sodu w organizmie, nie dopuszczając do jego kumulacji w osoczu (Ryc. 7). Jednakże ich ciśnienie tętnicze wzrasta, co zostało już skomentowane we wcześniejszych rozdziałach.

Lokalny obrzęk korowych odcinków kanalików, obserwowany u szczurów SHR (Ryc. 13a), który pod wpływem diety wysokosodowej przechodził w jeszcze wyraźniejsze uszkodzenie (Ryc. 13g) z pewnością nie pozostawał obojętny dla formowania moczu. Właśnie w tym rejonie nerki znajdują się kręte odcinki kanalika bliższego, w których zachodzi tzw. resorpcja obowiązkowa – objętość przesączu kłębuszkowego zostaje izosmotycznie zredukowana o ok. 2/3. Dzięki temu procesy resorpcji i sekrecji zachodzące w kolejnych odcinkach kanalika mogą zachodzić bardziej wybiórczo. Uszkodzenie tego rejonu kanalika będzie więc miało wpływ na cały proces kształtowania składu i objętości moczu, a w efekcie na końcowe stężenie wydalanych substancji. Trudno jest wskazać powód wystąpienia obrzęku oraz wakuolizacji w tym rejonie nerki. Istnieją doniesienia mówiące, że ograniczenie dostępności endogennego VEGF-A powoduje obrzęk i wakuolizację komórek śródbłonka [Kitamoto Y *i wsp.*, 2001]. VEGF-A w nerkach, podobnie jak w śródbłonku naczyń, odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności nabłonka kanalików. Co prawda brak różnic w liczbie wyznakowanych przeciwko VEGF-A struktur w korze między czterema grupami mógłby sugerować brak różnicy w jego ekspresji, jednak ilość VEGF-A nie da się w żaden sposób przełożyć na jego faktyczną biologiczną dostępność ze względu na występowanie licznych białek

wiązących VEGF-A oraz ligandów dla jego receptorów, działających agonistycznie lub antagonistycznie [Foster RR, 2009].

Zjawisko natriurezy z nadciśnienia, które spowodowało w grupie szczurów SHR STD wydalanie sodu większe niż w grupie Wistar STD, wiąże się, nieco paradoksalnie, z nasileniem wysoce energochłonnych procesów transportowych, szczególnie w obrębie rdzenia zewnętrznego. Jeśli doprowadzają one do wyczerpania komórkowych zapasów ATP następuje rozpad cytoszkieletu, co pociąga za sobą naruszenie ścisłych złączy międzykomórkowych. W błonie komórkowej następuje naruszenie warstwy fosfolipidowej, a Na/K-ATPaza przemieszcza się z błony podstawnobocznej do apikalnej, co owocuje zmianami w rąbku szczoteczkowym komórek kanalika bliższego [Molitoris *i wsp.*, 1992]. To prowadzi do martwicy komórek, które obumierając mogą wywoływać niedrożność kanalików. Być może obserwowane w grupie SHR STD lokalne obrzęki kanalików są związane są z obecnością komórek o naruszonej strukturze, których ścisłe złącza uległy rozszczelnieniu. Jak wspomniano wcześniej, uszkodzenia takie są odwracalne i być może właśnie to tłumaczy obecność jąder wyznakowanych przeciwko PCNA w korze (Ryc. 13d), świadcząc o toczącym się tam procesie regeneracji. W takiej sytuacji wyciek moczu pierwotnego z kanalików może zmuszać komórki do dalszego zwiększania procesów transportowych, przeciwdziałających wyciekowi, a w efekcie do powstania zjawiska błędnego koła. U szczurów SHR po diecie wysokosodowej pojawiające się w tych miejscach rejony wakuolizacji świadczyć mogą o wkroczeniu w kolejną fazę uszkodzenia – martwicy kanalików, która oprócz oczywistego upośledzenia reabsorpcji prowadzi również do niedrożności kanalików.

Dieta wysokosodowa, zarówno u szczurów Wistar, jak i u szczurów SHR, zwiększała diurezę (Ryc. 22A). Warto zwrócić uwagę, że zwiększenie diurezy w odpowiedzi na wysoką podaż sodu było w proporcjach podobne do zwiększenia stopnia uszkodzenia kłębuszków (IUK u szczurów Wistar wzrósł o połowę, u SHR dwukrotnie, Ryc. 12; diureza u szczurów Wistar wzrosła o połowę, u SHR czterokrotnie, Ryc. 22A). Prawidłowość ta nie dotyczy kanalików; u szczurów Wistar, które utraciły znacznie więcej komórek w obu obszarach rdzenia, diureza wzrastała znacznie słabiej, niż u szczurów SHR, u których ubytku komórek nie odnotowano (Ryc. 14A). Można więc przypuszczać, że na tempo wydalania moczu większy wpływ ma stopniowa utrata funkcji kłębuszków (wydalany z moczem VEGF-A może wskazywać na zwiększenie ich przepuszczalności, Ryc. 26), niż procesy zachodzące w kanalikach rdzenia, jednakże procesy zagęszczania

moczu są bardzo złożone (i w poszczególnych etapach przeciwstawne), a wielkość diurezy jest jedynie ich ostatecznym efektem.

Zastanawiające jest, dlaczego dieta wysokosodowa nie zwiększyła wydalania metabolitów tlenu azotu (Ryc. 24B). Co prawda u szczurów SHR widać tendencję do zwiększenia wydalania tych związków, jednak u szczurów Wistar jest ona niewidoczna. Poziom reaktywnych form tlenu i azotu rośnie w rdzeniu zewnętrznym w wielu modelach nadciśnienia, a także w nerce organizmów sodowrażliwych [Cowley AW Jr, 2008]. Powstawanie NO w odpowiedzi na wzrastające stężenie ROS przekładało się na stężenie metabolitów NO w moczu [O'Connor PM i Cowley AW Jr, 2010]. Dodatkowo NO zmniejsza transport kanalikowy (a więc zwiększa wydalanie sodu) [Herrera M *i wsp.*, 2006] oraz zwiększa przepływ rdzeniowy [Mattson DL *i wsp.*, 1992]. Zwiększenie wydalania sodu (Ryc. 22B), podobnie jak wzrost przepływu wewnątrzrdzeniowego u szczurów Wistar (Ryc. 19B) mógłby więc iść w parze ze zwiększonym wydalaniem metabolitów NO.

5.9. Ogólnoustrojowy stres oksydacyjny a stan śródbłonna naczyń i nerek

Reaktywne formy tlenu wchodzą w gwałtowne reakcje z lipidami, tworząc wiele produktów, w tym 8-izoprostaglandynę F_{2α} (8-izoprostan, 8-izo-PGF_{2α}). Wiele dotychczasowych badań wskazuje na to, że pomiar izoprostanów typu F₂ jest wiarygodnym i użytecznym wskaźnikiem peroksydacji i oceny stresu oksydacyjnego *in vivo* [Morrow JD i Roberts LJ, 1997]. Substancją najpowszechniej wykorzystywaną jako taki wskaźnik jest właśnie 8-izo-PGF_{2α}. W stresie oksydacyjnym powstaje on na drodze peroksydacji kwasu arachidonowego związanego z fosfolipidami błon komórkowych różnych narządów. Produkt takiej reakcji nadal związany jest z błoną komórkową, lecz z czasem może zostać uwolniony przez fosfolipazy [Morrow JD *i wsp.*, 1992]. Dlatego też 8-izo-PGF_{2α} może być oznaczany w dwóch frakcjach: wolnej i związanej. Powszechnie uważa się, że oznaczenie frakcji wolnej (w moczu, osoczu) można przekładać na określenie ogólnej produkcji 8-izo-PGF_{2α} *in vivo*, co z kolei świadczy o poziomie peroksydacji lipidów w całym ustroju. Oznaczanie frakcji związanej pozwala zaś na specyficzne określenie miejsca uszkodzenia. Co ważne, bardziej zaawansowany wiek, który również uznawany jest za czynnik zwiększający stres

oksydacyjny, u szczurów nie wpływa na frakcję wolnego 8-izo-PGF2 α [Chu X *i wsp.*, 2009].

8-izoprostaglandyna F2 α oraz jej pochodne działają antydiuretycznie poprzez wpływ na hemodynamikę nerek oraz transport kanalikowy. W nerkach 8-izo-PGF2 α działa naczyniokurcząco [Badr KF i Abi-Antoun TE, 2005], co może obniżać RBF oraz tempo filtracji kłębuszkowej (GFR). Oprócz tych mechanizmów, które same z siebie obniżają wydalania wody i sodu, 8-izo-PGF2 α prawdopodobnie również działa bezpośrednio na transport kanalikowy. Wzrost stężenia 8-izo-PGF2 α oraz innych izoprostanów obserwuje się zarówno w moczu [Schnackenberg CG i Wilcox CS, 1999], jak i w osoczu [Haas JA *i wsp.*, 1999; Reckelhoff JF *i wsp.*, 2000] w różnych modelach nadciśnienia, co sugeruje, że 8-izo-PGF2 α może wpływać na funkcję komórek kanalików zarówno od strony światła kanalika, jak i od strony podstawnobocznej.

W niniejszej pracy oznaczano stężenie 8-izo-PGF2 α tylko w moczu szczurów Wistar, wystawionych na 10, 21 lub 28 dni działania diety wysokosodowej. Interesujące jest, że wydalanie 8-izo-PGF2 α było trzykrotnie wyższe niż na diecie standardowej tylko po 10 dniach diety wysokosodowej (Ryc. 25). Jak wspomniano wcześniej, wpisuje się to w hipotezę mówiącą, że ok. 10. dnia diety wysokosodowej następuje zmiana natury odpowiedzi na wysoką podaż sodu. W wyniku dłuższej ekspozycji na dietę wysokosodową poziom wydalania 8-izo-PGF2 α powracał do wartości wyjściowych, jednak rozpoczęte wcześniej zwiększenie jego produkcji mogło przyczynić się do utrwalenia wysokiego ciśnienia krwi poprzez wpływ na hemodynamikę nerek i transport kanalikowy, czyli procesy kształtujące ciśnienie krwi tętniczej.

Warto wspomnieć, że producent testu do oznaczania 8-izo-PGF2 α zaznacza, że może zachodzić reakcja krzyżowa z innymi 8-izoprostanami, tzn. z etanolamidem 8-izoprostanu (100%), 8-izoprostaglandyną F3 α (20,6%) czy 2,3-dinor-8-izoprostanem (4%). Ponieważ reakcja krzyżowa z innymi prostaglandynami zachodzi rzadko (test wykryje tylko 0,16% PGD₂ i 0,02% PGE₂) i nie przekracza 1,9% wykrytej wartości, pozostaje jedynie rozpatrzyć ewentualny udział innych 8-izoprostanów w oznaczonej zawartości 8-izo-PGF2 α . Powstają one w podobnych procesach utleniania, a ich działanie zbliżone jest do 8-izo-PGF2 α , o czym wspomniano na początku niniejszego podrozdziału, a więc przyjmując wynik tego oznaczenia jako miarę stresu oksydacyjnego, można je zaniedbać.

Wiadomo, że nerkę cechuje przepływ krwi nieproporcjonalnie wysoki w stosunku do zużycia tlenu przez ten narząd. Jednakże reabsorpcja wody i sodu jest procesem wysoce energochłonnym. W konsekwencji pomimo wysokiego przepływu krwi nerki narażone są na stany niedotlenienia (hipoksji), szczególnie przy dużym obciążeniu jonami sodu w diecie. Najnowsze badania wykazały, że chroniczna hipoksja okołokanalikowego śródmiąższu jest ostatnim etapem częstej ścieżki zmian prowadzącej do krańcowej choroby nerek (ESRD, ang. *End-Stage Renal Disease*) [Nangaku M, 2006]. Niedotlenienie samo przez się stymuluje oksydazę ksantynową i oksydazę NADPH, co owocuje zwiększeniem stresu oksydacyjnego [Abramoc AY *i wsp.*, 2007]. To błędne koło może przyczyniać się do wielu dysfunkcji, w tym prowadzić do nadciśnienia tętniczego. Powstające w tym mechanizmie reaktywne formy tlenu reagują z NO tworząc rodnik nadnitylowy ONOO⁻ i w ten sposób zmniejszają dostępność tlenu azotu, co prowadzi do rozregulowania funkcji mitochondriów i zmniejszenia zdolności wykorzystania tlenu. Możliwość ograniczania wykorzystywania tlenu w nerkach przez NO udowodniono w doświadczeniach, w których inhibitor NOS podwyższał całkowite zużycie tlenu w nerce [Laycock SK *i wsp.*, 1998]; do tej pory nie ustalono, która z izoform NOS jest za to odpowiedzialna. U szczurów SHR dostępność NO jest znacznie obniżona w związku ze zwiększoną produkcją ROS, będącą wynikiem wzmocnienia ekspresji oksydazy NADPH przez syntetyzowaną lokalnie Ang II [Adler S i Huang H, 2004]. Podwyższona ilość ROS pochodzących od NADPH i obniżona dostępność NO aktywuje kinazę Rho, która przez hamowanie fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny prowadzi do skurczu mięśniówki naczyń [Jin L *i wsp.*, 2006].

Najwięcej wolnych rodników przedostaje się do ściany naczynia z makrofagów i bez wątplenia właśnie te komórki odgrywają ważną rolę w patologicznych zmianach zachodzących w naczyniach [Cathcart MK, 2004]. Głównym wolnym rodnikiem w patologii naczyń jest $\cdot\text{O}_2^-$, który w schorzeniach naczyniowych pochodzi głównie z oksydazy NADPH [Mueller CF *i wsp.*, 2005]. Reagując z NO rodnik ten osłabia sygnał naczyniorozszerzający, a powstający w tej reakcji ONOO⁻ przyczynia się do uszkodzenia komórek [Beckman JS i Koppenol WH, 1996], co w efekcie skutkować może dysfunkcją śródbłonna.

Wzrost syntezy tlenu azotu w śródbłonku, obserwowany pośrednio w odpowiedzi na dietę wysokosodową u szczurów Wistar i SHR (Ryc. 24A) może więc być wynikiem nie tyle uruchomienia mechanizmu naczyniorozszerzającego, co mechanizmu

neutralizowania reaktywnych form tlenu, których powstawanie jest zintensyfikowane przy wzroście ciśnienia krwi. Sama zmiana produkcji NO w śródbłonku może świadczyć o właściwej reakcji na dietę wysokosodową, jednak długo utrzymująca się ekspozycja na wysoką podaż sodu może doprowadzić do dysfunkcji śródbłonka. Wydaje się jednak, że wzrost stężenia metabolitów NO w osoczu w odpowiedzi na dietę wysokosodową u szczurów SHR jest nieco niższy niż u szczurów Wistar (Ryc. 24A). Być może jest to związane z faktem, że stężenie reaktywnych form tlenu w małych naczyniach u szczurów SHR jest zawsze wyższe niż u zwierząt normotensyjnych [Kobayashi N *i wsp.*, 2005].

5.10. NGAL jako wskaźnik stanu zapalnego i specyficznego uszkodzenia kanalików bliższych

Rozwijająca się medycyna kliniczna i doświadczalna w ostatnich latach przyniosła opis wielu nowych zjawisk zachodzących w różnych stanach chorobowych nerek, dzięki nowym technikom dosyć łatwych do wykrycia w oparciu o badanie moczu. Oznaczanie wydalania albuminy, uznawane w klinice za złoty standard, coraz częściej nie spełnia współczesnych wymagań; zmiany w błonie podstawnej kłębuszków zachodzą znacznie wcześniej niż mikroalbuminuria [Narita T *i wsp.*, 2006]. Wykrycie upośledzenia czynności nerek na podstawie pomiarów klirensu kreatyniny możliwe jest dopiero po utracie ok. 50% ich funkcji [Nguyen MT i Devarajan P, 2008]. Opisanie wielu mechanizmów chorobowych i powiązanie ich z konkretnymi zmianami strukturalnymi w nerce wymaga znalezienia nowych, bardziej czułych, specyficznych, a także wczesnych substancji wskaźnikowych, które można oznaczać w moczu. W niniejszej rozprawie oznaczano wydalanie dwóch substancji z grona dobrych kandydatów na wskaźniki stanów chorobowych nerek: VEGF-A, wskazujący na uszkodzenia błony filtracyjnej kłębuszków, oraz NGAL, ujawniający zmiany w kanaliku bliższym. Obie te cząsteczki występują zarówno w moczu, jak i osoczu, lecz śledzenie ich zmian w obu tych płynach może przynosić informacje na temat odmiennych stanów chorobowych.

Ogólnoustrojowa (krążąca w osoczu) NGAL może pochodzić z wielu źródeł: być syntetyzowana w wątrobie, uwalniana z aktywowanych neutrofilii lub makrofagów, czy też z płytek miażdżycowych lub komórek śródbłonka wykazujących fenotyp prozapalny [Nguyen MT i Devarajan P, 2008]. W odpowiedzi na uszkodzenie nerek synteza NGAL pobudzana jest nie tylko w uszkodzonych kanalikach i lokalnie

aktywowanych neutrofilach, ale także systemowo (w wątrobie) [Małyszko J *i wsp.*, 2008], co znajduje odbicie w zawartości NGAL w osoczu. Będzie to jednak obraz znacznie mniej miarodajny niż ocena stężenia NGAL w moczu. By potwierdzić stan zapalny jako przyczynę wzrostu NGAL w osoczu, powinno się wykonać dodatkowo oznaczenie interleukiny 8 (IL-8). Wzrost stężenia obydwu wskaźników wskazywałby jednoznacznie na ogólnoustrojowy stan zapalny. Pomiędzy czterema grupami doświadczalnymi niniejszego projektu nie zauważono istotnych różnic w stężeniu NGAL w osoczu (Ryc. 23A). Statystycznie istotna różnica pomiędzy zwierzętami po diecie wysokosodowej (Wistar HS21 vs SHR HS21) wynika jedynie z przeciwstawnych słabych tendencji – u szczurów Wistar dieta wysokosodowa ujawnia tendencję do obniżania stężenia NGAL w osoczu, a u szczurów SHR – przeciwnie. Te słabe tendencje wskazują jednak na odmienną reakcję na dietę wysokosodową, co jest kolejną przesłanką wskazującą na zróżnicowanie mechanizmów zmian sodozależnych u szczurów Wistar i SHR.

Podobnie nie stwierdzono zauważalnych zmian zawartości tego wskaźnika w moczu (Ryc. 23B). NGAL, o którym pisze się, że jest jednym z doskonałych kandydatów na specyficzny i czuły marker uszkodzeń nerek [Nguyen MT i Devarajan P, 2008], wydaje się być nieużyteczny w odniesieniu do uszkodzeń zaistniałych wskutek wysokiej podaży sodu w diecie. Możliwe, że zmiany po 21 dniach są na tyle duże (co widać w korze – a więc i w kanalikach bliższych – szczurów SHR, Ryc. 13g), że w tym przedziale czasu zmiana w wydalaniu NGAL nie występuje. Rzeczywiście, wiele źródeł sugeruje użycie NGAL jako wskaźnika ostrego uszkodzenia nerek [Mishra J *i wsp.*, 2005; Wagener G *i wsp.*, 2006], jednakże pojawiają się również prace wykazujące zwiększone jego wydalanie przy znacznie dłuższym niż 21 dni obciążeniu nerek czynnikami uszkadzającymi [Ding H *i wsp.*, 2007; Mitsnefes MM *i wsp.*, 2007; Małyszko J *i wsp.*, 2008]. Interesujące byłoby zaobserwowanie, czy istnieją zmiany w wydalaniu NGAL w krótszych przedziałach czasowych, być może właśnie około dziesiątego dnia diety HS. Stwierdzony w tym dniu wzrost wydalania 8-izo-PGF₂ α mógłby bowiem być w jakiś sposób związany z działaniem NGAL; wykazano, że pacjenci z hemochromatozą (nadmierne wchłanianie żelaza z pożywienia) usuwają razem z moczem znacznie więcej 8-izoprostanu niż ludzie zdrowi [Kom GD *i wsp.*, 2006]. Duże dawki żelaza przyczyniają się do powstawania stresu oksydacyjnego, podczas którego formują się 8-izoprostany. NGAL, jako nośnik sideroforów, może odbierać od komórek nadmiar żelaza, z kolei nerki są kluczowym narządem, chroniącym organizm przed utratą żelaza. Zarówno

te powiązania z 8-izo-PGF2 α , jak i opisy udziału NGAL we wczesnych stadiach uszkodzenia kanalików nerkowych, przemawiałyby za tym, by w przyszłości określić wydalanie NGAL ok. 10. dnia diety wysokosodowej.

5.11. Indeks uszkodzenia kłębuszków i jego pozytywna korelacja z wydalaniem czynnika VEGF-A

Drugim wskaźnikiem biochemicznym z puli kandydatów do zastosowania w klinicyście, jaki oznaczano w moczu, był VEGF-A. Z wcześniejszych doniesień wynika, że jego stężenie w moczu, ale nie w osoczu, wzrasta na długo przed mikroalbuminurią [Kim NH *i wsp.*, 2004; Kim NH *i wsp.*, 2005]. Występujący w moczu VEGF-A jest produkowany głównie w nerkach przez komórki kłębuszka [Lenz T *i wsp.*, 2003; Cha DR *i wsp.*, 2004] oraz kanalików [Kim NH *i wsp.*, 2005]. Dotychczasowe prace nie zgłębiły jednak problemu na tyle, by ostatecznie określić użyteczność VEGF-A jako wskaźnika uszkodzenia błony filtracyjnej w praktyce klinicznej. Dlatego też w niniejszej pracy poszukiwano korelacji pomiędzy wartościami wydalanego VEGF-A a stopniem uszkodzenia kłębuszków.

Indeks uszkodzenia kłębuszków, wyliczony dla szczurów Wistar, wskazywał jedynie na niewielką tendencję wzrostową uszkodzenia tych struktur w odpowiedzi na dietę wysokosodową (Ryc. 12). Warto jednak pamiętać, że nawet niewielkie uszkodzenia błony filtracyjnej mogą być nieodwracalne. Tworzące ją podocyty są skrajnie wyspecjalizowanymi komórkami niezdolnymi do proliferacji. Spadek ich liczby, choć może zostać zrekompensowany zwiększeniem liczby wyrostków stopowatych, prowadzi bezpośrednio do białkomoczu oraz stwardnienia kłębuszków nerkowych (ang. *glomerulosclerosis*) [Shankland SJ, 2006]. Interesujące jest, że szczury SHR na diecie standardowej mają znacznie bardziej uszkodzone kłębuszki niż szczury Wistar na tej samej diecie (Ryc. 12). Ciśnienie skurczowe w tych dwóch grupach (mierzone w doświadczeniu chronicznym) było porównywalne (Ryc. 6). Być może jest to argument przemawiający za tym, że tego typu uszkodzenia strukturalne są pierwotne względem nadciśnienia tętniczego. U młodych SHR wzrost oporu naczyniowego w nerkach oraz przerost komórek mięśniówki ścian naczyń nerkowych pojawiał się już w 4. tygodniu życia, a więc przed pojawieniem się choroby nadciśnieniowej [Smeda *i wsp.*, 1988]. Obserwowano u nich również wzrost wrażliwości naczyń nerkowych na związki

naczyniokurczące, a także spadek przepływu rdzeniowego [Vyas SJ i Jackson EK, 1995; Sasajima H *i wsp.*, 1997]. Pojawienie się takich strukturalnych i funkcjonalnych zmian – zwłaszcza w tętniczkach doprowadzających kłębuszków – przed fazą rozwoju nadciśnienia oraz obecność zmian strukturalnych pomimo unormowania ciśnienia krwi sugeruje, że zmiany takie nie są następstwem podwyższonego ciśnienia, ale mogą być elementem przyczynowym prowadzącym do choroby nadciśnieniowej.

Ważnym zjawiskiem w regulacji filtracji kłębuszkowej jest zmiana średnicy tętniczki doprowadzającej. Wiadomo, że syntetyzowana lokalnie w nerkach Ang II wywiera specyficzne działanie naczyniokurczące wobec tętniczek doprowadzających, co prowadzi do rozwoju tzw. nadciśnienia kłębuszkowego [Palmer BF, 2001], a w dalszej perspektywie do białkomoczu wywołanego bądź przez zmiany w kapilarach kłębuszkowych (nadciśnienie i hipertrofia śródbłonna), bądź przez obkurczenie komórek mezangialnych, co zaburza krążenie wewnątrz-kłębuszkowe oraz przepuszczalność i selektywność błony filtracyjnej. Ponadto indukowany przez Ang II skurcz tętniczki odprowadzającej (znacznie słabszy niż doprowadzającej), dalszych naczyń zakłębuszkowych w korze oraz naczyń prostych (*vasa recta*) w rdzeniu mógłby prowadzić do retencji sodu, wzrostu objętości osocza i ciśnienia tętniczego krwi. W aspekcie długofalowym prowadzi to do przebudowy naczyń nerki, dalszego wzrostu oporu naczyniowego i powstania błędnego koła prowadzącego do coraz większego wzrostu ciśnienia krwi i do choroby nadciśnieniowej.

Wiadomo, że lokalne układy RAAS (np. wewnątrznerkowy) ulegają nadmiernej aktywacji w sytuacjach patologicznych, podczas gdy ogólnoustrojowy RAAS w wielu przypadkach (np. przy dużej podaży sodu w diecie) ulega częściowemu zahamowaniu. Takie zjawisko zachodzi także u szczurów SHR, u których obniżenie aktywności RAAS jest mechanizmem kompensującym nadciśnienie [Shiono K i Sokabe H, 1976]. Skurcz tętniczki doprowadzającej jest więc u szczurów SHR zjawiskiem powszechnym, związanym również z zaburzeniami aktywności wymiennika NCX (ang. *Na⁺/Ca²⁺ Exchanger*), który poprzez usuwanie jonów wapnia z komórki prowadzi do rozkurczu mięśniówki naczyń [Blaustein MP i Lederer WJ, 1999]. Jego aktywność jest wyższa w tętniczkach doprowadzających niż odprowadzających. U szczurów SHR aktywność NCX jest zahamowana zwłaszcza w tętniczkach doprowadzających, co prowadzi do ich skurczu [Bell PD *i wsp.*, 2000]. Taki skurcz obniża RBF oraz ładunek filtrowanego NaCl. W warunkach fizjologicznych działanie to znoszone jest przez naczyniorozszerzające

działanie tlenku azotu. W niniejszej pracy wartość całkowitego przepływu nerkowego u szczurów SHR nie była niższa w porównaniu do obserwowanej u szczurów Wistar (Ryc. 17), zaś ładunku filtrowanego sodu nie można określić bez oznaczenia GFR. Podobnie trudno mówić o kompensacyjnym działaniu NO, który, by rozszerzyć tętniczkę doprowadzającą, musiałby powstać lokalnie w aparacie przykłębuszkowym, co niekoniecznie uwidoczniłoby się w wydalaniu metabolitów NO. Wydaje się więc, że wzmocnienie lokalnego układu RAAS oraz zaburzenia w ekspresji wymienników jonowych mogą predysponować szczury SHR do większego uszkodzenia kłębuszków w odpowiedzi na dietę wysokosodową (Ryc. 11, 12). Uszkodzenie kłębuszków prowadzi do zmiany filtracji (GFR), co jest jednym z mechanizmów przyczyniających się do wzrostu tętniczego ciśnienia krwi [O'Connor PM i Cowley AW Jr, 2010]. Hipoteza mówiąca, że uszkodzenie kłębuszków może być pierwotne względem nadciśnienia tętniczego, pozwala wytłumaczyć większy wzrost skurczowego ciśnienia krwi u szczurów SHR niż u szczurów Wistar po 21 dniach diety wysokosodowej, pomimo zbliżonych wartości wyjściowych (Ryc. 6).

Końcowa analiza zebranych danych dowiodła, że indeks uszkodzenia kłębuszków (Ryc. 12) był silnie skorelowany z wydalaniem VEGF-A (Ryc. 26, 27). Zbliżone wartości wyjściowe (w obu grupach STD) wskazywałyby na zbliżoną wyjściową przepuszczalność błony filtracyjnej kłębuszków. Narażenie na wysoką podaż sodu w diecie prowadziło jednak do znacznie większego wzrostu stężenia VEGF-A w moczu u szczurów SHR niż Wistar (Ryc. 26). Wspomniano wcześniej, że u szczurów SHR poziom ekspresji TGF β 1 w nerce jest podwyższony [Xue H *i wsp.*, 2005]. Cytokina ta jest kluczowym czynnikiem w procesie włóknienia kłębuszków w wielu chronicznych schorzeniach nerek. TGF β uwalniany jest przez podocyty i działając lokalnie prawdopodobnie wpływa nie tylko na te komórki, ale też i na komórki mezangium [Lee HS i Song CY, 2009]. W ten sposób może indukować syntezę czynnika wzrostu tkanki łącznej (CTGF, *Connective Tissue Growth Factor*) oraz VEGF-A [Lee HS, 2011; Lee HS, 2012]. Cytowane wyżej badania wykazały u SHR delikatny rozrost mezangium oraz znacznie mniej gęstą sieć podocytów w porównaniu z normotensyjnymi szczurami Sprague-Dawley. Być może spowodowane jest to obniżoną ekspresją nefryny, białka przezłonowego obecnego w szczelinach między podocytami [Advani A *i wsp.*, 2007]; mutacje w nefrynie powodują przeciek białek do moczu. Wzrost ekspresji TGF β oraz nadmierna aktywność VEGF-A mogą wspólnie prowadzić do apoptozy [Kelly DJ *i wsp.*, 2007], co również może wpływać

na pozytywną korelację między wydalaniem VEGF-A i stanem kłębuszków, jednak ilości VEGF-A nie da się bezpośrednio przełożyć na jego biodostępność.

W opisany powyżej sposób, syntetyzowany w chronicznych uszkodzeniach nerek w podocytach TGF β , w krótkim czasie zwiększałby syntezę VEGF-A, a w dłuższym prowadził do białkomoczu. Obserwacja, że szczury SHR, odpowiadając na 21 dni diety wysokosodowej wzrostem wydalania VEGF-A (Ryc. 26) i powstaniem uszkodzenia w kłębuszkach (Ryc. 12) wpisuje się w tę hipotezę, dostarczając kolejnego dowodu, że pojawienie się większej ilości VEGF-A w moczu jest zapowiedzią wystąpienia białkomoczu. W ten sposób oznaczanie stężenia VEGF-A w moczu jawi się jako wskaźnik uszkodzenia kłębuszków wcześniejszy niż albuminuria.

5.12. Lokalizacja aktywności żelatynolitycznej (MMP2 + MMP9) w nerkach

Aktywność żelatynolityczną uwidaczniano za pomocą techniki zymografii żelatynowej *in situ*. Jest to metoda powszechnie uznawana za czułą technikę ilościowego obrazowania aktywności żelatynolitycznej [Gawlak M *i wsp.*, 2009; Wójcik-Stanaszek L *i wsp.*, 2011], jednak jak większość technik pomiarowych ma swoje ograniczenia. Z założenia sygnał żelatynolityczny powinien pochodzić jedynie od cząsteczek żelatynaz aktywowanych w organizmie żywym, jednakże procedura przygotowania skrawków może indukować aktywność jakiejś puli cząsteczek nieaktywnych, podobnie jak obserwuje się to w zymografii żelowej SDS-PAGE [Frederiks WM i Mook OR, 2004]. Rozwijanie i renaturacja białek zachodzące we fragmencie tkanki podczas przygotowania skrawka mogą ostatecznie skutkować odsłonięciem centrum aktywnego, w formach proenzymu normalnie zasłoniętego przez propeptyd [Woessner JF i Nagase H, 2000]. Dodatkowo w metodzie tej nie da się odróżnić aktywności MMP2 od aktywności MMP9; do dziś nie udało się uzyskać inhibitorów specyficznych dla jednej z żelatynaz, ponieważ wszystkie znane blokują, choć częściowo, aktywność obydwu. W celu odróżnienia aktywności tych dwóch enzymów można by ewentualnie zastosować znakowanie przeciwciałem skierowanym przeciwko jednemu z białek. Pomimo tych zastrzeżeń metodę tę przy zastosowaniu odpowiednich założeń można uznać za precyzyjną metodę ilościową.

By wykorzystać zdjęcia aktywności żelatynolitycznej skrawków do pomiarów ilościowych, stosowano się do poniższych wskazań: wyznakowane skrawki fotografowano

w stanie jak najświeższym (zaraz po wyschnięciu zamykacza do preparatów, na ogół następnego dnia) i porównywano tylko w obrębie skrawków znakowanych tego samego dnia. Następnie wykonując zdjęcia w pierwszej kolejności ustawiano ostrość (maksymalne świecenie) na jądra komórkowe. Ustawiając parametry fluorescencji żelatyny wzmacniano jej sygnał do maksymalnego możliwego poziomu: oprogramowanie Zen 2008 zliczało intensywność świecenia w skali szarości 0-255, wyświetlając punkty prześwietlone (poza skalą) jako czerwone; wzmocnienie sygnału odbywało się do momentu uzyskania pojedynczych punktów czerwonych. Tak uzyskane zdjęcia można było uznać za wiarygodne do wykorzystania w dalszej analizie ilościowej.

Aktywność żelatynolityczna na uzyskanych zdjęciach nie ograniczała się jedynie do macierzy zewnątrzkomórkowej; można ją było zaobserwować również w cytoplazmie (Ryc. 29a, 29b) oraz w jądrach komórek (Ryc. 31c, 32a). Pojawienie się aktywnych form żelatynaz w cytoplazmie można próbować tłumaczyć nieoczekiwaną aktywacją proenzymów obecnych w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego, gdzie enzymy te powstają i dojrzewają [Cauwe B i Opdenakker G, 2010] – nie jest to jednak jedyne możliwe wytłumaczenie. Opisano bowiem sytuację, w której niekompletna sekwencja sygnałowa na N-końcu cząsteczki MMP3 powodowała, że ostatecznie część jej cząsteczek nie trafiała do macierzy zewnątrzkomórkowej, a do cytozolu [Eguchi T *i wsp.*, 2008]. Istnieją również doniesienia, że niektóre MMP, w tym żelatynazy, mogą powracać do komórki na drodze endocytozy; rejon hemopeksynowy oraz domeny O-glikozylowane cząsteczki MMP9 wykazują silne powinowactwo do receptorów LPR-1 i LPR-2 (ang. *megalin/low-density Lipoprotein related Protein Receptor*), a zwiążanie z nimi może być czynnikiem wywołującym endocytozę [Van den Steen PE *i wsp.*, 2006]. MMP2, choć nie ma rejonów O-glikozylowanych, również wykazuje powinowactwo do receptorów LPR-1 [Hahn-Dantona E *i wsp.*, 2001]. Obydwie żelatynazy mogą ulegać endocytozie w kompleksach: MMP9 w kompleksie proMMP9-TIMP1 [Hahn-Dantona E *i wsp.*, 2001], a MMP2 w kompleksie z TIMP1 lub z trombospondyną [Yang Zi *wsp.*, 2001; Emonard H *i wsp.*, 2004]. Wchłonięte do komórki żelatynazy trafiają do wczesnych, umiarkowanie kwaśnych endosomów, których pH pozwala na oddysocjowanie cząsteczek enzymu z kompleksów [Cauwe B i Opdenakker G, 2010]. Dalsze mechanizmy działania MMP (po endocytozie) i ich funkcje budzą liczne wątpliwości.

Niewykluczone, że przetransportowane do cytoplazmy w endosomach cząsteczki żelatynaz mogą dalej trafić do jądra komórkowego, jest to jednak hipoteza wymagająca

rozstrzygnięcia kilku kluczowych problemów. Pierwszym z nich jest mechanizm opuszczenia endosomu przez żelatynazy. Badania nad bakteriami pozwoliły opisać kilka możliwych ścieżek ucieczki, m. in. formowanie porów w błonie endosomów, fuzja białek z tą błoną, zmiany konformacyjne oraz mechanizmy zależne i niezależne od pH [Matsuzawa T *i wsp.*, 2004; Ziello JE *i wsp.*, 2010; Varkouhi AK *i wsp.*, 2011]. Drugim problemem jest transport do jądra komórkowego. By jakkolwiek cząsteczka trafiła do konkretnego przedziału w komórce (w tym i do jądra), potrzebuje sekwencji sygnałowej, adresującej ją do miejsca przeznaczenia. Do tej pory brak jest dostatecznej ilości badań opisujących w jaki sposób odbywa się adresowanie i transport cząsteczek żelatynaz, jednak pojawiło się ostatnio doniesienie mówiące o istnieniu sekwencji lokalizacji jądrowej w obrębie proMMP2 [Sbai O *i wsp.*, 2010]. W tej samej publikacji sugeruje się również, że aktywność MMP2 jest potrzebna w ekspresji niektórych genów, a samo zjawisko proteolizy w transkrypcji może być znacznie powszechniejsze, niż do tej pory sądzono. Do chwili obecnej aktywność różnych MMP stwierdzono w jądrach wielu typów komórek: kardiomiocytów, neuronów, komórek śródbłonna, fibroblastów i hepatocytów [Cauwe B i Opendakker G, 2010; Hadler-Olsen E *i wsp.*, 2011].

Wśród czterech grup zwierząt aktywność jądrową zaobserwowano u szczurów Wistar: lokalnie w korze przyrdzeniowej w grupie STD (po diecie HS21 aktywność jądrowa zanikała), powszechnie w rdzeniu wewnętrznym u zwierząt na tej samej diecie (Ryc. 32a; po diecie HS21 również zanikała, Ryc. 32b). Wizualizacja aktywności żelatynolitycznej wskazywała na jej obecność na peryferiach jąder, tworząc charakterystyczną obwódkę (Ryc. 32a). U szczurów SHR aktywność jądrowa była obecna: powszechnie w rdzeniu zewnętrznym (Ryc. 31c; po diecie HS21 ulegała ograniczeniu, Ryc. 31d) i w rdzeniu wewnętrznym (Ryc. 32c; po diecie HS21 zanikała, Ryc. 32d). W rdzeniu wewnętrznym przypominała peryferyjną aktywność obecną u szczurów Wistar (Ryc. 32c), lecz w zewnętrznym była punktowa i skupiała się raczej w niewielkim obszarze jądra (Ryc. 31c). Biorąc pod uwagę hipotezę o udziale żelatynaz w transkrypcji genów można przypuszczać, że ich aktywność jest ważna w ekspresji genów głównie komórek rdzenia, a obciążenie organizmów wysoką podażą sodu w diecie owocuje zanikiem tej aktywności w rdzeniu wewnętrznym (u szczurów Wistar i SHR) lub ograniczeniem jej w rdzeniu zewnętrznym (u szczurów SHR). Może to prowadzić do zmiany profilu transkrypcyjnego komórek rdzenia zewnętrznego, co może być procesem fizjologicznym (modulacja mająca na celu ochronę struktur) lub patologicznym

(utrata ważnego elementu układu ekspresji genów). Zastanawiająca jest również różnica w rozmieszczeniu aktywności jądrowej – położonej na obrzeżach jąder (Ryc. 32a, 32c) lub występującej wyłącznie punktowo, co zdarzało się tylko u szczurów SHR (Ryc. 31c). Podsumowując, dieta wysokosodowa prowadziła zazwyczaj do zaniku aktywności jądrowej w tych miejscach, gdzie obserwowano ją u szczurów na diecie standardowej. Ta interesująca obserwacja mogłaby stanowić punkt wyjścia do kolejnych badań nad konsekwencjami diety wysokosodowej.

Aktywność jądrowa, obecna w kanalikach, nie została zaobserwowana w naczyniach krwionośnych kory. We wszystkich czterech grupach naczynia krwionośne wykazywały aktywność żelatynolityczną w obrębie wszystkich trzech warstw. Była to aktywność tak silna, że ustawienie maksymalnych wartości fluorescencji (wspomniane wcześniej śledzenie czerwonych punktów prześwietlenia) na struktury naczynia często powodowało odcięcie fluorescencji struktur sąsiednich (Ryc. 30a). Sugerować to może znacznie intensywniejszą aktywność żelatynolityczną w ścianach naczyń niż w strukturach kanalików.

Pozakomórkowa aktywność żelatynolityczna widoczna była w sieci naczyń kłębuszków. Jednak u szczurów Wistar zlokalizowana była ona raczej w obrębie struktur towarzyszących kłębuszkom (śródmiaższ, naczynia i kanaliki) (Ryc. 29a, 29b), podczas gdy u szczurów SHR aktywność w kłębuszku wyraźnie dominowała nad pozostałymi strukturami w polu widzenia (kanalikami i śródmiaższem; Ryc. 29c, 29d). W rdzeniu zewnętrznym wszystkich czterech grup zwierząt wyraźnie można było zaobserwować aktywność międzykomórkową, układającą się w charakterystyczne pasma (Ryc. 31), natomiast w rdzeniu wewnętrznym, zarówno u szczurów Wistar, jak i SHR, aktywność pozakomórkowa była bardziej wyrazista (kontrastowała z otoczeniem) dopiero po diecie wysokosodowej (Ryc. 32b, 32d).

Prawdopodobnie widoczne różnice w aktywności żelatynolitycznej struktur korowych leżących wokół kłębuszków (głównie kanalików) związane są z obserwowaną różnicą w ich morfologii – szczury SHR, które nawet bez działania diety wysokosodowej mają kanaliki korowe z cechami uszkodzenia (Ryc. 13a, 13g), nie wykazują aktywności żelatynolitycznej w odcinkach korowych kanalików (Ryc. 29c, 29d), bądź jest ona mniej powszechna. Być może jest to związane z toczącymi się procesami regeneracji tkanki, podczas których wzmożona aktywność żelatynolityczna często nie jest pożądana [Zimowska M *i wsp.*, 2012]. Takie ograniczenie aktywności żelatynolitycznej zmniejsza

również przepuszczalność naczyń krwionośnych, co również może być drogą przeciwdziałania widocznemu u szczurów SHR obrzękowi kanalików korowych (Ryc. 13a). Z kolei brak zmian w aktywności pomiędzy czterema grupami w macierzy zewnątrzkomórkowej w obszarze rdzenia zewnętrznego (Ryc. 31) pozostaje w zgodzie z brakiem zmian w VEGF-A w tej warstwie nerki (Ryc. 28a-28d). Z pewnością ma to swoje konsekwencje zarówno w utrzymaniu poziomu uwalniania VEGF-A, jak i zachowaniu jego receptorów VEGFR2. Ta kwestia poruszona zostanie w Rozdz. 5.13. Aktywność cytoplazmatyczna kanalików rdzenia wewnętrznego w obydwu grupach STD (Ryc. 32a, 32c) jest prawdopodobnie artefaktem (o czym pisano powyżej). Wskazywać może jednak na pozyskiwanie aktywnych cząsteczek MMP z przestrzeni pozakomórkowej i kierowanie ich dalej, do jąder komórkowych. Po diecie wysokosodowej zanika nie tylko aktywność jądrowa, ale i cytoplazmatyczna (Ryc. 32b, 32d), co może sugerować ustanie procesu endocytozy.

5.13. Lokalizacja VEGF-A w strukturach nerki i jego powiązania z aktywnością żelatynolityczną

Wykorzystując technikę immunohistochemiczną do lokalizacji VEGF-A pokazano zmiany w zasięgu występowania białka w zależności od podaży sodu w diecie. We wszystkich czterech grupach dało się zaobserwować wyznakowanie przeciwko VEGF-A jedynie w obrębie kanalików; nie obserwowano znakowania w wiążkach naczyń prostych rdzenia zewnętrznego, czy też w przestrzeni pozakomórkowej (Ryc. 28a-28d). Synteza VEGF-A w kanalikach wydaje się być ograniczona jedynie do segmentów S3 kanalików bliższych i grubego odcinka ramienia wstępującego pętli nefronu w zewnętrznej warstwie rdzenia [Kang DH *i wsp.*, 2001a; Kang DH *i wsp.*, 2001b]. Dlatego też wyznakowanie komórek prawdopodobnie nie jest związane z syntezą białka VEGF-A w cytoplazmie, lecz efektem związania form VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, i/ lub VEGF₂₀₆ z błoną komórkową tych komórek [Houck KA *i wsp.*, 1992; Park JE *i wsp.*, 1993].

Stosunkowo nowe doniesienia mówią o wzroście ekspresji VEGF-A w kłębuszkach w odpowiedzi na nadciśnienie [Ziyadeh FN, 2008], jednak w niniejszej pracy znakowania przeciwko VEGF-A w kłębuszkach nie zaobserwowano. Obraz kory podobny był we wszystkich czterech grupach: białko VEGF-A pojawiało lokalnie w kanalikach korowych, ale nie w kłębuszkach. Być może bezpośrednio po zsyntetyzowaniu przez

komórki kłębuszka białko to nie wiązało się ze strukturami okołokomórkowymi, tylko pozostawało rozpuszczone w płynie pozakomórkowym, dynamicznie zmieniając swoje położenie. Zgadzałoby się to z obrazem aktywności żelatynolitycznej – obecna w kłębuszkach (Ryc. 29) i cytoplazmie od strony podstawnobocznej komórek kanalików korowych (Ryc. 30) mogłaby sprzyjać uwalnianiu VEGF-A. W rdzeniu zaś, gdzie obraz aktywności żelatynolitycznej jest inny (Ryc. 31, 32), obserwuje się wyraźne wyznakowanie przeciwko VEGF-A (Ryc. 28). Co więcej, obecność VEGF-A w moczu, skorelowana ze stopniem uszkodzenia kłębuszków, może sugerować udział aktywności żelatynolitycznej w uwalnianiu tego czynnika w kłębuszkach.

Rdzeń wewnątrz szczurów z grupy Wistar STD zawierał zdecydowanie najwięcej struktur kanalikowych wyznakowanych przeciwko VEGF-A w porównaniu z pozostałymi grupami (Ryc. 28i); kolejne grupy cechowały się wyznakowaniem znacznie mniejszej liczby odcinków kanalików, jednak zawsze wyznakowane pozostawały kanaliki zbiorcze (Ryc. 28j-28l). To właśnie odcinki kanalików zbiorczych położone w rejonie rdzenia wewnętrznego są najważniejszym źródłem NO w rdzeniu nerki [Wu F *i wsp.*, 1999]. Obecność VEGF-A w tych kanalikach jest niezbędna dla funkcjonowania osi VEGF-A/NO. Oddziaływania te są ważne w utrzymaniu odporności rdzenia na naczyniokurczący bodziec Ang II (w nadciśnieniu sodozależnym syntetyzowanej lokalnie), przeciwstawiając mu naczyniorozszerzające działanie NO. Dzięki temu możliwe jest zachowanie sprawnego procesu diurezy i natriurezy z nadciśnienia [O'Connor PM i Cowley AW Jr, 2010], a wzmożone na diecie wysokosodowej wydalanie sodu wymusza utrzymanie działania tego mechanizmu na wyższym poziomie. Z kolei cienkie i grube odcinki pętli nefronu wykazują najniższą spośród struktur rdzeniowych produkcję NO [Wu F *i wsp.*, 1999]. Utrata wyznakowania przeciwko VEGF-A, jaka w nich występuje (Ryc. 28j-28l), może więc nie wiązać się ze zjawiskiem natriurezy z nadciśnienia, lecz nadal pozostawać w związku z pojawiającymi się uszkodzeniami; VEGF-A bowiem jest kluczowym czynnikiem utrzymującym strukturę kanalików. Zanik wyznakowania przeciwko VEGF-A w wewnątrzrdzeniowych odcinkach pętli nefronu być może wiąże się z upośledzeniem procesów zagęszczania moczu. Tak więc utrzymanie obecności VEGF-A w kanalikach zbiorczych rdzenia wewnętrznego może przyczyniać się do prawidłowego funkcjonowania procesu natriurezy z nadciśnienia (Ryc. 22B), pomimo niepokojących zmian krążeniowych (Ryc. 19A) i morfologicznych (Ryc. 14, 15) w rdzeniu. Jednakże

po raz kolejny widać, że pomimo zachowania sprawnego mechanizmu natriurezy z nadciśnienia ciśnienie krwi tętniczej nie jest zachowane w fizjologicznych granicach.

Podobny kierunek zmian zawartości VEGF-A w tkance w warunkach zwiększonej podaży sodu zaobserwowano u szczurów Sprague-Dawley; 8 tygodni diety HS obniżało w nerce ekspresję VEGF-A o połowę, a ilość białka o 25% [Gu JW *i wsp.*, 2008]. Ponieważ SBP u zwierząt po diecie wysokosodowej w tym doniesieniu było istotnie wyższe niż u zwierząt na diecie standardowej dopiero od 6 tygodnia doświadczenia, a więc znacznie później niż u szczurów Wistar wykorzystanych w niniejszym projekcie (Ryc. 6), można przypuszczać, że efekt ten mógł być u szczurów Wistar obserwowany znacznie wcześniej. Wydaje się, że obniżenie ekspresji VEGF-A było zjawiskiem niekorzystnym, bowiem w 8. tygodniu doświadczenia nie tylko czterokrotnie spadała ilość białka, ale także czterokrotnie rosło wydalanie sVEGFR1, endogennego inhibitora VEGF-A [Gu JW *i wsp.*, 2008]. Autorzy tych badań wysuwają hipotezę, że zwiększenie usuwania inhibitora może być w tym przypadku czynnikiem ochronnym, zwiększającym biodostępność VEGF-A. Z drugiej jednak strony wzrost wydalania może pośrednio dowodzić czegoś przeciwnego do zjawiska zwiększania ilości tego inhibitora w organizmie, a mianowicie blokowania aktywności VEGF-A w odpowiedzi na dietę wysokosodową.

Interesujące jest, że u szczurów Wistar nie ma różnicy w wyznakowaniu przeciwko VEGF-A w obszarze rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego na diecie STD (Ryc. 28a, 28i), a pojawia się ona w następstwie diety wysokosodowej (Ryc. 28b, 28j). Jest to zupełnie odmienna sytuacja niż w przypadku liczby jąder w poszczególnych warstwach rdzenia, która jest różna na diecie standardowej, a staje się porównywalna po diecie HS21 (Ryc. 14A). U szczurów SHR niezależnie od diety występuje różnica w wyznakowaniu przeciwko VEGF-A między warstwami rdzenia (Ryc. 28c, 28k, 28d, 28l) i zarazem brak różnicy w liczbie jąder w poszczególnych warstwach.

Zlokalizowane w macierzy zewnątrzkomórkowej cząsteczki VEGF-A są na ogół związane z jej elementami strukturalnymi, a ich uwalnianie jest zależne od enzymów modelujących strukturę macierzy. Nawet rozpuszczalne formy VEGF-A (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅) są częściowo związane z uwięzioną w sieci włókien macierzy zewnątrzkomórkowej heparyną [Raffetto JD i Khalil RA, 2008]. Z kolei receptory błonowe dla VEGF-A tworzą z integrzynami (receptorami kluczowymi w oddziaływaniach komórek z macierzą zewnątrzkomórkową) na powierzchni komórek lokalne platformy. W układzie tych oddziaływań kluczowa jest aktywność MMP9, która z jednej strony

uwalnia VEGF-A z rezerwuaru [Belotti D *i wsp.*, 2003; Rundhaug JE, 2005], a z drugiej strony może ciąć jego receptory, ograniczając siłę jego sygnału [Tran E *i wsp.*, 2010]. Zmniejszenie aktywności żelatynolitycznej mogłoby więc chronić receptory dla VEGF; występujące równocześnie ograniczenie uwalniania tego czynnika z macierzy zewnątrzkomórkowej mogłoby zostać skompensowane przez inne proteazy. Tłumaczyłoby to sytuację, w której u szczurów Wistar i SHR w odpowiedzi na dietę wysokosodową aktywność żelatynolityczna w rdzeniu zewnętrznym, ważnym obszarze o dużym metabolizmie, została ograniczona (Ryc. 33B). W pozostałych jednak warstwach nerki reakcja na dietę wysokosodową była odmienna u dwóch badanych stad szczurów – podczas gdy u szczurów Wistar obserwowano tendencję spadkową w korze i rdzeniu wewnętrznym, u szczurów SHR aktywność żelatynolityczna w tych obszarach subtelnie rosła (Ryc. 33B).

Porównując ze sobą zwierzęta nie obciążone wysoką podażą sodu w diecie łatwo zauważyć wyjściową większą aktywność żelatynolityczną w rdzeniu zewnętrznym (na granicy istotności – nie zaznaczono na rycinie) i wewnętrznym (Ryc. 33B) u SHR. Kolejna różnica dotyczy również rdzenia zewnętrznego, w którym u szczurów SHR w odpowiedzi na dietę wysokosodową dochodzi do bardzo wyraźnego obniżenia aktywności żelatynolitycznej (Ryc. 33B). Jest to zmiana tak znaczna, że aktywność tej warstwy nerki zaczyna odróżniać się wyraźnie od kory i rdzenia zewnętrznego, choć w pozostałych trzech grupach aktywność trzech warstw nerki była porównywalna (Ryc. 33A). Można sugerować, że obniżenie aktywności żelatynaz w OM szczurów SHR w odpowiedzi na wysoką podaż sodu pozostaje w związku przyczynowo-skutkowym ze zmianami ukrwienia rdzenia w tym rejonie; stosunek ukrwienia dwóch warstw rdzenia (OMBF/IMBF) jest przede wszystkim efektem obniżenia przepływu przez rdzeń zewnętrzny przy braku jakichkolwiek zmian w ukrwieniu strefy wewnętrznej rdzenia (Ryc. 19B). Możliwe, że obniżenie aktywności żelatynaz wpływa niekorzystnie na przepływ krwi w tym rejonie. Jednakże w wielu przypadkach ograniczenie aktywności żelatynaz może mieć działanie zachowawcze względem naczyń krwionośnych; doświadczalne blokowanie aktywności MMP2 i MMP9 prowadziło do zagęszczenia sieci małych naczyń krwionośnych u szczurów SHR [Tran E *i wsp.*, 2010]. Wydaje się, że nadmierna aktywność żelatynolityczna w angiogenezie jest niekorzystna, zmniejsza bowiem stabilność nowopowstałych naczyń oraz zwiększa ich przepuszczalność, ułatwiając rozwój stanów zapalnych. W ten sposób zmiany aktywności w rdzeniu

zewnątrznym byłyby skutkiem, a nie przyczyną spadku przepływu krwi. W tej grupie (SHR HS21) obserwuje się również największe wydalanie VEGF-A (Ryc. 26), co może sugerować zwiększenie jego uwalniania. Można to traktować jako sygnał mający pozytywny wpływ na utrzymanie naczyń i kanalików, jednak regulacja biodostępności VEGF-A jest bardzo złożona.

Badania nad udziałem hipoksji w postępie i kierunku rozwoju chronicznych schorzeń nerek (model nerki szczątkowej) wykazały, że rejony niedotlenienia pojawiały się najpierw w rdzeniu zewnętrznym, ulegały rozprzestrzenieniu na obszar kory w pierwszym tygodniu i stawały się coraz bardziej wyraziste w czwartym tygodniu po wystąpieniu niedotlenienia [Tanaka T *i wsp.*, 2006]. Utrzymujące się niedotlenienie może prowadzić do odróżnicowania komórek śródmiąższu w miofibroblasty, które predysponują narząd do rozwoju zwłóknienia [Manotham K *i wsp.*, 2004], podobnie jak spadek aktywności MMP2 i MMP9. Zwłóknienie takie u szczurów Wistar na diecie wysokosodowej widoczne było w 28. dniu diety (dane nie pokazane). Być może spadek aktywności żelatynolitycznej, który u szczurów Wistar jest jedynie słabą tendencją, ale występującą w trzech warstwach nerki, po 28 dniach diety wysokosodowej jest już na tyle znaczący, że prowadzi do kumulacji elementów strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej.

VEGF-A nie jest jedynym obecnym w nerce czynnikiem chroniącym strukturę kanalików. Inny czynnik, NGAL, pozostaje także w silnym związku z MMP9 – wiążąc cząsteczki MMP9 utrudnia ich degradację. W ten sposób może zwiększać aktywność żelatynolityczną. Brak zmian wydalania NGAL sugeruje jednak, że w zastosowanych modelach nie odgrywa on ważnej roli w sterowaniu aktywnością żelatynaz.

6. Podsumowanie

Opisane różnice pojawiające się pomiędzy poszczególnymi grupami pozwalają sądzić, że charakter zmian i mechanizmy kształtowania ciśnienia krwi tętniczej w odpowiedzi na wysoką podaż sodu są odmienne u szczurów Wistar i szczurów SHR. Ostatecznie wyższe wartości SPB stwierdzano u szczurów SHR, jednak to u szczurów Wistar obserwowano kumulację sodu w osoczu. Wskazuje to, że sód, także w inny sposób niż tylko za pośrednictwem wysokiego stężenia w krwi krążącej, prowadzi do zmian przekładających się na wzrost tętniczego ciśnienia krwi. Zachowanie (jak się wydaje prawidłowego) procesu natriurezy z nadciśnienia nie jest jednak wystarczające, by utrzymać ciśnienie krwi w fizjologicznych granicach.

Szczury SHR już wyjściowo miały znacznie bardziej zniszczone kłębuszki niż szczury Wistar. Korowa aktywność żelatynolityczna na diecie STD była porównywalna u obydwu grup, jednak odpowiedź na dietę wysokosodową ujawniała przeciwstawne tendencje – spadkową u szczurów Wistar, a wzrostową u SHR. Kluczowe zmiany, a zarazem różnice między początkowo normotensyjnymi szczurami Wistar, a obciążonymi genetycznymi predyspozycjami SHR, zarysowały się w rdzeniu nerki. U szczurów Wistar zarysowywała się, już na początku obserwacji, różnica w liczbie komórek między dwiema warstwami rdzenia (OM > IM), która zanikała w trakcie ekspozycji na dietę. Równocześnie, wyznakowanie przeciwko VEGF-A, początkowo jednakowe w obu obszarach rdzenia, zmniejszało swój zasięg w IM. Aktywność żelatynolityczna wykazywała niewielką tendencję spadkową, lecz porównywalna była w obydwu warstwach. U szczurów SHR STD nie było różnicy w liczbie komórek obydwu warstw, natomiast od początku istniała wyraźna różnica w wyznakowaniu OM i IM przeciwko VEGF-A na korzyść rdzenia zewnętrznego. Aktywność żelatynolityczna w odpowiedzi na dietę HS zmieniała się tylko w obrębie OM. Różnice w budowie rdzenia pozostawały w związku z różnicami w ukrwieniu tego obszaru nerki; stosunek ukrwienia OMBF/IMBF pozostawał co prawda zbliżony, jednak u szczurów Wistar w odpowiedzi na wysoką podaż sodu w diecie obniżał się poprzez izolowany wzrost IMBF, a u szczurów SHR przez spadek OMBF. Jest to kolejna przesłanka wskazująca na kluczowy udział przepływu rdzeniowego w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi, z dodatkowym wskazaniem na możliwe powiązania z aktywnością żelatynolityczną, czy obecnością VEGF-A.

Przedstawione powyżej rozważania można zawrzeć w kilku punktach:

1. Wysoka podaż sodu w diecie prowadzi u szczurów normotensyjnych (Wistar) i szczurów ze spontanicznym nadciśnieniem tętniczym (SHR) do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej.
2. Zależne od sodu zmiany strukturalne i czynnościowe w nerce poprzedzają wystąpienie wzrostu ciśnienia krwi u szczurów Wistar (dzień 10.) co sugeruje, że są przyczyną, a nie następstwem nadciśnienia.
3. U szczurów Wistar stosunek ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego obniża się wraz z długością stosowania diety. Zmiany te przebiegają podobnie u SHR, jednak obniżenie OMBF/IMBF u szczurów Wistar zależy od wzrostu przepływu wewnątrzrdzeniowego, a u szczurów SHR od obniżenia przepływu zewnątrzrdzeniowego.
4. Obniżenie aktywności żelatynolitycznej w rdzeniu zewnętrznym oraz spadek liczby komórek w tym obszarze mogą być konsekwencją lub przyczyną obniżenia ukrwienia tego obszaru u szczurów SHR; nie obserwuje się podobnego związku u szczurów Wistar.
5. Obniżona immunoreaktywność VEGF-A w IM charakteryzująca szczury spontanicznie nadciśnieniowe (SHR), a pojawiająca się pod wpływem diety HS u szczurów wyjściowo normotensyjnych (Wistar), może wskazywać, że zaburzenie lokalizacji VEGF-A w rdzeniu wewnętrznym jest czynnikiem sprzyjającym rozwojowi nadciśnienia.
6. Wydalanie VEGF-A jest silnie skorelowane ze stopniem uszkodzenia kłębuszków nerkowych.

7. Wnioski

1. Wzrost ciśnienia krwi tętniczej w odpowiedzi na wysoką podaż sodu jest (szczury Wistar) lub nie jest (SHR) związany z nagromadzeniem jonów sodowych w osoczu.
2. U szczurów Wistar dość wcześnie (około 10. dnia stosowania diety) procesy związane ze wzrostem stężenia sodu w osoczu oraz ze stresem oksydacyjnym zależnym od wysokiej podaży sodu prowadzą do zainicjowania nieodwracalnych lub trudno odwracalnych zmian w krążeniu nerkowym.
3. Kluczowe zmiany czynnościowe w nerkach szczurów na diecie wysokosodowej zachodzą w obszarze rdzenia.
4. Lokalne zmiany immunoreaktywności (VEGF-A, PCNA) lub aktywności białek (MMP2, MMP9) zachodzące w rdzeniu nerki również wskazują na kluczowe znaczenie tego obszaru w rozwoju nadciśnienia sodozależnego.
5. Być może ograniczone występowanie VEGF-A w rdzeniu wewnętrznym u szczurów SHR predysponuje je do rozwoju nadciśnienia.
6. Silna pozytywna korelacja wydalania VEGF-A z moczem i stopnia uszkodzenia kłębuszków nerkowych przemawia za przydatnością oznaczania tej substancji w moczu jako wskaźnika uszkodzenia nerek w testach klinicznych.

Niniejsze badania były częściowo finansowane z grantu „Znaczenie redystrybucji ukrwienia w obrębie rdzenia nerki szczura dla rozwoju nadciśnienia tętniczego” (NN 401225634).

8. Piśmiennictwo

1. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. 2007. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *Journal of Neuroscience*, 27: 1129-1138.
2. Adler S, Huang H. 2004. Oxidant stress in kidneys of spontaneous hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 287: F907-F913.
3. Advani A, Kelly DJ, Advani SL, Cox AJ, Thai K, Zhang Y, White KE, Gow RM, Marshall SM, Steer BM, Marsden PA, Rakoczy PE, Gilbert RE. 2007. Role of VEGF in maintaining renal structure and function under normotensive and hypertensive conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (36): 14448-14453.
4. Akool el-S, Doller A, Müller R, Gutwein P, Xin C, Huwiler A, Pfeilschifter J, Eberhardt W. 2005. Nitric oxide induces TIMP-1 expression by activating the transforming growth factor beta-Smad signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 39403-39416.
5. Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Förstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W. 2003. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 4901-4916.
6. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, Albuquerque RJ, Richter E, Sakurai E, Newcomb MT, Kleinman ME, Caldwell RB, Lin Q, Ogura Y, Orecchia A, Samuelson DA, Agnew DW, St Leger J, Green WR, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Kwan D, Marsh H, Ikeda S, Leiper LJ, Collinson JM, Bogdanovich S, Khurana TS, Shibuya M, Baldwin ME, Ferrara N, Gerber HP, De Falco S, Witta J, Baffi JZ, Raisler BJ, Ambati J. 2006. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*, 443: 993-997.
7. Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB. 1996. A novel mechanism of action of tetracyclines: effect on nitric oxide syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 14014-14019.
8. An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, Wang HD. 2007. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-I expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovascular Research*, 75: 702-709.
9. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. 2004. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 286: C779-C784.
10. Aviv A. 2001. Salt and hypertension: the debate that begs the bigger question. *Archives of internal medicine*, 161: 507-510.

11. Bacallao R, Fine LG. 1989. Molecular events in the organisation of renal tubular epithelium: from nephrogenesis to regeneration. *American Journal of Physiology*, 363: F913-F924.
12. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. 1995. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *American Journal of Physiology*, 268: F885-F898.
13. Badr KF, Abi-Antoun TE. 2005. Isoprostanes and the kidney. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7: 236-243.
14. Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M. 1985. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *American Journal of Physiology*, 248: F522-F526.
15. Bahmani P, Halabian R, Rouhbakhsh M, Roushandeh AM, Masroori N, Ebrahimi M, Samadikuchaksaraei A, Shokrgozar MA, Roudkenar MH. 2010. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin induces the expression of heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1, 2. *Cell Stress & Chaperones*, 15 (4): 395-403.
16. Barba G, Vallance PJ, Strazzullo P, MacAllister RJ. 2000. Effects of sodium intake on the pressor and renal responses to nitric oxide synthesis inhibition in normotensive individuals with different sodium sensitivity. *Journal of Hypertension*, 18: 615-621.
17. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR. 2008. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-I, a novel VEGF inhibitor. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 294: F928-F936.
18. Bastin J, Cambon N, Thompson M, Lowry OH, Burch HB. 1987. Change in energy reserves in different segments of the nephron during brief ischemia. *Kidney International*, 31: 1239-1247.
19. Baylis C, Bloch J. 1996. Nitric oxide (NO) in renal physiology and pathophysiology. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 11: 1955-1957.
20. Baylis C, Mitruka B, Deng A. 1992. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 278-281.
21. Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*, 5: C1424-C1437.
22. Bell PD, Mashburn N, Unlap MT. 2000. Renal sodium/calcium exchange; a vasodilator that in salt-sensitive hypertension. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168: 209-214.
23. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Research*, 63 (17): 5224-5229.

24. Blaustein MP, Lederer WJ. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79: 763-854.
25. Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Coca A. 2001. Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*, 37: 444-448.
26. Beierwaltes WH. 1995. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. *American Journal of Physiology*, 269: F134-F139.
27. Benbow U, Brickerhoff CE. 1997. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biology*, 15: 519-526.
28. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2: 737-744.
29. Bevan JA. 1993. A low regulation of vascular tone. *Hypertension*, 22: 273-281.
30. Brewster LM, Berentzen CA, van Montfrans GA. 2011. High salt meals in staff canteens of salt policy makers: observational study. *BMJ*, 343: d7352.
31. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefański A, Dussaulte JC, Chatziantoniou C. 2003. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *Journal of American Society of Nephrology*, 14: 1132-1144.
32. Brezis M, Heyman SN, Epstein FH. 1994. Determinants of intrarenal oxygenation. II. Hemodynamic effects. *American Journal of Physiology*, 267: F1063-F1068.
33. Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. 2005. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *Journal of Vascular Research*, 42: 415-423.
34. Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. 2009. Salt intakes around the world: implications for public health. *International Journal of Epidemiology*, 38: 791-813.
35. Cabral PD, Silva GB, Baigorria ST, Juncos LA, Juncos LI, García NH. 2010. 8-iso-prostaglandin-F2 α stimulates chloride transport in thick ascending limbs; role of cAMP and protein kinase A. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 299: F1396-F1400.
36. Campese VM, Amar M, Anjali C, Medhat T, Wurgaft A. 1997. Effect of L-arginine on systemic and renal haemodynamics in salt-sensitive patients with essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 11: 527-532.
37. Campese VM, Tawadrous M, Bigazzi S, Bianchi S, Mann AS, Oparil S, Raij L. 1996. Salt intake and plasma atrial natriuretic peptide and nitric oxide in hypertension. *Hypertension*, 28: 335-340.

38. Cao R, Ji H, Feng N, Zhang Y, Yang X, Andersson P, Sun Y, Tristaris K, Hansen AJ, Dissing S, Cao Y. 2012. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (39): 15894-15899.
39. Carey RM, Siragy HM. 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*, 24 (3): 261-271.
40. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle & Nerve*, 29: 191-197.
41. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380 (6573): 435-439.
42. Cathcart MK. 2004. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1: 23-28.
43. Cauwe B, Opdenakker G. 2010. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45 (5): 351-423.
44. Chade AR. 2012. VEGF: Potential therapy for renal regeneration. *Medicine Reports*, 4: 1.
45. Cha DR, Kang YS, Han SY, Jee YH, Han KH, Han JY, Kim YS, Kim NH. 2004. Vascular endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats. *Journal of Endocrinology*, 183 (1): 183-194.
46. Chatziantoniou C, Boffa JJ, Ardaillou R, Dussaule JC. 1998. Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice. Role of endothelin. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 2780-2789.
47. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. 2006. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB Journal*, 20: 1898-1900.
48. Chew DKW, Conte MS, Khalil RA. 2004. Matrix metalloproteinase-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction. *Journal of Vascular Surgery*, 40: 1001-1010.
49. Cho A, Reidy MA. 2002. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circulation Research*, 91: 845-851.
50. Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. 2000. Mechanism of transforming growth factor- β_1 -induced expression of vascular endothelial growth factor in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1497: 69-76.

51. Chung AW, Hsiang YN, Matzke LA, McManus BM, van Breemen C, Okon EB. 2006. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. *Circulation Research*, 99: 140-148.
52. Chung AW, Booth AD, Rose C, Thompson CR, Levin A, van Breemen C. 2008. Increased Matrix Metalloproteinase 2 Activity in the Human Internal Mammary Artery Is Associated With Ageing, Hypertension, Diabetes, and Kidney Dysfunction. *Journal of Vascular Research*, 45: 357-362.
53. Chu X, Ageishi Y, Nishimura K, Jisaka M, Nagaya T, Shono F, Yokota K. 2009. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for 8-iso-prostaglandin F_{2α}, a biomarker of oxidative stress in vivo, and its application to the quantification in aged rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50: 911-916.
54. Connolly KM, Bogdanffy MS. 1993. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: A dual-stain comparison with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Journal of Cytochemistry and Histochemistry*, 41: 1-6.
55. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. 1998. Matrix metalloproteinases generate angiostatin. Effects on neovascularization. *Journal of Immunology*, 161: 6845-6852.
56. Cowley AW Jr. 2008. Renal Medullary Oxidative Stress, Pressure-Natriuresis, and Hypertension. *Hypertension*, 52 (5): 777-786.
57. Cowley AW Jr, Mattson DL, Lu S, Roman RJ. 1995. The renal medulla and hypertension. *Hypertension*, 25: 663-673.
58. Cowley AW, Roman RJ, Fenoy FJ, Mattson DL. 1992. Effect of renal medullary circulation on arterial pressure. *Journal of Hypertension: Supplement*, 10 (7): S187-S193.
59. Cubeddu LX, Alfieri AB, Hoffmann IS, Jimenez E, Roa CM, Cubeddu R, Palermo C. 2000. Nitric oxide and salt sensitivity. *American Journal of Hypertension*, 13: 973-979.
60. Davies M, Thomas G, Martin J, Lovett DH. 1988. The purification and characterization of a glomerular-basement-membrane-degrading neutral proteinase from rat mesangial cells. *Biochemical Journal*, 251: 431-438.
61. Deng X, Welch WJ, Wilcox CS. 1996. Role of nitric oxide in short-term and prolonged effects of angiotensin II on renal hemodynamics. *Hypertension*, 27 (5): 1173-1179.
62. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo S, Montagna L, Gravina A, Ferrari I, Galli S, Paniga S, Tinelli C, Cicero AF. 2006. Matrix metalloproteinase-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium*, 13: 227-231.

63. Devarajan P. 2007. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Therapy*, 5 (B): 463-470.
64. De Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. 2001. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *Journal of American Society of Nephrology*, 12: 993-1000.
65. Dickhout JG, Mori T, Cowley AW Jr. 2002. Tubulovascular Nitric Oxide Crosstalk: Buffering of Angiotensin II-Induced Medullary Vasoconstriction. *Circulation Research*, 91: 487-493.
66. Ding H, He Y, Li K, Yang J, Li X, Lu R, Gao W. 2007. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clinical Immunology*, 123: 227-234.
67. Dixelius J, Mäkinen T, Wirzenius W, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, Claesson-Welsh L. 2003. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 40973-40979.
68. Dor Y, Porat R, Keshet E. 2001. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280 (6): C1367-C1374.
69. Eberhardt W, Akool el-S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J. 2002. Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 33518-33528.
70. Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. 2008. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 28 (7): 2391-2413.
71. Emonard H, Bellon G, Troeberg L, Berton A, Robinet A, Henriot P, Marbaix E, Kirkegaard K, Patthy L, Eeckhout Y, Nagase H, Hornebeck W, Courtoy PJ. 2004. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2/TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (52): 54944-54951.
72. Ergul A, Portik-Dobos V, Hutchinson J, Franco J, Anstadt MP. 2004. Downregulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*, 17: 775-782.
73. Escobales N, Crespo MJ. 2005. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Current Vascular Pharmacology*, 3 (3): 231-246.

74. Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W. 2005. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (21): 9350-9359.
75. Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, Hurwitz H, Coffman TM. 2009. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (Vegfr2) Controls Blood Pressure by Regulating Nitric Oxide Synthase Expression. *Hypertension*, 54 (3): 652-658.
76. Fainaru O, Adini I, Benny O, Bazinet L, Pravda E, D'Amato R, Folkman J. 2008. Doxycycline induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and prevents vascular hyperpermeability. *FASEB Journal*, 22: 3728-3735.
77. Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, Chatziantoniou C, Tedgui A, Dussaulte JC, Lehoux S. 2007. Matrix Metalloproteinases in Early Hypertensive Vascular Remodeling. *Journal of the American Heart Association*, 50: 212-218.
78. Flyvbjerg A, Dagnaes-Hansen F, De Vriese AS, Schrivjers BF, Tilton RG, Rasch R. 2002. Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. *Diabetes*, 51: 3090-3094.
79. Folkow B, Grimby G, Thulesius O. 1958a. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. *Acta Physiologica Scandinavica*, 44: 255-272.
80. Folkow B, Johansson B, Oberg B. 1958b. The stimulation threshold of different sympathetic fibre groups as correlated to their functional differentiation. *Acta Physiologica Scandinavica*, 44 (2): 146-156.
81. Foster RR. 2009. The Importance of Cellular VEGF Bioactivity in the Development of Glomerular Disease. *Nephron. Experimental Nephrology*, 113: e8-e15.
82. Frederiks WM, Mook OR. 2004. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52 (6): 711-722.
83. Friedman SM, McIndoe RA, Tanaka M. 1990. The relation of blood sodium concentration to blood pressure in the rat. *Journal of Hypertension*, 8: 61-66.
84. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. 1998. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 11197-11204.
85. Fujiwara N, Osanai T, Kamada T, Katoh T, Takahashi K, Okumura K. 2000. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation*, 101: 856-861.

86. Gad MZ, Khattab M. 2000. Modulation of nitric oxide synthesis in inflammation. Relationship to oxygen-derived free radicals and prostaglandin synthesis. *Arzneimittel-Forschung*, 50 (5): 449-455.
87. Gao YT, Roman LJ, Martásek P, Panda SP, Ishimura Y, Masters BS. 2007. Oxygen metabolism by endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 28557-28565.
88. Garg UC, Hassid A. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*, 83: 1774-1777.
89. Gawlak M, Górkiewicz T, Gorlewicz A, Konopacki FA, Kaczmarek L, Wilczyński GM. 2009. High resolution in situ zymography reveals matrix metalloproteinase activity at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 158 (1): 167-176.
90. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 456-461.
91. Giumaraes DA, Rizzi E, Ceron CA, Oliveira AM, Oliveira DM, Castro MM, Tirapelli CR, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. 2010. Doxycycline Dose-dependently Inhibits MMP-2-Mediated Vascular Changes in 2K1C Hypertension. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108 (5): 318-325.
92. Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK. 2000. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry Journal*, 39: 1935-1941.
93. Gruden G, Thomas S, Burd D, Zhou W, Chusney G, Gnudi L, Viberti G. 1999. Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells. *Journal of American Society of Nephrology*, 10: 730-737.
94. Gu JW, Bailey AP, Tan W, Shparago M, Young E. 2008. Long-term high salt diet causes hypertension and decreases renal expression of vascular endothelial growth factor in Sprague-Dowley rats. *Journal of American Society of Hypertension*, 2 (4): 275-285.
95. Gu JW, Manning RD Jr, Young E, Shparago M, Sartin B, Bailey AP. 2009. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology*, 297: R142-R148.
96. Gu JW, Sartin W, Elam J Adair TH. 2000. Dietary salt induces gene expression of hypertrophy-related factors in cultured human endothelial cells. *American Journal of Hypertension*, 12: F015.
97. Guyton AC, Coleman TG, Granger HJ. 1972. Circulation: overall regulation. *Annual Review of Physiology*, 34: 13-46.

98. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*, 297: 1186-1190.
99. Haas JA, Krier JD, Bolterman RJ, Juncos LA, Romero JC. 1999. Low-dose angiotensin II increases free isoprostane levels in plasma. *Hypertension*, 34: 983-986.
100. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, NGAL Meta-analysis Investigator Group. 2009. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 54 (6): 1012-1024.
101. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. 2011. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS Journal*, 278 (1): 28-45.
102. Hägg PM, Hägg PO, Peltonen S, Autio-Harmanen H, Pihlajaniemi T. 1997. Location of type XV collagen in human tissues and its accumulation in the interstitial matrix of the fibrotic kidney. *American Journal of Pathology*, 150: 2075-2086.
103. Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK. 2001. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (18): 15498-15503.
104. Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR. 2005. Renal redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic nephropathy: paying homage to the podocyte. *American Journal of Nephrology*, 25: 553-569.
105. Herrera M, Ortiz PA, Garvin JL. 2006. Regulation of thick ascending limb transport: role of nitric oxide. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 290 (6): F1279-F1284.
106. He FJ, MacGregor GA. 2003. How Far Should Salt Intake Be Reduced? *Hypertension*, 42: 1093-1099.
107. He XR, Greenberg SG, Briggs JP, Schnermann JB. 1995. Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus. *American Journal of Physiology*, 268: F953-F959.
108. Higashi Y, Oshima T, Ono N, Hiraga H, Yoshimura M, Watanabe M, Matsuura H, Kambe M, Kajiyama G. 1995. Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80: 2198-2202.
109. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Sasaki S, Hara K, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. 2001. Sodium chloride loading does not alter endothelium-dependent vasodilation of forearm vasculature in either salt-sensitive or salt-resistant patients with essential hypertension. *Hypertension Research*, 24: 711-716.

110. Holden SN, Eckhardt SG, Basser R, de Boer R, Rischin D, Green M, Rosenthal MA, Wheeler C, Barge A, Hurwitz HI. 2005. Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF and VEGF receptor signaling, in patients with solid, malignant tumors. *Annals Oncology*, 16: 1391-1397.
111. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (36): 26031-26037.
112. Humes HD, lake EW, Liu S. 1995. Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 21: 353-365.
113. Jin L, Ying Z, Hilgers RH, Yin J, Zhao X, imig JD, Webb RC. 2006. Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318: 288-295.
114. Kaikita K, Fogo AB, Ma L, Schoenhard JA, Brown NJ, Vaughan DE. 2001. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency prevents hypertension and vascular fibrosis in response to long-term nitric oxide synthase inhibition. *Circulation*, 104: 839-844.
115. Kaikita K, Schoenhard JA, Painter CA, Ripley RT, Brown NJ, Fogo AB, Vaughan DE. 2002. Potential roles of plasminogen activator system in coronary vascular remodeling induced by long-term nitric oxide synthase inhibition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34: 617-627.
116. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 3566-3570.
117. Kakoki M, Kim HS, Arendshorst W, Mattson DL. 2004. L-arginine uptake affects nitric oxide production and blood flow in the renal medulla. *American Journal of Physiology*, 287: R1478-R1485.
118. Kamarainen M, Seppala M, Virtanen I, Andersson L. 1997. Expression of glycodefin in MCF-7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium. *Laboratory Investigation*, 77: 565-573.
119. Kamba T, McDonald DM. 2007. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *British Journal of Cancer*, 96: 1788-1795.
120. Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, Gordon KL, Oyama TT, Hughes J, Hugo C, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ. 2001a. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 37: 601-611.

121. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. 2001b. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduced renal fibrosis and stabilizes renal function. *Journal of American Society of Nephrology*, 12: 1448-1457.
122. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Johnson RJ. 2002. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *American Journal of Pathology*, 161: 239-248.
123. Kendall RL, Thomas KA. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 10705-10709.
124. Kelly DJ, Buck D, Cox AJ, Zhang Y, Gilbert RE. 2007. Effects on protein kinase c-beta inhibition on glomerular vascular endothelial growth factor expression and endothelial cells in advanced experimental diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 293: F565-F574.
125. Khasawneh FT, Huang JS, Mir F, Srinivasan S, Tirupathi C, Le Breton GC. 2008. Characterization of isoprostane signaling: evidence for a unique coordination profile of 8-iso-PGF(2alpha) with the thromboxane A(2) receptor and activation of a separate cAMP-dependent inhibitory pathway in human platelets. *Biochemical Pharmacology*, 75: 2301-2315.
126. Kim NH, Kim KB, Kim DL, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kang YS, Han SY, Han KH, Ji YH, Cha DR. 2004. Plasma and urinary vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 21 (6): 545-551.
127. Kim NH, Oh JH, Seo JA, Lee KW, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kang YS, Han SY, Han KH, Ji YH, Cha DR. 2005. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 67 (1): 167-177.
128. Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomita K. 2001. Glomerular endothelial cells are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 195: 43-54.
129. Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, Yamamoto Y, Wu Y, Ichinose K, Hirokoshi K, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. 2006. Regulation of angiogenic factors in angiotensin II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. *American Journal of Hypertension*, 19: 718-727.
130. Klein KL, Wang MS, Torikai S, Davidson WD, Kurokawa K. 1981. Substrate oxidation by isolated single nephron segments of the rat. *Kidney International*, 20: 29-35.
131. Kobayashi N, DeLano FA, Schmidt-Schönbein GW. 2005. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 25: 2114-2121.

132. Kom GD, Schwedhelm E, Nielsen P, Böger RH. 2006. Increased urinary excretion of 8-iso-prostaglandin F2alpha in patients with HFE-related hemochromatosis: a case-control study. *Free Radical Biology & Medicine*, 40 (7): 1194-1200.
133. Kröncke KD. 2001. Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3: 565-575.
134. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. 2009. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney International*, 75: 285-294.
135. Laakso J, Mervaala E, Himberg JJ, Teräväinen TL, Karppanen H, Vapaatalo H, Lapatto R. 1998. Increased Kidney Xanthine Oxidoreductase Activity in Salt-Induced Experimental Hypertension. *Hypertension*, 32: 902-906.
136. Laycock SK, Vogel T, Forfia PR, Tuzman J, Xu X, Ochoa M, Thompson CI, Nasjletti A, Hintze TH. 1998. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. *Circulation Research*, 82: 1263-1271.
137. Lee HS, Song CY. 2009. Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF- β -induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. *Histology and Histopathology*, 24: 901-908.
138. Lee HS. 2011. Pathogenic role of TGF- β in the progression of podocyte diseases. *Histology and Histopathology*, 26: 107-116.
139. Lee HS. 2012. Mechanisms and consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Research*, 347: 129-140.
140. Lelongt B, Trugnan G, Murphy G, Ronco PM. 1997. Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renal organogenesis in vitro. *Journal of Cell Biology*, 136: 1363-1373.
141. Lenz T, Haak T, Malek J, Gröne HJ, Geiger H, Gossmann J. 2003. Vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy. *Kidney & Blood Pressure Research*, 26: 338-343.
142. Leonard EC, Friedrich JL, Basile DP. 2008. VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 295: F1648-F1657.
143. Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, Barbareschi M. 1992. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *Journal of Clinical Pathology*, 45 (5): 416-419.
144. Li H, Forstermann U. 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *Journal of Pathology*, 190: 244-254.

145. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG. 2002. TIMP-1: A Marker of Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Fibrosis in Hypertension. *Hypertension*, 40: 136-141.
146. Lin HH, Li WW, Lee YC, Chu ST. 2007. Apoptosis induced by uterine 24p3 protein in endometrial carcinoma cell line. *Toxicology*, 234: 203-215.
147. Lin S, Fagan KA, Li KX, Shaul PW, Cooper DM, Rodman DM. 2000. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca^{2+} entry. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 17979-17985.
148. Lovett DH, Sterzel RB, Kasgarian M, Ryan JL. 1983. Neutral proteinase activity produced in vitro by cells of the glomerular mesangium. *Kidney International*, 23: 342-349.
149. Lu B, Yan J, Yang X, Li J, Chen K. 2012. Involvement of brain ANG II in acute sodium depletion induced salty taste changes. *Regulatory Peptides*, 179 (1-3): 15-22.
150. Luchtefeld M, Grote K, Grothusen C, Bley S, Bandlow N, Selle T, Struber M, Haverich A, Bavendiek U, Drexler H, Schieffer B. 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328: 183-188.
151. Lu Y, Xiong Y, Huo Y, Han J, Yang X, Zhang R, Zhu DS, Klein-Hessling S, Li J, Zhang X, Han X, Li Y, Shen B, He Y, Shibuya M, Feng GS, Luo J. 2011. Grb-associated binder I (Gab I) regulates postnatal ischemic and VEGF-induced angiogenesis through the protein kinase A-endothelial NOS pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 2957-2962.
152. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. 2003. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14: 3138-3146.
153. Małyżko J, Bachorzewska-Gajewska H, Małyżko JS, Pawlak K, Dobrzycki S. 2008. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in hypertensive and normotensive patients with coronary artery disease. *Nephrology*, 13: 153-156.
154. Małyżko J, Małyżko JS, Bachórzewska-Gajewska H, Poniatowski B, Dobrzycki S, Myśliwiec M. 2009. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a new and sensitive marker of kidney function in chronic kidney disease patients and renal allograft recipients. *Transplantation Proceedings*, 41 (1): 158-161.
155. Manicone AM, McGuire JK. 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19: 34-41.
156. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Ingelfinger JR, Nangaku M. 2004. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia. *Kidney International*, 65: 871-880.

157. Marcet-Palacios M, Graham K, Cass C, Befus AD, Mayers I, Radomski MW. 2003. Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307: 429-436.
158. Martens CR, Edwards DG. 2011. Peripheral vascular dysfunction in chronic kidney disease. *Cardiology Research and Practice*, 2011: 267257.
159. Mattson DL, Raff H, Roman RJ. 1991. Influence of angiotensin II on pressure natriuresis and renal hemodynamics in volume-expanded rats. *American Journal of Physiology*, 260: R1200-R1209.
160. Mattson DL, Roman RJ, Cowley AW Jr. 1992. Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension*, 19: 766-769.
161. Matsuzawa T, Fukui A, Kashimoto T, Nagao K, Oka K, Miyake M, Horiguchi Y. 2004. Bordetella dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (4): 2866-2872.
162. McMillan JI, Riordan JW, Couser WG, Pollock AS, Lovett DH. 1996. Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*, 97: 1094-1101.
163. McMurry JL, Chrestensen CA, Scott IM, Lee EW, Rahn AM, Johansen AM, Forsberg BJ, Harris KD, Salerno JC. 2011. Rate, affinity and calcium dependence of nitric oxide synthase isoform binding to the primary physiological regulator calmodulin. *FEBS Journal*, 278 (24): 4943-4954.
164. Mecawi AS, Vilhena-Franco T, Fonseca FV, Reis LC, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. 2012. The role of angiotensin II on sodium appetite after low-sodium diet. *Journal of Neuroendocrinology*, doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02388.x.
165. Meng S, Roberts LJ, Cason GW, Curry TS, Manning RD Jr. 2002. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283: R732-R738.
166. Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. 1999. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regulatory Peptides*, 81: 1-10.
167. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. 2005. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury following cardiac surgery. *Lancet*, 365: 1231-1238.

168. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P. 2004. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of American Society of Nephrology*, 15: 3073-3082.
169. Mitsnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL, Barasch J, Devarajan P. 2007. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 22: 101-108.
170. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. 1992. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *American Journal of Physiology*, 263: F488-F495.
171. Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal of Medicine*, 329: 2002-2012.
172. Montesano R, Carrozzino F, Soulié P. 2007. Low concentrations of transforming growth factor-beta-1 induce tubulogenesis in cultured mammary epithelial cells. *BMC Developmental Biology*, 7: 7.
173. Moridani BA, Kline RL. 1996. Effect of endogenous L-arginine on the measurement of nitric oxide synthase activity in the rat kidney. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 74 (11): 1210-1244.
174. Moriguchi Y, Yogo K, Aizawa K, Serizawa K, Tashiro Y, Yorozu K, Ishizura N, Iwabuchi S, Kitamura H, Nishimura T. 2011. Left ventricular hypertrophy is associated with inflammation in sodium loaded subtotal nephrectomized rats. *Biomedical Research*, 32 (2): 83-90.
175. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. 2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*, 115: 610-621.
176. Morita T, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Fujieda M, Sato T, Shuin T, Furihata M, Wakiguchi H. 2011. Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced manner reinforcing resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association*, 26: 4023-4031.
177. Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. 1994. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney International*, 45 (4): 998-1005.
178. Morrow JD, Awada JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. 1992. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 10721-10725.

179. Morrow JD, Roberts LJ. 1997. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxydation. *Progress in Lipid Research*, 36: 1-21.
180. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. 2005. Redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2: 274-278.
181. Myers PR, Webel R, Thondapu V, Xu XP, Amann J, Tanner MA, Jenkins JS, Pollock JS, Laughlin MH. 1996. Restenosis is associated with decreased coronary artery nitric oxide synthase. *International Journal of Cardiology*, 55: 183-191.
182. Nagase H, Visse R, Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69: 562-573.
183. Naito Y, Tsujino T, Matsumoto M, Sakoda T, Ohyanagi M, Masuyama T. 2009. Adaptive response of the heart to long term anemia induced by iron deficiency. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 296 (3): H585-H593.
184. Nakagawa T, Lan HY, Zhu HJ, Kang DH, Schreiner GF, Johnson RJ. 2004. Differential regulation of VEGF by TGF-beta and hypoxia in rat proximal tubular cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 287: 658-664.
185. Nangaku M. 2006. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of American Society of Nephrology: JASN*, 17: 17-25.
186. Nankivell BJ, Boadle RA, Harris DC. 1992. Iron accumulation in human chronic renal disease. *American Journal of Kidney Disease*, 20: 580-584.
187. Narita T, Hosoba M, Kakei M, Ito S. 2006. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29: 142-144.
188. Navar LG, Kobori H, Prieto MC, Gonzalez-Villalobos RA. 2011a. Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension*, 57 (3): 355-362.
189. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. 2011b. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Current Opinion in Pharmacology*, 11 (2): 180-186.
190. Nichols AF, Sancar A. 1992. Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Research*, 20: 2441-2446.
191. Nguyen MT, Devarajan P. 2008. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatric Nephrology*, 23 (12): 2151-2157.
192. Nickenig G, Strehlow K, Roeling J, Zolk O, Knorr A, Böhm M. 1998. Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. *Hypertension*, 31: 1272-1277.

193. Nonclerco D, Toubeau G, Laurent G, Tulkens PM, Heuson-Stiennon JA. 1989. Tissue injury and repair in the rat kidney after exposure to cisplatin or carboplatin. *Experimental and Molecular Pathology*, 51: 123-140.
194. Oberleithner H, Kusche-Vihorg K, Schillers H. 2010. Endothelial cells as vascular salt sensors. *Kidney International*, 77: 490-494.
195. O'Connor PM, Cowley AW Jr. 2010. Modulation of Pressure-Natriuresis by Renal Medullary Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide. *Current Hypertension Reports*, 12: 86-92.
196. O'Connor PM, Lu L, Schreck C, Cowley AW Jr. 2008. Enhanced amiloride-sensitive superoxide production in renal medullary thick ascending limb of Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 295 (3): F726-F733.
197. Okamoto K, Aoki K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27: 282.
198. Olsen TS, Olsen HS, Hansen HE. 1985. Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration. *Virchows Archiv*, 406: 75-89.
199. Ortiz PA. 2006. cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 290: F608-F616.
200. Pallone TL. 1994. Vasoconstriction of outer medullary vasa recta by ANG II is modulated by prostaglandin E2. *American Journal of Physiology*, 266: F850-F857.
201. Palmer BF. 2001. Impaired renal autoregulation: implications for the genesis of hypertension and hypertension-induced renal injury. *American Journal of the Medical Sciences*, 321: 388-400.
202. Paravicini TM, Touyz RM. 2006. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research*, 71: 247-258.
203. Park JE, Keller GA, Ferrara N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell*, 4 (12): 1317-1326.
204. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews: Immunology*, 4 (8): 617-629.
205. Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochemical Journal*, 411: 211-226.
206. Phillips PG, Birnby LM. 2004. Nitric oxide modulates caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 expression and distribution at the endothelial cell/tumor cell interface. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286: L1055-L1065.

207. Piedagnel R, Murphy G, Ronco PM, Lelongt B. 1999. MMP2 and MMP9 are produced by kidney collecting duct principal cells but are differentially regulated by SV40 large-T, arginine vasopressin, and EGF. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (3): 1614-1620.
208. Pfaller W, Rittinger M. 1980. Quantitative morphology of the rat kidney. *International Journal of Biochemistry*, 12: 17-22.
209. Prchal JT, Pastore YD. 2004. Erythropoietin and erythropoiesis: Polycythemia due to disruption of oxygen homeostasis. *Hematology Journal*, 5 (3): S110-S113.
210. Quadri F, Edling O, Wolf A, Gohlke P, Culman J, Unger T. 1994. Release of angiotensin in the paraventricular nucleus in response to hyperosmotic stimulation in conscious rats: a microdialysis study. *Brain Research*, 637: 45-49.
211. Raffetto JD, Khalil RA. 2008. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 75: 346-359.
212. Raffetto JD, Ross RL, Khalil RA. 2007. Matrix metalloproteinase-2 induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K⁺ channels: relevance to varicose vein formation. *Journal of Vascular Surgery*, 45: 373-380.
213. Ratledge C. 2007. Iron metabolism and infection. *Food and Nutrition Bulletin*, 28: S515-S523.
214. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Roberts LJ, Morrow JD, Romero JC. 2000. Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats. *Hypertension*, 35: 476-479.
215. Roskoski R Jr. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling during tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 62: 179-213.
216. Rosón M, Cavallero S, Della Pena S, Cao G, Gorzalczyński S, Pandolfo M, Kuprewicz A, Canessa O, Toblli JE, Fernández BE. 2006. Acute sodium overload produces renal tubulointerstitial inflammation in normal rats. *Kidney International*, 70 (8): 1439-1446.
217. Roudkenar MH, Halabian R, Roushandeh AM, Nourani MR, Masroori N, Ebrahimi M, Nikogoftar M, Rouhbakhsh M, Bahmani P, Najafabadi AJ, Shokrgozar MA. 2009. Lipocalin 2 regulation by thermal stresses: protective role of Lcn2/NGAL against cold and heat stresses. *Experimental Cell Research*, 315 (18): 3140-3151.
218. Ruegg CE, Mandel LJ. 1990. Bulk isolation of renal PCT and PST: II. Differential responses to anoxia or hypoxia. *American Journal of Physiology*, 259: F176-F185.
219. Rundhaug JE. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9 (2): 267-285.
220. Sasajima H, Shima H, Toyoda Y, Kimura K, Yoshikawa A, Hano T. 1997. Increased Ca²⁺ sensitivity of contractile elements via protein kinase C in alpha-toxin permeabilized SMA from young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 36: 86-91.

221. Samuel P, Ali Q, Sabuhi R, Wu Y, Hussain T. 2012. High Na intake increases renal angiotensin II levels and reduces expression of the ACE2-AT2R-MasR axis in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 303 (3): F412-F419.
222. Sandberg MC, Laborde C. 2004. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17-beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 1546-56.
223. Sandler AB, Johnson DH, Hertst RS. 2004. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 10: 4258s-4262s.
224. Sbai O, Ould-Yahoui A, Ferhat L, Gueye Y, Bernard A, Charrat E, Mehanna A, Risso JJ, Chauvin JP, Fenouillet E, Rivera S, Khrestchatisky M. 2010. Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. *Glia*, 58 (3): 344-366.
225. Schindler H, Bogdan C. 2001. NO as a signaling molecule: effects on kinases. *International Immunopharmacology*, 1: 1443-1455.
226. Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103: 211-225.
227. Schmidt A, Geigenmueller S, Voelker W, Seiler P, Buddecke E. 2003. Exogenous nitric oxide causes overexpression of TGF- β 1 and overproduction of extracellular matrix in human coronary smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 58: 671-678.
228. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J. 2006. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 15: 442-449.
229. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. 2007. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Journal of American Society of Nephrology*, 18: 407-413.
230. Schnackenberg CG, Wilcox CS. 1999. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-iso prostaglandin F_{2 α} . *Hypertension*, 33: 424-428.
231. Schramek H, Sarközi R, Lauterberg C, Kronbichler A, Pirklbauer M, Albrecht R, Noppert SJ, Perco P, Rudnicki M, Strutz FM, Mayer G. 2009. Neuropilin-1 and neuropilin-2 are differentially expressed in human proteinuric nephropathies and cytokine-stimulated proximal tubular cells. *Laboratory Investigation*, 89: 1304-1316.
232. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, DeVriese AS. 2004. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney International*, 65: 2003-2017.
233. Shankland SJ. 2006. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International*, 69: 2131-2147.

234. Sharma AM, Kribben A, Schattenfroh S, Cetto C, Distler A. 1990. Salt sensitivity in humans is associated with abnormal acid-base regulation. *Hypertension*, 16 (4): 407-413.
235. Shiono K, Sokabe H. 1976. Renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology*, 231 (4): 1295-1299.
236. Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 69 (2): 367-74.
237. Sigmon DH, Carretero OA, Beierwaltes WH. 1992. Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo. *American Journal of Physiology*, 263: F256-F261.
238. Simon G, Illyes G, Csiky B. 1998. Structural Vascular Changes in Hypertension: Role of Angiotensin II, Dietary Sodium Supplementation, Blood Pressure, and Time. *Hypertension*, 32: 654-660.
239. Sladek CD, Chen YH, Aravich PF, Blair ML. 1987. Osmotic regulation of vasopressin and renin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 10 (5): 476-483.
240. Smeda JS, Lee RM, Forrest JB. 1988. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circulation Research*, 63: 518-533.
241. Smith CP, Thévenod F. 2009. Iron transport and the kidney. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1790: 724-730.
242. Soker S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. 1996. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 5761-5767.
243. Spiegel DM, Wilson PD, Molitoris BA. 1989. Epithelial polarity following ischemia: a requirement for normal cell function. *American Journal of Physiology*, 256: F430-F436.
244. Szabó G, Magyar Z. 1982. Electrolyte concentrations in subcutaneous tissue fluid and lymph. *Lymphology*, 15 (4): 174-177.
245. Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. 1997. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension*, 30: 1621-1627.
246. Tanaka T, Kato H, Kojima I, Ohse T, Son D, Tawakami T, Yatagawa T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. 2006. Hypoxia and expression of hypoxia-inducible factor in the aging kidney. *Journals of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61: 795-805.

247. Tanase H, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W. 1982. Heart size in inbred strains of rats. Part 1. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension*, 4: 864-872.
248. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. 2000. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension*, 36: 330-336.
249. Touyz RM, Schiffrin EL. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacology Review*, 52: 639-672.
250. Tran E, DeLano FA, Schmidt-Schönbein GW. 2010. Enhanced Matrix Metalloproteinase Activity in the Spontaneously Hypertensive Rat: VEGFR-2 Cleavage, Endothelial Apoptosis, and Capillary Rarefaction. *Journal of Vascular Research*, 47: 423-431.
251. Uchida S, Endou H. 1988. Substrate specificity to maintain cellular ATP along the mouse nephron. *American Journal of Physiology*, 255: F977-F983.
252. Ujiiie K, Yuen J, Hogarth L, Danziger R, Star RA. 1994. Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *American Journal of Physiology*, 267: F296-F302.
253. Upchurch GR Jr, Ford JW, Weiss SJ, Knipp BS, Peterson DA, Thompson RW, Eagleton MJ, Broady AJ, Proctor MC, Stanley JC. 2001. Nitric oxide inhibition increases matrix metalloproteinase-9 expression by rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Journal of Vascular Surgery*, 34: 76-83.
254. Van den Steen PE, Van Aelst I, Hvidberg V, Piccard H, Fiten P, Jacobsen C, Moestrup SK, Fry S, Royle L, Wormald MR, Wallis R, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. 2006. The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (27): 18626-18637.
255. Vaandrager AB, de Jonge HR. 1996. Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Molecellar and Cellular Biochemistry*, 157: 23-30.
256. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. 2005. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 144: 449-458.
257. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ. 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151 (3): 220-228.
258. Venkatachalam MA, Patel YJ, Kreisberg JI, Weinberg JM. 1988. Energy thresholds that determine membrane integrity and injury in a renal epithelial cell line (LLC-PK1): Relationships to phospholipid degradation and unesterified fatty acid accumulation. *Journal of Clinical Investigation*, 81: 745-758.

259. Veron D, Reidy KJ, Bertuccio C, Teichman J, Villegas G, Jimenez J, Shen W, Kopp JB, Thomas DB, Tufro A. 2010. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney International*, 11: 989-999.
260. Vila V, Martínez-Sales V, Almenar L, Lázaro IS, Villa P, Reganon E. 2008. Inflammation, endothelial dysfunction and angiogenesis markers in chronic heart failure patients. *International Journal of Cardiology*, 130: 276-277.
261. Villegas G, Lange-Sperandio B, Tufro A. 2005. Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney International*, 67: 449-457.
262. Vyas SJ, Jackson EK. 1995. Angiotensin II: enhanced renal responsiveness in young genetically hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273: 768-777.
263. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, Lee HT. 2006. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*, 105: 485-491.
264. Wahlberg E, Dimuzio PJ, Stoney RJ. 2002. Aortic clamping during elective operations for infrarenal disease: The influence of clamping time on renal function. *Journal of Vascular Surgery*, 36 (1): 13-18.
265. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 26988-26995.
266. Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG. 2005. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *American Journal of Pathology*, 167: 1429-1442.
267. Wang W, Viappiani S, Sawicka J, Schulz R. 2005. Inhibition of endogenous nitric oxide in the heart enhances matrix metalloproteinase-2 release. *British Journal of Pharmacology*, 145: 43-49.
268. Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM, 1997. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, 91: 695-704.
269. Woessner JF, Nagase H. 2000. Introduction to the matrix metalloproteinases (MMPs). *Matrix metalloproteinases and TIMPs*, Wyd. JF Woessner & H Nagase, New York, Oxford University Press, str. 1-10.

270. Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN. 1993. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- β . *Journal of Clinical Investigation*, 92: 1366-1372.
271. World Health Organization. 2007. Reducing salt intake in populations: report of a WHO forum and technical meeting, 5-7 October 2006, Geneva.
272. Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatsky M, Rivera S, Zalewska T. 2011. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One*, 6 (7): e22465.
273. Wu F, Park F, Cowley AW Jr, Mattson DL. 1999. Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. *American Journal of Physiology*, 276: F874-F881.
274. Xue H, Zhang YL, Liu GS, Wang H. 2005. A new ATP-sensitive potassium channel opener protects the kidney from hypertensive damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315: 501-509.
275. Xu X, Ha CH, Wong C, Wang W, Hausser A, Pfizenmaier K, Olson EN, McKinsey TA, Jin ZG. 2007. Angiotensin II stimulates protein kinase D-dependent histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export leading to vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27 (11): 2355-2362.
276. Yamamoto T, Kozawa O, Tanabe K, Akamatsu S, Matsuno H, Dohi S, Uematsu T. 2001. Involvement of p38 MAP kinase in TGF- β -stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82: 591-598.
277. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, Nakamura K, Goto M, Shinozaki N, Ohshima S, Sugaya T. 2007. Renal L-Type Fatty Acid-Binding Protein in Acute Ischemic Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18: 2894-2902.
278. Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC. 2003. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23: 26-36.
279. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. 2001. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is as complex of gelatinase B/MMP9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 37258-37265.
280. Yang C, Stingo FC, Ahn KW, Liu P, Vannucci M, Laud PW, Skelton M, O'Connor P, Kurth T, Ryan RP, Moreno C, Tsaih SW, Patone G, Hummel O, Jacob HJ, Liang M, Cowley AW Jr. 2013. Increased Proliferative Cells in the Medullary Thick Ascending Limb of the Loop of Henle in the Dahl Salt-Sensitive Rat. *Hypertension*, 61 (6): 208-215.

281. Yang J, Mori K, Li JY, Barasch J. 2003. Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 285: F9-F18.
282. Yang Z, Strickland DK, Bornstein P. 2001. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (11): 8403-8840.
283. Yildiz B, Kural N, Colak O, Ak I, Akcar N. 2008. IGF-1, IGFBP-3, VEGF and MMP-9 levels and their potential relationship with renal functions in patients with compensatory renal growth. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 28: 107-112.
284. Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, Pitsavos C, Tsioufis K, Aggeli C, Vasiliadou K, Toutouza M, Toutouzas P. 2003. Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. *Journal of Human Hypertension*, 17: 119-124.
285. Zhan CD, Sindhu RK, Vaziri ND. 2004. Upregulation of kidney NAD(P)H oxidase and calcineurin in SHR: Reversal by lifelong antioxidant supplementation. *Kidney International*, 65: 219-227.
286. Zhou MS, Adam AG, Jaimes EA, Raij L. 2003. In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. *Hypertension*, 42 (5): 945-51.
287. Ziello JE, Huang Y, Jovin IS. 2010. Cellular endocytosis and gene delivery. *Molecular Medicine*, 16 (5-6): 222-229.
288. Zimowska M, Olszyński KH, Świerczyńska M, Stremińska W, Ciemerych MA. 2012. Decrease of MMP-9 activity improves soleus muscle regeneration. *Tissue Engineering. Part A*, 18 (11-12): 1183-1192.
289. Ziyadeh FN. 2008. Different roles for TGF-beta and VEGF in the pathogenesis of the cardinal features of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82: S38-S41.
290. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. 2004. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (wydanie 7), Philadelphia: Saunders, str. 560-561.