

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



mgr Malwina Monika Roszkowska-Chojecka

Lokalny układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) w kontroli ciśnienia tętniczego i funkcji nerek - potencjalna antyhipertensyjna rola peptydów z nasion rzepaku u szczurów w narkozie

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Elżbiety Kompanowskiej-Jezińskiej
oraz dr hab. Agnieszki Walkowskiej
w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych

Warszawa 2015

Nauka to ogród, który się pielęgnuje. Opuszczone miejsca umierają.
Wiesław Myśliwski

Podziękowania

Promotorom mojej pracy –
prof. dr hab. Elżbiecie Kompanowskiej-Jeziarskiej
oraz **dr hab. Agnieszce Walkowskiej**,
składam najserdeczniejsze podziękowania za nieocenioną pomoc i najlepszą opiekę w realizacji projektu jaką mogłam otrzymać. Wasza cierpliwość i zaangażowanie oraz mobilizowanie mnie do pracy, stworzyły znakomite warunki, w których mogłam rozwijać się naukowo.

Mentorowi naszego Zakładu,
prof. dr hab. Januszowi Sadowskiemu
dziękuję za nieustającą opiekę merytoryczną. Szczególnie dziękuję za szereg odbytych dyskusji naukowych, które stanowiły inspirację do stworzenia tej pracy.

Pragnę podziękować
Pracownikom Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych IMDiK PAN
oraz **koleżankom i kolegom Doktorantom z pracy**
za stworzenie wspaniałej atmosfery naukowej (i nie tylko). Dzięki Wam zapamiętam twórczą i sympatyczną atmosferę w pracy podczas naszych przerw na „herbatę i ciastka”.

Dziękuję **Rodzicom**
za wsparcie , zarówno duchowe jak i materialne oraz zachętę do pracy naukowej.

Mojemu Mężowi Łukaszowi,
składam szczególne podziękowania za wsparcie w chwilach zwątpienia oraz cierpliwe słuchanie o kolejnym „ostatnim tygodniu” pisania pracy. Dziękuję za te obiady, dzięki którym mogłam „po godzinach” kontynuować swoją pracę.

Niniejsze badania były finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki (NCN, Polska) nr 2011/01/B/NZ4/05703 pt. *Antyhipertensyjna skuteczność peptydów z nasion rzepaku u szczurów. Potencjalna rola nowych mechanizmów konwersji ang I* (kierownik grantu: prof. dr hab. Elżbieta Kompanowska-Jeziarska).

Część badań finansowano ze środków statutowych Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych (ZFNiPU), IMDiK PAN.

Treść części wyników niniejszej pracy zawarto w publikacji pt. *Effects of chymostatin, chymase inhibitor, on blood pressure, plasma and tissue angiotensin II, and renal haemodynamics and excretion in hypertension*. Malwina M. Roszkowska-Chojecka, Agnieszka Walkowska, Olga Gawrys, Iwona Baranowska, Małgorzata Kalisz, Anna Litwiniuk, Lidia Martyńska, Elżbieta Kompanowska-Jeziarska – praca przyjęta do druku 15.05.2015 roku w *Experimental Physiology* (EP-RP-2015-085325).

Autorka niniejszej pracy była laureatką stypendium Marszałka w ramach projektu pt. *Rozwój nauki – rozwojem regionu - stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów* (Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji PO KL); Załącznik Nr 2 do uchwały nr 2004/302/13 Zarządu Województwa Mazowieckiego z dnia 19 listopada 2013 r.



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

Spis treści

Wykaz skrótów	8
Streszczenie	11
Abstract	15
I. Wstęp.....	18
1. Rola ogólnoustrojowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) w regulacji ciśnienia krwi i czynności nerek: fizjologia i patofizjologia	18
1.1. Renina i regulacja jej stężenia we krwi.....	19
1.2. Szlak powstawania angiotensyny II.....	23
1.3. Fizjologiczne i patofizjologiczne znaczenie receptorów angiotensyny II	24
1.3.1. Regulacyjna rola, rozmieszczenie i mechanizm pobudzenia receptorów AT1	24
1.3.2. Regulacyjna rola, rozmieszczenie i mechanizm pobudzenia receptorów AT2....	27
1.4. Działanie angiotensyny II na układ krążenia	30
1.5. Wpływ angiotensyny II na hemodynamikę nerek i transport kanalikowy.....	31
2. Tkankowe układy renina-angiotensyna-aldosteron.....	33
2.1. Chymaza i alternatywne szlaki syntezy angiotensyny II	35
3. Zwierzęce modele nadciśnienia.....	38
3.1. Nadciśnienie sodozależne	39
3.2. Model Goldblatta, czyli nadciśnienie naczyniowo-nerkowe	42
3.3. Nadciśnienie o podłożu genetycznym	45
4. Peptydowe inhibitory konwersji angiotensyny I.....	49
4.1. Mechanizm działania peptydowych inhibitorów ACE w terapii nadciśnienia tętniczego	49
4.2. Syntetyczne inhibitory ACE stosowane w leczeniu nadciśnienia i ich działania niepożądane.....	51
4.3. Naturalne peptydy pochodzące z białek żywności obniżające ciśnienie tętnicze krwi.....	52
4.3.1. Peptydy blokujące tkankowe szlaki RAAS.....	54
II. Cel badań	56
III. Materiały i metody.....	57
1. Zwierzęce modele nadciśnienia.....	57
1.1. Model nadciśnienia sodozależnego	57
1.2. Model doświadczalny nadciśnienia naczyniowo-nerkowego (tzw. model Goldblatta)	57
1.3. Model nadciśnienia o podłożu genetycznym	58
2. Doświadczenia ostre	58

2.1.	Chirurgiczne przygotowanie zwierząt do doświadczenia ostrego.....	58
2.2.	Protokół doświadczenia ostrego z infuzją substancji czynnych.....	60
2.3.	Pobranie materiału do analiz biochemicznych	61
3.	Analiza próbek moczu, krwi i tkanek	62
3.1.	Analiza parametrów moczu i osocza oraz czynności wydalniczej nerek	62
3.2.	Pomiar przesączania kłębuszkowego (GFR).....	62
3.3.	Wykonanie testów ELISA na próbkach osocza i tkankach	63
4.	Analiza statystyczna	64
IV.	Wyniki	65
1.	Wpływ blokowania lokalnych szlaków powstawania Ang II za pomocą chymostatyny w poszczególnych zwierzęcych modelach nadciśnienia.....	65
1.1.	Model nadciśnienia sodozależnego	65
1.1.1.	Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	65
1.1.2.	Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF).....	65
1.1.3.	Wydalenie nerkowe	66
1.1.4.	Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach	66
	Stężenie Ang II.....	68
1.2.	Model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego (tzw. model Goldblatta)	69
1.2.1.	Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	69
1.2.2.	Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF).....	69
1.2.3.	Wydalenie nerkowe	70
1.2.4.	Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach	70
	Stężenie Ang II.....	73
1.3.	Model nadciśnienia o podłożu genetycznym (SHR)	74
1.3.1.	Szczury SHR w fazie rozwoju nadciśnienia	74
1.3.1.1.	Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	74
1.3.1.2.	Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF).....	74
1.3.1.3.	Wydalenie nerkowe	75
1.3.1.4.	Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach	76
1.3.2.	Szczury SHR w fazie ustalonego nadciśnienia	80
1.3.2.1.	Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	80

1.3.2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)	80
1.3.2.3. Wydalanie nerkowe	81
1.3.2.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach	81
2. Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego RAAS i tkankowych układów lokalnych u szczurów SHR w ustalonej fazie nadciśnienia (kaptopryl na tle chymostatyny) – grupa dodatkowa.....	88
2.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	88
2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)	88
2.3. Wydalanie nerkowe	89
2.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach	89
3. Wpływ peptydów z nasion rzepaku o potencjalnym działaniu hipotensyjnym w modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym (szczury SHR)	92
3.1. Szczury SHR w fazie rozwoju nadciśnienia	92
3.1.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	92
3.1.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)	93
3.1.3. Wydalanie nerkowe	93
3.2. Szczury SHR w fazie ustalonego nadciśnienia	95
3.2.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza.....	95
3.2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)	95
3.2.3. Wydalanie nerkowe	96
4. Całościowe zestawienie zgromadzonych wyników	103
5. Podsumowanie wyników	133
V. Dyskusja.....	136
1. Rola lokalnych szlaków powstawania Ang II w kształtowaniu tętniczego ciśnienia krwi, hemodynamiki ustrojowej i wydalania nerkowego w różnych zwierzęcych modelach nadciśnienia	136
1.1. Wpływ na ciśnienie krwi tętniczej.....	136
1.2. Wpływ na stężenia elektrolitów w osoczu i osmolalności osocza	139
1.3. Wpływ na ukrwienie i opór naczyniowy w krążeniu nerkowym i krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową	140
1.4. Wpływ na przepływy wewnątrznerkowe	141

1.5.	Wpływ na wydalanie.....	142
1.6.	Wpływ na poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach.....	144
1.7.	Podsumowanie roli lokalnych szlaków powstawania Ang II w różnych zwierzęcych modelach nadciśnienia.....	148
2.	Rola jednoczesnego blokowania ogólnoustrojowego RAAS i tkankowych układów lokalnych u szczurów SHR w ustalonej fazie nadciśnienia (kaptopryl na tle chymostatyny)	149
2.1.	Wpływ na ciśnienie krwi tętniczej.....	149
2.2.	Wpływ na stężenia elektrolitów w osoczu i osmolalności osocza	152
2.3.	Wpływ na ukrwienie i opór naczyniowy w krążeniu nerkowym i krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową	153
2.4.	Wpływ na przepływy wewnątrznerkowe	153
2.5.	Wpływ na wydalanie.....	154
2.6.	Wpływ na poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach.....	155
3.	Wpływ peptydów z nasion rzepaku o potencjalnym działaniu hipotensyjnym w kształtowaniu ciśnienia krwi, hemodynamiki ustroju i wydalania nerkowego u szczurów z nadciśnieniem o podłożu genetycznym (szczury SHR)	156
3.1.	Wpływ na ciśnienie tętnicze krwi.....	157
3.2.	Wpływ na stężenie elektrolitów w osoczu i osmolalność osocza	158
3.3.	Wpływ na ukrwienie i opór naczyniowy w krążeniu nerkowym i krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową	158
3.4.	Wpływ na przepływy wewnątrznerkowe	159
3.5.	Wpływ na wydalanie.....	159
4.	Podsumowanie badań i wnioski	160
VI.	Piśmiennictwo	162

Wykaz skrótów

- 1K1C– nadciśnienie naczyniowo-nerkowe (tzw. model Goldblatta, ang. *one-kidney, one-clip Goldblatt hypertension*)
- 2K1C – nadciśnienie naczyniowo-nerkowe (tzw. model Goldblatta, ang. *two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension*)
- ACE, ACE1 – enzym konwertujący angiotensynę 1 (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*)
- ACE2 – enzym konwertujący angiotensynę 2 (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*)
- ACEi – inhibitory konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin-converting-enzyme inhibitors*)
- ADHD – model zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*)
- Ang – angiotensyna
- Ang I – angiotensyna I (ang. *Angiotensin I*)
- Ang II – angiotensyna II (ang. *Angiotensin II*)
- ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *atrial natriuretic peptide*)
- ANT – antagonist
- AP – aminopeptydaza (ang. *aminopeptidase*)
- AT₁, AT₁R – receptory typu 1 dla angiotensyny II (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor*)
- AT₂, AT₂R – receptory typu 2 dla angiotensyny II (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor*)
- Bk – bradykinina (ang. *bradykinin*)
- C – grupa kontrolna otrzymująca rozpuszczalnik chymostatyny (ang. *control*)
- CBF – korowy przepływ krwi (ang. *Cortical Blood Flow*)
- CH – chymostatyna
- DAG – diacyloglicerol (ang. *diacylglycerol*)
- DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)
- ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- FF – dipeptyd: Fenyloalanina-Fenyloalanina (Phe-Phe)
- GFR – filtracja kłębuszkowa (ang. *Glomerular Filtration Rate*)
- HDL – lipoproteina wysokiej gęstości (HDL, ang. *high-density lipoprotein*)
- HR – częstość skurczów serca/ tętno (ang. *Heart Rate*)
- HS – dieta wysokosodowa (ang. *High Salt*)
- IBF – przepływ krwi przez tętnicę biodrową (ang. *iliac blood flow*) – obszar krążenia w kończynie tylnej
- IKW – tripeptyd: Izoleucyna-Lizyna-Tryptofan (Ile-Lys-Trp)

IM – rdzeń wewnętrzny nerki (ang. *Inner Medulla*)

IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki (ang. *Inner Medullary Blood Flow*)

IP3 – trifosforan inozytolu (ang. *inositol trisphosphate*)

IPP – tripeptyd: Izoleucyna-Prolina-Prolina (Ile-Pro-Pro)

IY – dipeptyd: Izoleucyna-Tyrozyna (Ile-Tyr)

IVR – opór naczyniowy w krążeniu tylnej kończyny (ang. *iliac vascular resistance*)

MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi (ang. *Mean Arteria Blood Pressure*)

MMP – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Matrix Metalloproteinases*)

MMP-9 – prozelatynaza B (ang. *matrix metalloproteinase 9*)

MRW – tripeptyd: Metionina-Arginina-Tryptofan (Met-Arg-Trp)

MRWD – tetrapeptyd: Metionina-Arginina-Tryptofan-Kwas asparaginowy (Met-Arg-Trp-Asp)

NADPH – forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NO – tlenek azotu

NOS, eNOS, iNOS, nNOS – syntaza tlenku azotu: endotelialna, indukowana, neuronalna (ang. *Nitric Oxide Synthase – endothelial, induced, neuronal*)

LAP – tripeptyd: Leucyna-Alanina-Prolina (Leu-Ala-Pro)

LKP – tripeptyd: Leucyna-Lizyna-Prolina (Leu-Lys-Pro)

LKPNM – pentapeptyd: Leucyna-Lizyna-Prolina-Kwas asparaginowy-Metionina (Leu-Lys-Pro-Asp-Met)

OM – rdzeń zewnętrzny nerki (ang. *Outer Medulla*)

OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (ang. *Outer Medullary Blood Flow*)

PBS – sól fizjologiczna zbuforowana fosforanami (ang. *Phosphate Buffered Saline*)

Px – stężenie substancji x w osoczu (ang. *Plasma*)

PU – jednostki perfuzji (ang. *Perfusion Unit*)

RAAS – układ renina-angiotensyna-aldosteron (ang. *renin-angiotensin-aldosterone system*)

RBF – całkowity przepływ krwi przez nerkę (ang. *Renal Blood Flow*)

RIY – tripeptyd: Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna (Arg-Ile-Tyr)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*)

RVR – nerkowy opór naczyniowy (ang. *renal vascular resistance*)

S – sól fizjologiczna (ang. *saline*)

SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej (ang. *Systolic Blood Pressure*)

SEM – błąd standardowy średniej (ang. *Standard Error of the Mean*)

SH – grupa sulfhydrylowa (ang. *Sulfhydryl Group*)

SHR – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*)

SHR 7 – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie w fazie rozwijania nadciśnienia, 7-tygodniowe młode (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*)

SHR 16 – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie w fazie utrwalonego nadciśnienia, 16-tygodniowe szczury (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*)

SHR-ALR – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie podatne na miażdżycę (ang. *Spontaneously hypertensive arteriolipidosis-prone rats*)

SHR-MIR – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie podatne na chorobę niedokrwienną serca (ang. *Spontaneously Hypertensive Multiple smooth muscle microRNA rats*)

SHR-SP – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie podatne na udar mózgu (ang. *Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Rat*)

SPE – kolumny ekstrakcyjne do oczyszczania substancji (ang. *solid phase extraction*)

STD – dieta standardowa

TFA – kwas trifluoroctowy

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu typu β (ang. *Transforming Growth Factor β*)

TGF- β 1 – transformujący czynnik wzrostu- β 1 (ang. *Transforming Growth Factor β 1*)

UNaV – tempo wydalania sodu z moczem

UNX HS – szczury z nadciśnieniem sodozależnym utrzymywane na diecie wysokosodowej (ang. *uninephrectomised rats maintained on high sodium diet*)

UKV – tempo wydalania potasu z moczem

UxV – tempo wydalania substancji x z moczem

Ux – stężenie substancji x w moczu (ang. *Urea*)

WKY – szczury Wistar Kyoto (ang. *Wistar Kyoto rats*)

V/g – diureza minutowa w przeliczeniu na gram nerki

VEGF-A – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń typu A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*)

VLIVP – pentapeptyd: Walina-Leucyna-Izoleucyna-Walina-Prolina (Val-Leu-Ile-Val-Pro)

VPP – tripeptyd: Walina- Prolina-Prolina (Val-Pro-Pro)

VW – dipeptyd: Walina-Tryptofan (Val-Trp)

VWV – tripeptyd: Walina-Tryptofan-Walina (Val-Trp-Val)

YLAGNQ – sekstapeptyd: Tyrozyna-Leucyna-Alanina-Glicyna-Kwas asparaginowy-Glutamina (Tyr-Leu-Ala-Gly-Asp-Gln)

Streszczenie

Nadciśnienie jest przyczyną wielu chorób układu krążenia, takich jak udar czy zawał serca, prowadzących w wysokim procencie przypadków do śmierci pacjentów - szczególnie w społeczeństwach wysokorozwiniętych. Z uwagi na duże rozpowszechnienie nadciśnienia jest to choroba o charakterze społecznym, dająca niejednoznaczne objawy kliniczne.

Wiadomo, że podwyższony poziom naczyniokurczącej angiotensyny II (Ang II) jest często przyczyną nadciśnienia a blokowanie enzymu konwertującego (ACE), odpowiedzialnego za powstawanie tego hormonu jest powszechnie stosowane w terapii nadciśnienia. Niestety często taka blokada syntezy Ang II okazuje się niekompletna lub obserwuje się tzw. „ucieczkę” spod stosowanego leczenia, co sugeruje istnienie alternatywnych do ACE szlaków syntezy Ang II.

Obecnie wiadomo, że w wielu tkankach istnieje kompletna „maszyna” biochemiczna umożliwiająca lokalną produkcję Ang II, nawet pod nieobecność ACE. **Enzymy wrażliwe na chymostatynę (chymaza i/lub elastaza-2) okazują się bardzo ważnym elementem odpowiedzialnym za lokalną syntezę Ang II niezależnie od ACE, a ich rola wzrasta dopiero w takich patologicznych stanach jak niedokrwienie czy stres oksydacyjny, które towarzyszą rozwijającemu się nadciśnieniu. Z tego względu enzymy te stają się potencjalnym miejscem uchwytu dla poszukiwań nowych strategii w terapii nadciśnienia.**

Celem pracy było połączenie precyzyjnych technik pomiarowych parametrów fizjologicznych z oznaczeniem parametrów biochemicznych (poziom Ang II w tkankach i osoczu), co umożliwiło szersze spojrzenie na rolę chymazy i innych enzymów wrażliwych na chymostatynę w rozwoju nadciśnienia tętniczego w różnych modelach nadciśnienia u szczura. Po raz pierwszy określono także *in vivo* udział tych enzymów w powstawaniu Ang II w tkankach oraz w osoczu. Dodatkowo, sprawdzenie *in vivo* efektów jednoczesnego blokowania ogólnoustrojowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) oraz tkankowych układów lokalnych na ciśnienie tętnicze krwi i funkcję nerek w szczurzym modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym (SHR) pozwoliło na określenie udziału enzymów wrażliwych na chymostatynę w syntezie Ang II względem ACE.

Ostatnim etapem pracy było sprawdzenie roli peptydów pochodzących z białek zapasowych (napin i krucyferyn) z nasion rzepaku o potencjalnym hipotensyjnym działaniu na układ krążenia i wydalanie nerkowe w genetycznym modelu nadciśnienia (SHR). Ponieważ w badaniach Marczak i wsp. (2003) stwierdzono większą hipotensyjną skuteczność tych peptydów u starych szczurów SHR, u których inhibitory ACE są zdecydowanie mniej efektywne, wysunięto przypuszczenie, że mogą one mieć istotne znaczenie dla regulacji ciśnienia tętniczego krwi u tych zwierząt poprzez wpływ na szlaki syntezy Ang II alternatywne wobec ACE (lokalne szlaki RAAS).

Przeprowadzone przeze mnie badania *in vivo* są jednymi z nielicznych prac, które wskazują na rolę lokalnych RAAS w kontroli ciśnienia tętniczego krwi, hemodynamiki i wydalania nerkowego w różnych typach nadciśnienia. Zdecydowana większość istniejących doniesień dotyczy badań w układzie *in vitro*.

W doświadczeniach ostrych przeprowadzonych w narkozie wykorzystano następujące modele nadciśnienia: sodozależny (UNX HS), naczyniowo-nerkowy (tzw. model Goldblatta, 2K1C) oraz genetyczny model nadciśnienia w dwóch fazach rozwoju choroby (7-tygodniowe szczury w fazie rozwoju nadciśnienia, SHR 7 oraz 16-tygodniowe zwierzęta z utrwalonym nadciśnieniem, SHR 16). W zależności od grupy eksperymentalnej zwierzętom podawano w infuzji dożylniej różne sybstanje: chymostatynę (inhibitor chymazy i elastazy 2) lub jej rozpuszczalnik, kaptopryl (inhibitor ACE) na tle chymostatyny lub wybrane peptydy o potencjalnym hipotensyjnym działaniu. W trakcie prowadzonych doświadczeń zwierzętom mierzono: ciśnienie tętnicze krwi, częstość skurczów serca a także parametry hemodynamiczne oraz wydalnicze nerki. Po zakończonych doświadczeniach zwierzętom pobierano krew oraz narządy (nerka, serce, aorta) w celu zmierzenia stężenia Ang II.

Zaobserwowane różnice pomiędzy poszczególnymi modelami nadciśnienia sugerują, że charakter zmian hemodynamiki i wydalania nerkowego oraz mechanizmy kształtowania ciśnienia krwi tętniczej są różne w każdym typie badanego nadciśnienia i w każdym z opisanych modeli w odmiennym stopniu zaznacza się wpływ enzymów wrażliwych na chymostatynę, tj. chymazy lub/i elastazy-2.

Otrzymane wyniki wskazują na istotną rolę alternatywnego, ACE-niezależnego szlaku syntezy Ang II szczególnie w modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym, u szczurów SHR z rozwiniętym nadciśnieniem w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi, co w literaturze było jedną z najbardziej spornych kwestii odnośnie roli lokalnych RAAS w różnych typach nadciśnienia.

Choć u młodszych, 7-tygodniowych SHR nie stwierdzono zmian w ciśnieniu tętniczym krwi po zablokowaniu chymazy, to interesujące wydaje się obserwowane utrzymanie na stałym poziomie przepływu krwi przez tętnicę nerkową przy blokowaniu lokalnych RAAS tj. zapobieganie upośledzenia perfuzji obserwowanej po podaniu samego rozpuszczalnika. W tej grupie po zablokowaniu chymazy zmienił się opór na obwodzie ustroju u tych szczurów (obserwowany wzrost IVR), podczas gdy ciśnienie krwi tętniczej utrzymane zostało na stałym poziomie. Te mechanizmy regulacji ciśnienia krwi, które widoczne były u szczurów SHR 7, zostały zaburzone u starszych szczurów SHR.

Ponieważ u szczurów SHR 7 zablokowanie chymazy poprawia perfuzję nerki, chroniczne podawanie chymostatyny teoretycznie mogłoby w dłuższym czasie przyczynić się do ograniczenia rozwoju nadciśnienia u tych zwierząt. Z drugiej strony, enzymy zależne od chymostatyny wydają

się mieć znaczenie protekcyjne dla prawidłowego ukrwienia innych obszarów krążeniowych u młodych SHR, więc ostateczne rozstrzygnięcie ich roli w zapobieganiu rozwojowi nadciśnienia wymaga dalszych badań.

Należy podkreślić, że enzymy wrażliwe na chymostatynę pełnią istotną rolę w syntezie Ang II w osoczu i/lub w tkankach w każdym typie nadciśnienia.

Z drugiej strony chymaza czy inne wrażliwe na chymostatynę enzymy konwertujące Ang I nie wydają się mieć znaczącej roli w utrzymaniu hemodynamiki i wydalania nerkowego w pozostałych przebadanych modelach nadciśnienia (UNX HS, 2K1C) mimo, że istotnie przyczyniają się do zwiększenia poziomu Ang II zarówno w tkankach, jak i w osoczu. Można przypuszczać, że efekty czynnościowe nie ujawniły się, ponieważ czas obserwacji w doświadczeniu ostrym był zbyt krótki.

Ponieważ większość obserwowanych efektów hamowania chymazy pojawiała się z opóźnieniem i utrzymywała do godziny po odstawieniu chymostatyny, w celu wykazania fizjologicznego znaczenia chymazy w kontroli hemodynamiki i ciśnienia krwi uzasadnione wydaje się zastosowanie długotrwałego blokowania enzymów lokalnych szlaków syntezy Ang II w doświadczeniach przewlekłych.

Najsukuteczniejsze w obniżeniu ciśnienia tętniczego krwi okazało się jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych szlaków konwersji Ang I u szczurów SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia. Jednoczesne użycie kaptoprylu (inhibitora ACE) i chymostatyny daje lepsze efekty hipotensyjne u szczurów SHR 16 niż użycie samej chymostatyny.

Oba inhibitory (kaptopryl i chymostatyna) są w stanie nie tylko obniżyć ciśnienie tętnicze krwi u starszych szczurów SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia, ale również skuteczniej niż w przypadku samej chymostatyny obniżyć stężenie Ang II w osoczu i tkankach, co potwierdza istnienie lokalnych szlaków RAAS zależnych od aktywności zarówno ACE jak i chymazy. Należy podkreślić, że chymostatyna miała dużo większy udział w obniżeniu poziomu Ang II niż kaptopryl.

Nie stwierdzono istotnego wpływu peptydów z nasion rzepaku w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi, hemodynamiki i czynności wydalniczej nerki u szczurów z nadciśnieniem o podłożu genetycznym (szczury SHR). W przypadku prowadzonych przez mnie krótkich (1h) obserwacji peptydy podane w infuzji dożylniej nie dały oczekiwanych efektów. Wydaje się, że wskazane jest przeprowadzenie badań chronicznych z użyciem opisanych peptydów o potencjalnym hipotensyjnym działaniu z uwzględnieniem dożołądkowej drogi podania jak w przypadku pracy Marczak i wsp., (2003).

Jak dotąd uważano, że to właśnie szlak syntezy Ang II zależny od ACE (ogólnoustrojowy RAAS) jest głównie zaangażowany w kontrolę ciśnienia tętniczego krwi, hemodynamikę

i czynność wydalniczą nerki. Jednocześnie dane płynące z literatury wskazują, że efekt hipotensyjny wywierany przez leki z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEi) jest niewystarczający i nie dochodzi do pełnego zahamowania aktywności tkankowych układów RAAS. **Jak wykazały nasze badania *in vivo*, jednoczesne blokowanie obu układów RAAS, tych zależnych od aktywności ACE i enzymów wrażliwych na chymostatynę (tkankowe RAAS) może dać zdecydowanie lepsze wyniki w terapii nadciśnienia tętniczego.**

Abstract

Hypertension is the cause of many cardiovascular diseases, such as stroke or heart failure leading to a high percentage of patients' deaths, especially in highly developed countries. Because of the high prevalence of hypertension, it is a disease of a social nature, which is known to be of heterogeneous etiology and with multiple clinical symptoms.

It is well known, that elevated level of vasoconstrictor angiotensin II (Ang II) is often the cause of hypertension, and inhibition of the converting enzyme (ACE), responsible for the formation of this hormone, is commonly used in the treatment of hypertension. However, the inhibition frequently proves incomplete, in spite of the use of high doses of ACE-blocking drugs. Moreover, an "escape" from the applied treatment has been observed, which suggests existence of ACE-independent Ang II synthesis pathways.

A number of recent studies confirm that there are enzymes other than ACE which convert Ang I into Ang II, and in multiple tissues a complete enzymatic "machinery" exists that enables local production of Ang II, even in absence of ACE. **Chymostatin sensitive enzymes (as chymase and/or elastase-2) convert Ang I to Ang II through an ACE-independent pathway. Their role increases under such pathological stage as ischemia or oxidative stress. Both ischaemia and oxidative stress are established features of human hypertension. Therefore, these enzymes are the target for searching new strategies in the treatment of hypertension and have potential value in antihypertensive therapy.**

The study combined precise measurements of physiological parameters with determination of biochemical parameters (Ang II level in tissues and plasma), this enabled us to take a look on the role of chymase and other chymostatin sensitive enzymes in the development of hypertension in various hypertension models in the rat. This is the first time when the *in vivo* role of these enzymes in various hypertension models was determined. Additionally, the *in vivo* effects of simultaneous blockade of systemic and tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) on blood pressure and renal function in genetic model of hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) has been established. Thus, we examined the exact role and the involvement (chymase vs. ACE) of these two systems in Ang II synthesis, both in plasma and tissues.

The last part of this study was the evaluation of the potential value of peptides from rapeseeds (derived from napin and cruciferin) in antihypertensive treatment by determining their effects on the cardiovascular system and renal excretion in the genetic model of hypertension (SHR). Marczak et al. (2003) postulated that these peptides exhibit superior efficacy in lowering blood pressure in old SHR rats in which ACE inhibitors are much less effective. These findings

prompt us to undertake research on the role of chymase (tissue RAAS) in the development of hypertension and, a most innovative aspect of the project, to explore the potential of the peptides obtained from rapeseeds in reducing blood pressure. One of the most important aspect of this study was the influence of these peptides on tissue RAAS blockade and their impact on cardiovascular system and renal excretion in genetic model of hypertension (SHR).

The present *in vivo* experiments are one of the very few studies which indicate the role of tissue RAAS in the control of blood pressure, renal haemodynamics and excretion in various types of hypertension in rat. The majority of earlier studies were based on *in vitro* experiments.

We first plan to examine the role of chymase in the development of various forms of hypertension. We performed acute experiments in rats under anaesthesia in following hypertension models: sodium-dependent (UNX HS), renal artery stenosis-dependent (Goldblatt model, 2K1C) and genetically determined in two different stages (SHR 7 in the developing stage and SHR 16 in the established stage of hypertension). In order to verify the role of systemic and tissue RAAS in hypertension, various drugs were administered intravenously: chymostatin, a commercially available chymase blocker or its solvent, kaptopryl with chymostatin, and various peptides from rapeseeds with a potential antihypertensive activity. During acute experiments blood pressure, heart rates, haemodynamics parameters were measured and excretory function was determined. After the experiments blood samples and various organs were taken to further analysis (Ang II determination).

The responses of blood pressure, kidney haemodynamics and renal excretory function differed significantly between various models of rat hypertension. Chymase blockade decreased blood pressure, suggesting an important regulatory role of the ACE-independent pathway in genetic hypertension (SHR 16). This thesis is one of the most debatable issues in the current literature.

We did not observe changes in blood pressure in response to chymostatin administration in younger, 7-week old SHR. Interestingly, chymostatin alone prevented the solvent-dependent decrease in renal blood flow. Blockade of chymase alone significantly increased resistance in hindlimb circulation (IVR), but there were no changes in blood pressure. Apparently, the mechanisms responsible for regulation of renal haemodynamics and, in consequence, of blood pressure, that were in action in SHR 7 were impaired in older rats in the established stage of genetic hypertension (SHR 16). Because in SHR 7 chymase blockade improved renal perfusion, it would be worthwhile to conduct experiments with chronic administration of chymostatin in these rats and possibly detect some alleviation of hypertension. To verify this thesis further experiments are required.

Thus, we found that chymostatin sensitive enzymes have the significant role in Ang II synthesis in plasma and/or tissues in all tested models of hypertension.

On the other hand, these enzymes seem to have only a minor role in the control of renal haemodynamics and excretory function in UNX HS and 2K1C models, even though they are responsible for Ang II production, both in tissues and plasma, To investigate the direct role of these enzymes in hypertension chronic experiments are required.

Combined inhibition of two different pathways of Ang II synthesis induced substantial decrease in mean arterial blood pressure (MABP) and preserved renal perfusion (RBF). The combined treatment (chymostatin and captopril) resulted in better hypotensive effects in SHR 16 as compared with chymostatin alone. Both inhibitors (chymostatin and captopril) also decreased Ang II level in plasma and tissues in SHR 16 more efficiently than did chymostatin alone. These results suggest the influence of local RAAS (chymase and ACE cooperation) in maintaining blood pressure and Ang II synthesis in established stage of genetic hypertension (SHR 16).

Peptides from rapeeseds were shown to have a minor role in blood pressure control and they did not affect haemodynamics and excretion in SHR, at least when given intravenously in acute experiments.

It was often assumed that ACE-dependent pathway of Ang II production (systemic RAAS) is the system that affects mostly blood pressure control, haemodynamics and excretory function of the kidney. Simultaneously, large body of studies confirm that ACE inhibitors are not as efficient in their hypotensive effects as expected and that they cannot completely inhibit tissues RAAS activity. **As our *in vivo* study indicated, that chymostatin sensitive enzymes play a substantial role in plasma and tissue regulation of Ang II content, and combined inhibition of two different pathways of Ang II synthesis (systemic and tissue RAAS) could be much more efficient in the treatment of hypertension.**

I. Wstęp

1. Rola ogólnoustrojowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) w regulacji ciśnienia krwi i czynności nerek: fizjologia i patofizjologia

Czynność nerek ma zasadnicze znaczenie dla utrzymania stałości środowiska wewnętrznego organizmu i tym samym dla regulacji składu i objętości płynów ustrojowych. Nerki nieustannie modyfikują objętość oraz skład wytwarzanego moczu usuwając nadmiar wody i reagując na jej niedobór zatrzymaniem płynów w organizmie oraz regulując skład substancji osmotycznie czynnych w wydalonym moczu. Dwa aspekty czynności nerek, jakimi są czynność regulacyjna i wydalnicza, mają zasadnicze znaczenie dla utrzymania homeostazy płynów ustrojowych, odgrywając tym samym kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi [Guyton 1991; Cowley 1992; Mitchel i Navar, 1995].

W nerkach znajduje się szereg substancji wpływających na wewnątrznerkowe krążenie krwi, natomiast kluczowym układem regulującym przepływ krwi zarówno w krążeniu ogólnym, jak i lokalnie (w tym w krążeniu nerkowym) jest układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS, ang. *renin angiotensin-aldosterone system*).

Układ RAAS jest pierwszym odkrytym układem enzymatyczno-hormonalnym, a jego poszczególne elementy są syntetyzowane w odrębnych tkankach organizmu pod wpływem specyficznych czynników lokalnych [Grzeszczak 2007]. Układ ten funkcjonuje jako całość dzięki wzajemnym związkom opartym na sprzężeniach zwrotnych. W skład układu wchodzi trzy zasadnicze elementy: renina, angiotensyna i aldosteron. Historia badań nad układem RAAS sięga końca XIX wieku. Jednym z ważnych etapów poznawania mechanizmów związanych z jego funkcjonowaniem było opublikowanie w 1898 r. wyników badań prof. Roberta Tigerstedta i jego asystenta Pera Bergmana nad presyjnym wpływem na ciśnienie tętnicze krwi wyciągów z nerek królików. Odkryto w ten sposób reninę, wydzielaną przez aparat przykłębuszkowy nerek [Marks i Maxwell, 1979]. Podobne znaczenie miały obserwacje Goldblatta z 1934 r., związane z doświadczalnym nadciśnieniem tętniczym u psów [Goldblatt i wsp., 1934]. W następnych latach wyjaśniono właściwości enzymatyczne i budowę reniny oraz peptydów angiotensynowych, powstających w wyniku działania reniny i enzymu konwertującego angiotensynę I do jej aktywnej postaci — angiotensyny II (Ang II). Ta ostatnia należy do najważniejszych regulatorów wydzielania aldosteronu. W 1940 roku Braun-Menendez oraz Page i Holmes udowodnili, że pod wpływem reniny powstają peptydowe związki presyjne, zaś w roku 1956 Skeggs opisał sekwencję angiotensyny II [cytowano wg Phillips i Schmidt-Ott, 1999].

Główną rolą układu RAAS jest regulacja poziomu ciśnienia tętniczego krwi przez obkurczanie naczyń krwionośnych i fizjologiczna regulacja gospodarki wodno-elektrolitowej poprzez wpływ na objętość krążącej krwi na drodze regulacji retencji wody oraz jonów sodu i potasu. Tym samym układ RAAS wpływa zarówno bezpośrednio jak i pośrednio na wartość ciśnienia krwi. Działając poprzez naczyniokurczącą angiotensynę II (Ang II), układ RAAS bezpośrednio reguluje przepływ krwi w naczyniach, odpowiada za wzrost oporów obwodowych i ciśnienia tętniczego krwi. Natomiast pośredni wpływ na ciśnienie krwi wywierają zarówno Ang II jak i pobudzany przez nią aldosteron. Oba czynniki stymulują kanalikowy transport sodu, przyczyniając się do wzrostu objętości płynów ustrojowych. Aldosteron pobudza proces zarówno resorpcji sodu jak i wydzielania potasu przyczyniając się do podwyższenia stężenia jonów sodu w osoczu i wzrostu ciśnienia tętniczego krwi.

Zwiększona aktywność obu wymienionych hormonów to bardzo często przyczyna a jednocześnie wyraźny objaw rozwijającego się nadciśnienia tętniczego. Ponieważ głównym efektem pobudzenia układu RAAS jest przede wszystkim wzrost ciśnienia tętniczego krwi, poszczególne składowe tego układu są punktem uchwytu w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Lekami znoszącymi efekty pobudzenia układu RAAS są m.in.: inhibitory konwertazy angiotensyny, antagoniści receptorów angiotensynowych i blokery receptora aldosteronowego [Donoghue i wsp., 2000; Kobori i wsp., 2007]. Choć wyżej wspomniane leki, wpływające na aktywność RAAS, posiadają ugruntowane miejsce w terapii nadciśnienia tętniczego, nadal nie poznano wszystkich aspektów działania tego złożonego i zróżnicowanego układu [Kobori i wsp., 2007].

Nowe badania i odkrywanie kolejnych składowych układu ujawniają nieznanne ogniwa i dużą złożoność funkcjonowania układu RAAS [Tipnis i wsp., 2000, Vickers i wsp., 2002]. Dodatkowo, sprawę komplikuje fakt, że obok układu RAAS działającego ogólnoustrojowo istnieją także jego odpowiedniki lokalne, działające w takich tkankach jak mózg, serce, ściany naczyń krwionośnych czy też nerki [De Mello i wsp., 2011; Qian i wsp., 2013].

1.1. Renina i regulacja jej stężenia we krwi

Układ RAAS jest układem enzymatyczno-hormonalnym, w którym kluczową rolę w inicjowaniu całej kaskady reakcji pełni renina. Ta kwaśna proteaza aspartylowa (enzym polipeptydowy z resztą kwasu asparginowego w miejscu aktywnym), wytwarzana w komórkach ziarnistych aparatu przykłębuszkowego nerek prowadzi do powstania peptydów angiotensynowych o szerokim spektrum działania biologicznego. Reninę wyróżnia na tle innych enzymów duży stopień selektywności w stosunku do substratu, którym jest powstający w wątrobie a uwalniany do osocza angiotensynogen. Na początkowym etapie syntezy reniny powstaje preprorenina jako

glikoproteid, następnie prorenina, która pod wpływem enzymu kalikreiny ulega przekształceniu w 406-aminokwasową reninę ostateczną, a cały proces jej syntezy i uwalniania podlega ścisłym mechanizmom regulacji.

Głównym miejscem powstawania reniny krążącej we krwi są komórki ziarniste aparatu przykłębuszkowego nerek (warstwa środkowa ściany tętniczek doprowadzających i w mniejszym stopniu tętniczek odprowadzających). Komórki ziarniste, inaczej nazywane komórkami przykłębuszkowymi, pełnią również rolę baroreceptora wewnątrznerkowego, który reaguje na zmiany ciśnienia krwi w tętnicy doprowadzającej. Liczba komórek ziarnistych nie jest stała i może ulec zwiększeniu w stanach zwiększonego zapotrzebowania na reninę lub w stanach patologicznych jak np. w nadciśnieniu naczyniowo-nerkowym. Uwalniana do krwi renina działa na angiotensynogen i odszczepia od niego nieaktywny deka-peptyd angiotensynę I (Ang I). Ang I po przejściu przez płuca przekształcana jest w oktapeptyd, czyli Ang II pod wpływem enzymu konwertującego (ACE, ang. *Angiotensin Converting Enzyme*, EC.3.4.15.1) umiejscowionego w komórkach śródłonek płuc. Wobec obfitości w ustroju angiotensynogenu i enzymu konwertującego, ilość krążącej Ang II jest głównie zależna od wydzielania reniny w nerkach, a o tempie tego procesu decydują różne czynniki pobudzające i hamujące. Najważniejsze czynniki powodujące wyrzut reniny to:

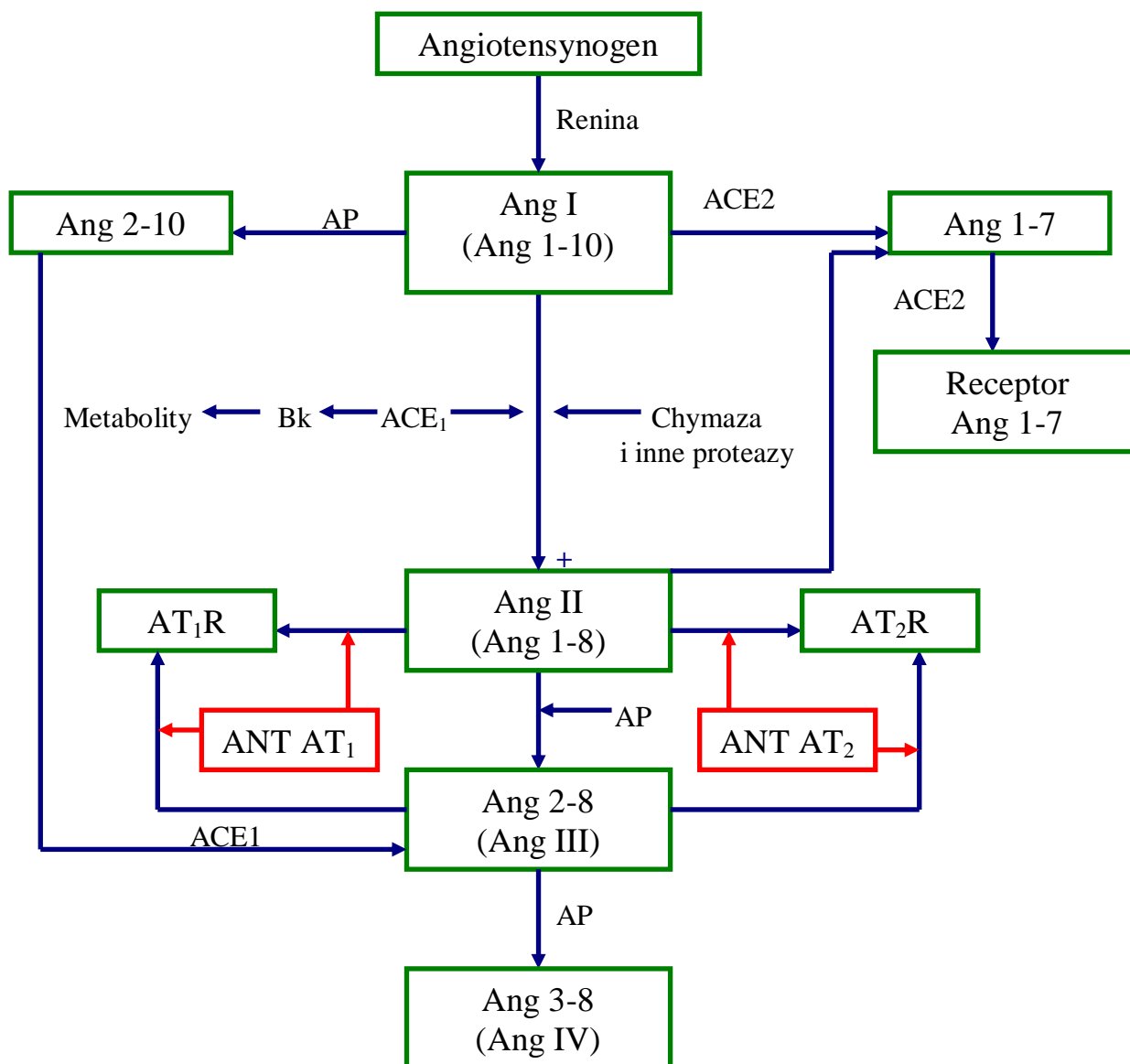
- zwiększona aktywność układu współczulnego: pobudzenie receptorów beta-adrenergicznych zlokalizowanych w komórkach aparatu przykłębuszkowego przez noradrenalinę uwalnianą z zakończeń współczulnych prowadzi do zwiększenia wydzielania reniny;
- obniżone stężenie jonów sodu np. w wyniku przewodnienia organizmu (hiponatremia, czyli obniżenie poziomu sodu we krwi poniżej normalnego poziomu, u ludzi 135-145 mmol/l);
- zmniejszenie zawartości sodu w komórkach płamki gęstej kanalika nerkowego (zmniejszenie tempa transportu sodu ze światła kanalika do komórek płamki związane ze zmniejszeniem szybkości przepływu moczu przez kanalik nerkowy na poziomie komórek płamki gęstej);
- obniżenie ciśnienia transmuralnego w tętnicy doprowadzającej (poniżej 90 mmHg) w sąsiedztwie komórek ziarnistych (udział lokalnej regulacji przez te baroreceptory).

Komórki przykłębuszkowe reagują na bardzo niewielkie zmiany ciśnienia transmuralnego. Obniżenie jego wartości o 5 mm Hg powoduje dwukrotne zwiększenie stężenia reniny w osoczu. Pobudzenie tych komórek umiejscowionych w tętnicy doprowadzającej kłębuszka nerkowego (zmiana aktywności wydzielniczej komórek o właściwościach baroreceptyjnych pod wpływem rozciągnięcia tętniczki doprowadzającej) w wyniku mniejszego rozciągnięcia ścian tętniczki doprowadzającej na skutek spadku ciśnienia perfuzyjnego zwiększa wydzielanie reniny.

Uważa się, że ciśnienie perfuzyjne nerek (t.j. ciśnienie w tętnicy nerkowej) poniżej 60 mmHg jest niedostateczne i doprowadza do niedotlenienia nerki. Obniżenie ciśnienia tętniczego

w tętnicy doprowadzającej poniżej 65 mmHg powoduje zwiększenie stężenia reniny, natomiast wzrost ciśnienia powoduje zahamowanie wydzielania reniny. Innym istotnym czynnikiem wpływającym na uwolnienie reniny jest pobudzenie chemoreceptorów płamki gęstej kanalika dalszego na skutek obniżonego stężenia jonów Na^+ i Cl^- w moczu przepływającym przez ten odcinek kanalika.

Powstająca z angiotensynogenu angiotensyna I to prekursor dalszych angiotensyn charakteryzujących się znacznym zróżnicowaniem oraz odmienną aktywnością biologiczną. Godny uwagi jest fakt, że istnieje możliwość przekształcania tych samych peptydów przez różne enzymy, zarówno działające ogólnoustrojowo (ACE) jak i lokalnie w tkankach (ACE, chymaza czy elastaza-2) [Kunori i wsp., 2002, Solivan i wsp., 2002]. Nie ulega wątpliwości, że aktywność tych enzymów decyduje o ostatecznych efektach pobudzenia RAAS w poszczególnych narządach i tkankach oraz o charakterze ich oddziaływania na komórki (Ryc.1.).



Ryc. 1. Powstawanie najważniejszych aktywnych angiotensyn

Powstawanie peptydów angiotensynowych i uczestniczące w nich reakcje enzymatyczne: Z biologicznie nieczynnej Ang I powstaje oktapeptyd, Ang 1-8 (Ang II). Reakcja ta jest katalizowana przez ACE, który działa od strony reszty karboksylowej. Na Ang I może także oddziaływać aminopeptydaza A, która przekształca ją w Ang 2-10. Pod wpływem ACE2 z Ang I lub II powstaje heptapeptyd Ang (1-7). Z Ang II w wyniku działania aminopeptydaz powstać może Ang 2-8 (Ang III). Ang III może także powstać pod wpływem działania ACE na Ang 2-10. Z kolei Ang III może ulec przekształceniu pod wpływem aminopeptydazy B w Ang 3-8 (Ang IV).

ACE – enzym konwertujący angiotensynę, Ang – angiotensyna, ANT – antagonist, AP – aminopeptydaza, AT_xR – receptory angotensyny, Bk – bradykinina

(źródło: Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyłło W. 2005. Inhibitory Konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Kraków, wyd. I, strona 45)

1.2. Szlak powstawania angiotensyny II

Angiotensyna II to jeden z najbardziej efektywnych regulatorów ciśnienia krwi. Poprzez działanie kurczące na mięśniówkę drobnych naczyń krwionośnych zwiększa opór naczyniowy i podwyższa ciśnienie tętnicze krwi. Peptyd ten reguluje również homeostazę wodno-elektrolitową organizmu poprzez bezpośredni udział w nerkowym transporcie kanalikowym, wpływa także pobudzająco na współczulny układ nerwowy oraz na biosyntezę i wydzielanie aldosteronu z kory nadnerczy [Ploth, 1983].

Powszechnie uznaje się, że w warunkach fizjologicznych konwertaza angiotensyny (ACE, ang. *angiotensin-converting enzyme*, alternatywna nazwa enzymu – kininaza) katalizuje przemianę Ang I w silnie naczyniokurczącą Ang II. ACE jako enzym konwertujący Ang I w Ang II jest nieswoisty i poza wspomnianą funkcją unieczynnia także bradykininę. Synteza enzymu konwertującego, jednego z kluczowych enzymów układu RAAS, zachodzi w wyniku „transkrypcji genu (MIM 106180) znajdującego się na chromosomie 17 (17q23)” [cytowane wg Januszewicz i wsp., 2005]. Enzym konwertujący jest dipeptydową karboksypeptydazą zbudowaną z dwóch identycznych domen. Enzym ten odgrywa zasadniczą rolę nie tylko w przekształcaniu Ang I w II, ale również Ang (2–10) w Ang III (Ryc. 1.). Powoduje również dwuetapową degradację bradykininy, a także hydrolizę substancji P, neurokininy, enkefaliny i niektórych hormonów peptydowych [Zhao i Xu, 2008].

Podwyższony poziom Ang II często towarzyszy chorobie nadciśnieniowej, a blokowanie enzymu konwertującego (ACE) jest powszechnie stosowanym elementem terapii nadciśnieniowej. ACE, będący metaloproteazą cynkową, jest w stanie przekształcać zarówno Ang I w krążącą we krwi Ang II jak również angiotensynę wytwarzaną lokalnie w tkankach. Stąd czynność nerek regulowana jest przez Ang dopływające do nerek z krwią oraz przez hormony powstające w nerkach przy udziale tkankowego układu RAAS. ACE występuje powszechnie w ścianie naczyń (śródbłonek, przydanka), w sercu, w mózgu, gruczołach wydzielania wewnętrznego (nadnercza, jajniki, jądra), w ścianie przewodu pokarmowego (żołądek, jelita), w nerkach oraz w pojedynczych komórkach takich jak fibroblasty czy makrofagi, ale jego obecność stwierdzono także w płynach ustrojowych: w płynie owodniowym, nasiennym i moczu. Często jednak Ang II powstaje w ustroju pomimo hamowania ACE, nawet jeśli stosowane są duże dawki jego inhibitorów (kaptopryl, enalapryl czy ramipryl) [Unger i wsp., 2011].

1.3. Fizjologiczne i patofizjologiczne znaczenie receptorów angiotensyny II

Ang II działa poprzez aktywację dwóch głównych typów receptorów: AT₁ i AT₂ (AT₁R, AT₂R, ang. *Angiotensin II Type 1 and 2 Receptor*). Efekty pobudzenia tych dwóch typów receptorów zależą od stężenia samego peptydu, od liczby i powinowactwa jego receptorów a także od zmian stężenia elektrolitów w środowisku zewnątrzkomórkowym czy też od obecności związków hamujących lub wspomagających aktywację tych samych szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Stwierdzono także, że sam peptyd (Ang II) może pobudzać lub przeciwnie wyciszać ekspresję swoich własnych receptorów i wpływać na wydzielanie innych ważnych hormonów i cytokin, które mogą dodatkowo potęgować lub osłabiać działanie Ang II.

W warunkach fizjologicznych regulacja receptorów umożliwia optymalne dostosowanie funkcji komórki do aktualnych warunków. W stanach patologicznych dochodzi do zaburzenia regulacji receptorów Ang II i ich nadmiernej lub – przeciwnie – niedostatecznej ekspresji, co może prowadzić do powstawania i pogorszenia stanu osób cierpiących na takie choroby jak nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, cukrzyca i otyłość.

1.3.1. Regulacyjna rola, rozmieszczenie i mechanizm pobudzenia receptorów AT₁

Receptory AT₁ (AT₁R) występują w wielu narządach. „Gen receptora AT₁ znajduje się na chromosomie 3 w regionie q21-q25” [cytowane wg. Januszewicz i wsp., 2005], jego obecność wraz z białkiem receptorowym stwierdzono w ścianie naczyń (komórki śródbłonna, miocyty, fibroblasty), w sercu (kardiomiocyty i fibroblasty), w nerkach (podocyty, komórki mezangialne, fibroblasty, komórki ścian kanalików nerkowych i naczyń tętniczych), w płucach (nabłonek oddechowy), w mózgu (neurony, komórki glejowe), w przewodzie pokarmowym, w wątrobie oraz w przysadce mózgowej, nadnerczach, jajnikach i jądrach. Obecność licznych AT₁R stwierdzono w układzie nerwowym autonomicznym, a zwłaszcza w jego części współczulnej (m.in. ciała komórkowe neuronów przedzwojowych i pozazwojowych).

Pobudzenie AT₁R uruchamia w komórce zarówno szybkie reakcje, trwające do kilkunastu minut, jak i długotrwałe, związane z chronicznie zwiększoną ich stymulacją i zwiększoną transkrypcją genu. Nadekspresja AT₁R indukuje przebudowę tkanki mięśniowej serca, ścian naczyń krwionośnych a także zwiększa naczyniokurczącą reakcję na Ang II [Lerman i wsp., 2005], prowadzi także do zwiększonej przepuszczalności naczyń włosowatych kłębuszków nerkowych dla białek, a w dalszej kolejności do zwłóknienia kłębuszków i uszkodzenia całej nerki.

Duży wpływ na poznanie roli poszczególnych receptorów Ang II miała synteza selektywnych antagonistów. Wielu informacji dostarczyły badania dotyczące związków

blokujących selektywnie AT₁R, tzw. sartanów (losartan, kandesartan, walsartan, irbesartan czy też olmesartan). Związki te różnią się kinetyką działania, powinowactwem i zdolnością przenikania przez barierę krew-mózg, wszystkie jednak skutecznie sprawdziły się jako podawane doustnie inhibitory AT₁R.

Szybkie działanie Ang II za pośrednictwem receptorów AT₁

AT₁R należą do rodziny siedmiodomenowych białek przezbłonowych. Pomiedzy związaniem receptora z Ang II a zależnym od wapnia efektem naczyniozężającym w mięśniu gładkim ściany naczyniowej występuje wiele złożonych etapów przekazywania sygnału w obrębie komórki (Ryc. 2.). Przyłączenie Ang II wywołuje stymulację fosfolipazy C, która przekształca w procesie hydrolizy fosfolipidy połączone z błoną komórkową, co prowadzi do uwolnienia trifosforanu inozytolu (IP₃) i diacyloglicerolu (DAG), dochodzi do mobilizacji wapnia ze śródbłonna naczyń. W ten sposób IP₃ powstający z hydrolitycznego rozkładu fosfolipidów inozytolowych [Berridge, 1983], działając na swoje receptory w siateczce śródplazmatycznej, uwalnia z nich jony wapnia, które zapoczątkowują procesy skurczu i zwiększają aktywność innych białek regulujących procesy wewnątrzkomórkowe. DAG z kolei aktywuje kinazę białkową C, która w procesie fosforylacji przenosi grupę fosforanową z ATP do białka docelowego [Nishizuka, 1984].

Ang II nasila także aktywację zależnych od napięcia kanałów wapniowych, czyli ułatwia pozostawanie tych kanałów w stanie otwartym w odpowiedzi na falę depolaryzacji. Mediatorem tego efektu Ang II jest białko przekaźnikowe wiążące GTP. Takie kanały, w których białka G zwiększają prawdopodobieństwo otwarcia, zwane są kanałami zależnymi od białka G [Birnbaumer i wsp., 1989]. Przypuszcza się, że w odpowiedzi na pobudzenie naczyniowych AT₁R przez Ang II dwa mechanizmy prowadzą do zwiększonego uwalniania wapnia z siateczki sarkoplazmatycznej: wytwarzanie IP₃ oraz bezpośrednie pobudzenie kanału wapniowego przez białko G. Takie wzmożone uwalnianie wapnia zwiększa skurcz i napięcie ściany naczyniowej [Berridge, 1983].

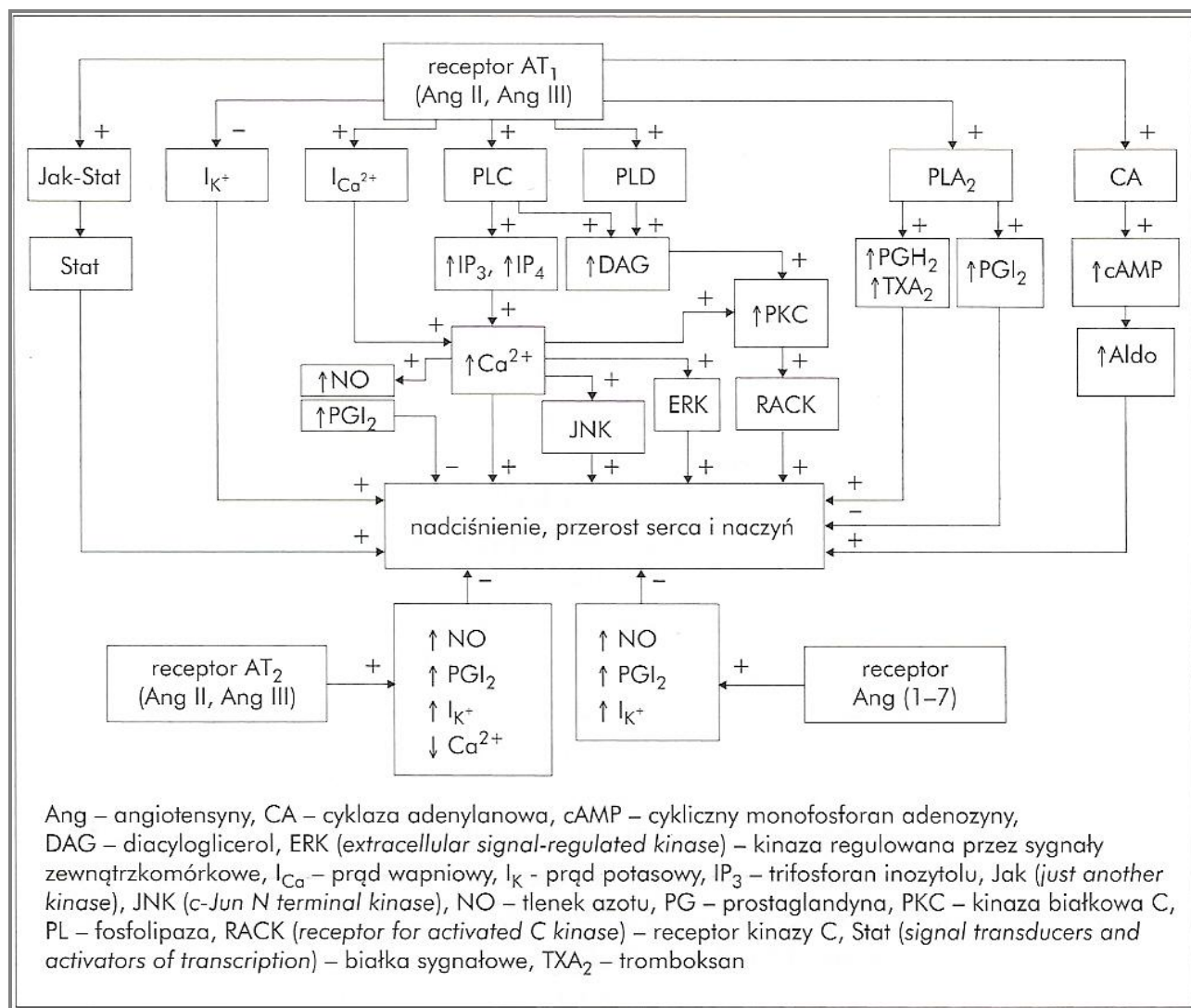
Ang II reguluje również pobudliwość mięśni gładkich, neuronów i innych komórek poprzez wpływ na przewodność kanałów dla jonów potasu i chloru oraz nieselektywnych kanałów dla kationów. Pobudzenie AT₁R powoduje zamknięcie kanałów potasowych zależnych od potencjału (I_A, w sercu I_{to}), kanałów regulowanych przez jony wapnia (K_{Ca}) i przez ATP (K_{ATP}). Dzięki zamknięciu kanałów potasowych potencjał błonowy komórek w spoczynku przyjmuje wartości mniej ujemne, a repolaryzacja po pobudzeniu przebiega wolniej (Ryc. 2.).

Jedną z konsekwencji zwiększonego stężenia jonów wapnia w komórce jest aktywacja enzymów odpowiedzialnych za syntezę eikozanoidów i tlenku azotu. Stwierdzono, że w komórkach

układu krążenia i nerek Ang II zwiększa aktywność fosfolipazy A₂, która hydrolizuje fosfatydylocholinę i fosfoetanolaminę do lizosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych. Dzięki temu zwiększa się również stężenie kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów o działaniu naczyniorozszerzającym (prostacyklina, PGI₂) i naczyniozwążającym (tromboksan A₂, TXA₂; prostaglandyna H₂, PGH₂). Proporcja między eikozanoidami naczyniorozszerzającymi i naczyniozwążającymi zależy od czynników regulujących aktywność cyklooksygenaz i syntazy tromboksanu (Ryc. 2.).

Zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie aktywuje również śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS, NOS3), prowadząc do zwiększonego wytwarzania działającego naczyniorozszerzająco tlenu azotu (NO). Zwiększone wytwarzanie PGI₂ i NO, do którego dochodzi w ścianie naczyń w wyniku aktywacji AT₁R, ogranicza częściowo naczyniozwążający wpływ Ang II, nie znosi go jednak całkowicie. Wyjątek stanowią naczynia rdzenia nerek, w których naczyniozwążające działanie Ang II ujawnia się dopiero po zablokowaniu endotelialnej syntazy tlenu azotu [Oak i Cai; 2007].

Bezpośredni wpływ Ang II na naczynia tętnicze jest zróżnicowany i zależy od liczby i rozmieszczenia AT₁R. Receptory AT₁ zlokalizowane są zarówno w komórkach mięśni gładkich, jak i w komórkach śródbłonka naczyń. Najbardziej wrażliwe na naczyniokurczące działanie hormonu są naczynia łożyska trzewnego, tętniczki odprowadzające kłębuszków nerkowych oraz naczynia proste (*vasa recta*) rdzenia nerek. Jednak ostateczna siła z jaką Ang II działa na tkanki zależy także od działania innych związków, synergicznych lub antagonistycznych w stosunku do Ang II. Efektem pobudzenia receptorów AT jest zwiększenie syntezy tlenu azotu (NO) i prostacykliny (PGI₂) w komórkach śródbłonka, a zablokowanie ich uwalniania, np. na skutek uszkodzenia śródbłonka znacznie potęguje naczyniokurczące działanie hormonu [Allen i wsp., 1999].



Ryc. 2. Mechanizm pobudzenia receptorów dla peptydów angiotensynowych

(źródło: Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyło W. 2005. Inhibitory konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Kraków, wyd. I, strona 41)

1.3.2. Regulacyjna rola, rozmieszczenie i mechanizm pobudzenia receptorów AT₂

Niekorzystne skutki nadmiernego pobudzenia RAAS wynikają głównie z aktywacji AT₁R, być może dlatego dane literaturowe dotyczące mechanizmu pobudzenia i regulacji receptorów AT₂ są zdecydowanie mniej liczne. Gen dla receptora AT₂ znajduje się w chromosomie X. Transkrypcja genu dla receptora AT₂ prowadzi do powstania białka zbudowanego z 363 aminokwasów (siedmiodomenowe receptory błony komórkowej). Prawdopodobnie AT₂R mają większe znaczenie w życiu płodowym niż po urodzeniu, a ich ekspresja maleje w ciągu kilku pierwszych lat życia, przeciwnie niż w przypadku AT₁R.

Rozmieszczenie receptorów AT₂.

Receptory AT₂ (AT₂R) znajdują się głównie w układzie sercowo-naczyniowym: w sercu występują na błonach kardiomiocytów i fibroblastów oraz w ścianie naczyń. Zostały opisane także w mózgu (głównie w podwzgórzu i rdzeniu przedłużonym), nadnerczach i wysepkach trzustki. AT₂R występują także w nerkach, w śródbłonku naczyń nerkowych, na pograniczu strefy zewnętrznej i wewnętrznej rdzenia nerek, w ścianie kanalików proksymalnych i w torebce nerkowej [Allen i wsp., 1999].

Regulacja receptorów AT₂ i ich działanie

Pobudzenie (poprzez Ang II) AT₂R w układzie krążenia prowadzi do zwiększenia syntezy bradykininy, prostaglandyny I₂ oraz tlenku azotu (NO). Dochodzi także do zahamowania działania kinaz (ERK, ang. *extracellular signal-regulated kinase* i MAP, ang. *mitogen-activated protein kinase*) i do zmniejszenia aktywności kanałów wapniowych T. Otwierają się natomiast kanały potasowe przez cykliczny monofosforan guanozyny (cGMP), którego wytworzenie stymuluje NO. Stymulacja tych receptorów chroni układ sercowo-naczyniowy przed negatywnym działaniem cytokin i aldosteronu [Allen i wsp., 1999].

Efekty działania Ang II za pośrednictwem AT₂R są przeciwstawne do efektów pobudzenia AT₁R, ale te pierwsze widoczne są dopiero po pełnym zablokowaniu receptorów AT₁. Hipotensyjne działanie Ang II na układ krążenia poprzez AT₂R jest bowiem zdecydowanie słabsze niż silne presyjne działanie peptydu poprzez receptory AT₁. Jak wskazują dane literaturowe spadek ciśnienia tętniczego widoczny po zablokowaniu AT₁R jest skutkiem dwóch zjawisk: po pierwsze, następuje zablokowanie możliwości związania Ang II i III z zablokowanymi AT₁R (farmakologiczni antagoniści, np. losartan), po drugie, dochodzi przez to do zwiększenia puli tych peptydów, które mogą wejść w oddziaływanie z AT₂R.

W warunkach fizjologicznych występuje równowaga między syntezą i pobudzeniem przez Ang II obu typów receptorów AT. Natomiast w stanach patologicznych może dojść do zakłócenia tej równowagi, czasem w wyniku działania samej Ang II albo innych komponentów układu RAAS. Do zakłócenia tej równowagi mogą się przyczynić także inne hormony i cytokiny lub zmiany środowiska zewnątrzkomórkowego. Ekspresja receptorów AT₂ może być zredukowana przez czynnik TGF-β, a zwiększona dzięki działaniu czynnika insulinopodobnego (IGF1) oraz estrogenów [Kawabata i wsp., 2012].

Większość badań dotyczących efektów stymulacji AT₂R świadczy o ich ochronnej roli w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Niektóre z badań dotyczących udziału AT₂R

w stanach patologicznych wskazują na ich rolę w zapobieganiu nadmiernemu podwyższeniu ciśnienia tętniczego krwi w warunkach chronicznych [Nakamura i wsp., 2003]. Z badań tych wynika,

że długotrwałe podawanie losartanu szczurom spontanicznie nadciśnieniowym (SHR, ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*), wywołuje u nich nadekspresję mRNA dla AT₂R w ścianie aorty, a skutkiem jest naczyniorozszerzające działanie Ang II (aktywacja receptorów B₂ bradykininy i udział NO) [Nakamura i wsp., 2003; Igase i wsp., 2005].

Wykazano także, że u myszy "knocked out" (bez genu dla AT₂R) wytwarzanie NO i bradykininy zostało zmniejszone, zaś podanie Ang II wywoływało znacznie większe wzrosty ciśnienia tętniczego krwi i większe zatrzymanie sodu niż u myszy kontrolnych, którym nie usunięto tego genu [Siragy i wsp., 1999]. Natomiast szczurom SHR, które spontanicznie rozwijają nadciśnienie i w wyniku tego dochodzi u nich do przerostu mięśnia sercowego, doświadczalnie zwiększano ekspresję genu dla AT₂R w sercu (wprowadzano miejscowo do ścian komór serca gen dla AT₂R sprzężony z promotorem genu MLC-2v). Stwierdzono zmniejszenie masy mięśnia lewej komory serca (LV, ang. *left ventricular*) i grubości przegrody międzykomorowej, natomiast nie było zmian masy innych narządów ani przebudowy innych części układu krążenia. Zmniejszenie przerostu LV skorelowano ze zwiększeniem liczby AT₂R [Avila w wsp., 2011]. Podobne wnioski płynęły z badań Adachi i wsp. (2003) na myszach pozbawionych genu dla AT₂R, u których podwiązanie tętnicy wieńcowej wywołało pogłębione objawy niewydolności serca i zwiększyło śmiertelność zwierząt. U zwierząt stwierdzono wzrost ekspresji mRNA dla AT₁R oraz wzrost liczby receptorów (zmiany głównie w fibroblastach).

Pojawiają się także doniesienia świadczące o niekorzystnych skutkach pobudzenia AT₂R, co ciekawe efekty ich stymulacji są podobne do tych towarzyszących pobudzeniu AT₁R. W badaniach Ryckwaerta i wsp. (2005) udowodniono, że jednoczesne zablokowanie obu typów receptorów AT (poprzez walsartan i PD 123319) znacznie wydajniej poprawiało przepływ wieńcowy oraz funkcję skurczową i rozkurczową serca w okresie reperfuzji po niedokrwieniu niż blokowanie jedynie AT₁R samym walsartanem. Walsartan jest aktywny po podaniu doustnym, to silny i specyficzny antagonist receptorów dla Ang II. Działa wybiórczo na podtyp receptora AT₁ z około 20 000 razy większym powinowactwem do receptora AT₁ niż do receptora AT₂. Zwiększone stężenie Ang II w osoczu po zablokowaniu receptora AT₁ przez walsartan może stymulować receptor AT₂. Także w zwężeniu światła żyły krezkowej i wrotnej (poprzez Ang II) pośredniczą oba typy receptorów dla Ang II, a ich działanie jest modulowane przez NO. Natomiast badania na izolowanych kardiomiocytach [D'Amore i wsp., 2005], do których wprowadzono adenowirusy kodujące receptory AT obu typów, skłoniły naukowców do wysunięcia wniosku o współdziałanie stymulowanych AT₂R w wywoływaniu przerostu mięśnia sercowego. W badaniach

Ruiz-Ortegi i wsp. (2006) wykazano, że w zapaleniu nerek AT₂R odgrywają ważną rolę w determinowaniu komórek odpowiedzi zapalnej do ogniska zapalenia.

Reasumując, Ang II działając poprzez AT₁R powoduje przebudowę oraz przerost ścian naczyń krwionośnych, włóknienie i przerost mięśnia sercowego, a także wywoływać zaburzenia w mikrokrażeniu mózgowym i nerkowym. Natomiast kiedy AT₁R jest nieaktywny zwiększonemu pobudzeniu przez Ang II ulega receptor AT₂, który zwiększa wytwarzanie tlenku azotu i prostaglandyn rozszerzających naczynia krwionośne oraz hamuje mechanizmy zakrzepowe i zapalne w śródbłonku.

1.4. Działanie angiotensyny II na układ krążenia

Angiotensyna II jest najistotniejszym peptydem hormonalnym RAAS regulującym ciśnienie tętnicze krwi i gospodarkę wodno-elektrolitową. Zakres działania Ang II na układ krwionośny zależy od czasu trwania bodźców stymulujących jej wydzielanie. Krótkotrwałe zwiększenie stężenia Ang II we krwi wywołuje krótkotrwały wzrost ciśnienia tętniczego spowodowany bezpośrednim działaniem hormonu na mięśnie gładkie naczyń tętniczych poprzez aktywację receptorów AT₁.

Chroniczne zwiększenie wydzielania peptydu wywołuje poza skurczem naczyń również złożone działania pośrednie, związane z pobudzeniem układu współczulnego oraz sekrecją katecholamin, wazopresyny, aldosteronu i endoteliny. Zarówno ogólnoustrojowe jak i lokalnie powstająca Ang II może odgrywać ważną rolę w regulacji wydzielania aldosteronu [Miyazaki i Takai, 2001].

W trakcie długotrwałego pobudzenia RAAS Ang II zwiększa syntezę i wydzielanie aldosteronu a także czynników wzrostu oraz cytokin prozapalnych, wywołując wraz z tymi związkami przebudowę układu krążenia prowadzącą do wtórnego uszkodzenia takich narządów jak serce czy nerki. Działająca lokalnie Ang II (w tkankach) wywiera działanie mitogenne na miocyty serca i komórki mięśni gładkich ściany naczyń, zwiększa także syntezę kolagenu w mięśniu sercowym i naczyniach, przyczyniając się do rozwoju przerostu lewej komory serca, pogrubienia ścian tętnic i wtórnego uszkodzenia narządów (ang. *end organ damage*).

Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że Ang II wywołuje apoptozę komórek śródbłonka oraz przerost mięśni gładkich naczyń krwionośnych i dodatkowo potęguje apoptotyczne działanie nadtlenku wodoru, H₂O₂ [Akishita i wsp., 2005]; zwiększa też syntezę specyficznych białek kurczliwych (zwiększenie ekspresji mRNA dla α -aktyny). W wyniku chronicznego oddziaływania Ang II na jej receptory AT₁ dochodzi do zwiększenia syntezy i wydzielania takich związków o charakterze hiperplastycznym, hipertroficznym i miażdżycowym (aterogennym) jak

transformujący czynnik wzrostu (TGF- β , ang. *Transforming growth factor beta*), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. *Platelet-derived growth factor*), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. *Fibroblast Growth Factor*), cytokiny (interleukiny: IL-1 α , IL-2, IL-6), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , ang. *Tumor Necrosis Factor*) czy reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) [Kawabata i wsp., 2012].

Ang II wpływa także na zwiększone wydzielanie osteopontyny, adhezyjnego białka zwiększającego aktywność integryn, białek ułatwiających migrację i przyleganie komórek mięśni gładkich; usunięcie genu dla osteopontyny u myszy zapobiega przebudowie ścian serca [Abe i wsp., 2008]. W badaniach *in vivo* na szczurach SHR stwierdzono zależną od wzmożonej aktywności receptorów AT₁ przebudowę ścian naczyń tętniczych. Chronicznie podawanie antagonistów receptora AT₁ lub inhibitora ACE u tych szczurów cofało hipertrofię ściany naczyń wieńcowych, naczyń mózgu i nerek [Ito i wsp., 2007]. Także badania kliniczne u ludzi wskazują na regresję zmian przerostowych w tętniczkach oporowych krążenia obwodowego pod wpływem wspomnianych czynników. Długotrwałe pobudzanie receptorów AT₁ w sercu prowadzi również do hipertrofii kardiomiocytów, hiperplazji i hipertrofii fibroblastów oraz zwłóknienia przestrzeni śródmiąższowej. Pod wpływem Ang II dochodzi do zwiększenia syntezy czynnika wzrostu tkanki łącznej w sercu (CTGF, ang. *connective tissue growth factor*) i niekorzystnie zmienia się stosunek kardiomiocytów do fibroblastów, wzrasta wytwarzanie kolagenu typu I i III a także fibronektyny, natomiast maleje aktywność metaloproteinazy 1 (MMP 1, ang. *Matrix Metalloproteinase-1*). Takie zwiększenie udziału elementów niekurczliwych w tkankach powoduje usztywnienie ścian komór serca, zmniejszenie ich kurczliwości, utrudnia wreszcie przewodzenie pobudzenia między komórkami mięśnia sercowego a komórkami nerwowymi a także wydłużenie drogi dla O₂, CO₂ i składników odżywczych między siecią naczyń krwionośnych a kardiomiocytami [Ito i wsp., 2007].

1.5. Wpływ angiotensyny II na hemodynamikę nerek i transport kanalikowy

Chroniczne zwiększenie syntezy Ang II w nerce (obserwowane np. w nadciśnieniu) prowadzi do przebudowy tkanek tego narządu działając hipertroficznie i hiperplastycznie na komórki naczyń i śródmiąższu nerek, co ma związek z mitogennym działaniem peptydu. Ang II stymuluje komórki śródmiąższowe nerek do zwiększonej syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej a działanie to jest wzmacniane przez cytokiny (IL-1 β i TNF- α) wydzielane pod wpływem pobudzenia receptorów AT₁. Zmiany strukturalne w nerkach prowadzą do niedokrwienia i niedotlenienia narządu. Patogenne działanie Ang II w nerkach prowadzi do hipoksji

i niedokrwienia nerek i jest też często przyczyną nadciśnienia (*circulus vitiosus*). Z badań *in vitro* wynika, że zahamowanie aktywności RAAS zwiększa tolerancję na niedokrwienie nerek i hamuje proces ich włóknienia. Objawia się to zmniejszeniem ilości kolagenu i fibryny w nerkach, zwiększeniem przepływu krwi w mikrokrążeniu nerkowym oraz mniejszą infiltracją monocytów i leukocytów.

Początkowo uważano, że wpływ Ang II na nerki ogranicza się jedynie jej do pośredniego działania poprzez stymulację wydzielania aldosteronu. Pogląd ten zmieniono po odkryciu i poznaniu roli receptorów AT₁ i AT₂ w nerkach [Matsubara, 1998; Horiuchi i wsp., 1999; De Gasparo i wsp., 2000]. W kłębuszkach nerkowych receptory AT₁ zlokalizowane są na błonie podocytów i komórek mezangialnych. W podocytach stwierdzono występowanie mRNA dla wszystkich elementów RAAS: reniny, angiotensynogenu, ACE i receptorów AT₁₋₂ dla Ang II. W badaniach Liebau i wsp. (2006) stwierdzono, że pod wpływem Ang II dochodzi w podocytach do indukcji apoptozy, co może znamienne upośledzać funkcjonowanie kłębuszków. W samym nefronie największą koncentrację receptorów AT₁ stwierdzono w błonie podstawno-bocznej (bazolateralnej) i szczytowej (luminalnej) kanalika bliższego i dalszego oraz cewki zbiorczej.

Pobudzenie AT₁ przez Ang II prowadzi do zwiększenia aktywności w błonie podstawno-bocznej ATP-azy 3Na⁺, 2K⁺ czyli pompy sodowo-potasowej odpowiedzialnej za aktywny transport sodu (dochodzi także do wzrostu biernego współtransportu Na⁺, CO₂³⁻). Działanie tej pompy prowadzi do uwolnienia 3 jonów sodu z komórki do przestrzeni śródmiąższowej i do jednoczesnego wprowadzenia do komórki 2 jonów potasu. Wraz z sodem opuszczają komórkę cząsteczki wody, a cały płyn jest następnie wchłaniany do sąsiadujących naczyń. Równoczesna stymulacja receptorów AT₁ w błonie luminalnej kanalików zwiększa aktywność biernego transportu sodu przez wymiennik Na⁺/H⁺. Taka regulacja wchłaniania sodu w nerkach przez Ang II jest wspomagana przez aldosteron, którego synteza i wydzielanie zwiększa się pod wpływem Ang II.

Naczyniokurczące działanie Ang II dodatkowo wspomaga wchłanianie sodu i wody do naczyń krążenia nerkowego. Receptory znajdują się w ścianach wszystkich naczyń nerkowych oraz w komórkach mezangialnych, a ich największą gęstość stwierdza się w ścianie tętniczek odprowadzających kłębuszków nerkowych. Naczynia doprowadzające także charakteryzują się dużą wrażliwością na naczyniokurczące działanie Ang II a na skutek ich zwężenia dochodzi do obniżenia ciśnienia hydrostatycznego w położonych poniżej naczyniach włosowatych oplatających kanaliki nerkowe. Sprzyja to łatwemu przemieszczaniu płynu z przestrzeni śródmiąższowej do łożyska naczyniowego, prowadząc przy tym do wzmożonej resorpcji płynu kanalikowego.

Jednoczesne oddziaływanie Ang II na resorpcję płynu w kanalikach i na naczynia nerkowe przesuwają punkt równowagi kłębuszkowo-kanalikowej tak, że zwiększa się stosunek płynu

resorbowanego w kanalikach do płynu przesączanego w kłębuszkach nerkowych [Ozono i wsp., 1997]. W stabilnych fizjologicznie warunkach tlenek azotu przeciwdziała zarówno wchłanianiu sodu w kanalikach nerkowych jak i nadmiernemu zwężeniu tętniczek odprowadzających i naczyń prostych, dlatego też pełne działanie naczyniokurczące i antynatriuretyczne Ang II widoczne jest dopiero po zahamowaniu aktywności NO. Inne związki pochodzenia nerkowego osłabiające efekt stymulacji receptorów AT₁ to bradykinina (za pośrednictwem receptorów B2) i angiotensyna (1-7); obie substancje zwiększają aktywność syntazy NO [Siragy i Carey, 1997].

Receptory dla Ang II, która ma istotny udział w transporcie kanalikowym i przepływie krwi przez nerkę, zlokalizowano w całej nerce: w kanalikach, naczyniach krwionośnych i w jej śródmiąższu. Nadmierna aktywacja receptorów AT₁ w nerkach prowadzi do zatrzymania płynu w organizmie, do zwiększenia wypełnienia krwią łożyska naczyniowego oraz do rozwoju nadciśnienia tętniczego przechodzącego następnie w fazę nadciśnienia utrwalonego. Co więcej, już dziś wiadomo, że w regulacji procesów wewnątrznerkowych bierze udział zarówno Ang II dopływająca do nerek z krwi, ale także ta wytwarzana przez lokalny tkankowy RAAS.

Reasumując, wpływ Ang II na losy sodu w nerce jest wielotorowy. Po pierwsze Ang II pobudza wydzielanie aldosteronu, pobudza nerkową pompę sodową nasilając resorpcję sodu w nerce i wywołując jego retencję [Wald i wsp., 1991] a także wpływa na skurcz naczyń postych (*vasa recta*) [Brenner i wsp., 1982]. W warunkach fizjologicznych Ang II ma działanie antydiuretyczne, bowiem zwiększa zwrotne wchłanianie sodu w cewkach proksymalnych [Lang i wsp., 1992]. Ang II wywołuje także skurcz komórek mezangium kłębuszka i bierze udział w regulacji ciśnienia w naczyniach okołokanalikowych [Brenner i wsp., 1982]. Poprzez wyżej wymienione procesy synteza Ang II w nerce odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji nerek.

2. Tkankowe układy renina-angiotensyna-aldosteron

Po zahamowaniu enzymu konwertującego (ACE) dochodzi do szybkiego obniżenia ciśnienia, co można łatwo powiązać z obniżeniem poziomu krążącej ogólnoustrojowo Ang II. Jednak w trakcie chronicznego hamowania ACE może dojść do nadmiernego wzrostu aktywności reninowej osocza i poziomu Ang I i ponownego pojawienia się krążącego peptydu (Ang II) [Mooser i wsp., 1990]. W tkankach układu sercowo-naczyniowego występują wszystkie składowe RAAS, w tym renina, angiotensynogen czy ACE [Dostal i Baker, 1993], a w wielu miejscach tkankowe układy stanowią główne źródło Ang I i II [Campbell, 1987]. Tkankową aktywność ACE stwierdzono w płucach, mięśniu sercowym, mózgu czy nerkach [MacFadyen i wsp. 1991]. Badania farmakokinetyczne wskazują, że po podaniu inhibitora ACE szczurom SHR (genetycznie

uwarunkowane nadciśnienie), spadek ciśnienia krwi lepiej koreluje z zahamowaniem tkankowego niż osoczowego RAAS [Cohen i Kurz, 1982; Unger i wsp., 1984; Weishaar i wsp., 1991].

Inhibitory ACE stosowane są w terapii nadciśnienia w celu obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, jednak pomimo utrzymywania się efektów hipotensyjnych u pacjentów obserwuje się po pewnym czasie wzrost poziomu krążącej Ang II, co jest tłumaczone aktywnością tkankowych układów RAAS [MacFadyen i wsp., 1991]. Ponadto, nie cała pula Ang II powstaje w wyniku działania ACE, bez względu na to czy hormon jest produktem osoczowego RAAS czy układów tkankowych.

Niezależnie od osoczowego RAAS, w wielu narządach (np. w mięśniu sercowym, ścianie naczyń krwionośnych, nerkach czy nadnerczach) istnieją lokalne tkankowe RAAS. W niewydolnym ludzkim sercu większość Ang II prawdopodobnie powstaje na szlaku wrażliwym na błonową proteazę serynową, a nie na inhibitor ACE [Urata i wsp., 1993]. Do podobnych wniosków doprowadziły badania Noda i wsp. (1993) o zaangażowaniu w syntezę Ang II proteaz: serynowej i cysteinowej. W tętnicach nerkowych [Okamura i wsp., 1990] i płucach [Mento i Wilkens, 1987] także występują alternatywne do ACE szlaki biosyntezy Ang II. Choć znaczenie patofizjologiczne niezależnych od ACE szlaków syntezy Ang II nadal jest przedmiotem znacznych kontrowersji [Johnston, 1994], najnowsze badania wskazują, że w stanach patologicznych (nadciśnienie i choroby towarzyszące) znaczącą rolę w przekształcaniu Ang I w Ang II mogą odgrywać inne niż ACE enzymy. Takim enzymem jest np. chymaza [Reilly i wsp., 1982; Okunishi i wsp., 1984; Okunishi i wsp., 1987; Okamura i wsp., 1990] oraz inne angiotensynazy działające lokalnie, jak neprilizyna, katepsyna czy też niedawno odkryta u gryzoni elastaza-2A (wydzielana w łożysku naczyniowym krezki), która tak jak chymaza jest proteazą serynową wrażliwą na chymostatynę [Paula i wsp., 1998; McDonald i wsp., 2001; Richard i wsp., 2001; Santos i wsp., 2002a,b; Santos i wsp., 2003]. Powszechnie uważa się, że ich udział w syntezie angiotensyn jest znacznie mniejszy niż ACE, jednak może się istotnie zwiększać w stanach patologicznych (np. w hipercholesterolemii towarzyszącej nadciśnieniu zwiększa się aktywność chymazy ludzkiej w ścianach naczyń a w sercu kluczowa staje się cHCP (ang. *human heart chymase*) [Urata i wsp., 1993]. Jak wykazały badania Mc Phersona i wsp. (2004) w ludzkim sercu czy w naczyniach krwionośnych tylko 20-30% syntetyzowanej angiotensyny II zależy od aktywności enzymu konwertującego.

Chymaza powszechnie występuje w komórkach tucznych, komórkach śródbłonna i śródmiąższu wielu narządów, w tym serca, naczyń krwionośnych i nerek. O ile za poziom krążącej Ang II odpowiada przede wszystkim ACE, o tyle w tkankach współdziałają oba enzymy [Huang i wsp., 2003; Park i wsp., 2010; Lorenz, 2010]. Dlatego w regulacji funkcji poszczególnych

narządów i komórek ważną rolę odgrywają zarówno Ang II docierająca z krwi, jak również peptyd wytworzony przez lokalne układy RAAS.

Chymaza oraz stosunkowo niedawno opisana elastaza-2 wydają się być u gryzoni bardzo ważnym elementem odpowiedzialnym za syntezę Ang II w stanach patologicznych np. w niedokrwieniu i stresie oksydacyjnym [Becari i wsp., 2011], tak więc badania na różnych zwierzęcych modelach nadciśnienia wydają się dobrym podejściem do określenia roli jaką ludzka chymaza może pełnić w patogenezie nadciśnienia i patologicznej przebudowy tkanek.

2.1.Chymaza i alternatywne szlaki syntezy angiotensyny II

Jak już wspomniano, chymaza jest obecna nie tylko w komórkach tucznych, ale także w komórkach śródbłonna i mięśni gładkich oraz ma istotną rolę w tworzeniu Ang II w procesie wtórnego uszkodzenia narządów, co razem może wskazywać na istotne znaczenie enzymu w tych procesach.

Krótkoterminowe blokowanie ACE w terapii nadciśnienia skutkuje obniżeniem poziomu Ang II i aldosteronu, ale jednocześnie prowadzi do wzrostu aktywności reninowej osocza i poziomu Ang I. Podwyższony poziom Ang I często staje się przyczyną generacji Ang II w sposób niezależny od ACE [Givertz, 2001].

Alternatywne drogi syntezy Ang II mogą być wynikiem działania różnych enzymów, w tym katepsyny G, kalikreiny czy toniny. Enzymy te działając bezpośrednio na angiotensynogen katalizują reakcję syntezy Ang I i/lub Ang II [Belova, 2000]. Jednym z głównych enzymów działających niezależnie od ACE w tkankach jest chymaza. Podkreśla się, że zależny od chymazy szlak syntezy Ang II ma szczególne znaczenie w układzie krążenia [Urata i wsp., 1993; Miyazaki i Takai, 2000, 2001]. Aktywność chymazy i innych proteaz serynowych w katalizowaniu reakcji konwersji Ang I w Ang II w ludzkim sercu może być nawet 20-krotnie wyższa niż enzymu konwertującego [Urata i wsp., 1990a]. Chymaza jest blokowana przez inhibitory proteaz serynowych i chymostatynę, ale nie przez inhibitory ACE [Urata i wsp., 1990a,b].

W badaniach Morikawy i wsp. (2005) po raz pierwszy opisano istotny wzrost aktywności tego enzymu przekształcającego Ang I w Ang II, zarówno w śródmiąszku nerki, w żyłę i tętnicy nerkowej u pacjenta, któremu usunięto nerkę z powodu nadciśnienia zależnego od pierwotnego zwężenia tętnicy nerkowej. Choć inhibitory ACE obniżyły ciśnienie krwi i poziom krążącej Ang II, to jednocześnie spowodowały wzrost stężenia reniny i aldosteronu. Autorzy sugerują, że to właśnie chymaza miała udział w tworzeniu Ang II w nadnerczach, co stymulowało sekrecję aldosteronu. Obserwowano także zależny od hamowania ACE wzrost stężenia Ang I, peptydu będącego substratem dla chymazy [Morikawa i wsp., 2005]. Ostatecznie zwiększała się ilość powstającej Ang

II w różnych tkankach, co prowadziło do ich dysfunkcji i uszkodzenia. Wzrost aktywności chymazy w nerce obserwowano także u pacjentów cukrzycowych [Huang i wsp., 2003; Koka i wsp., 2006]. Powyższe doniesienia wspierają powszechną w badaniach opinię o istotnym udziale zależnego od chymazy (w tkankach) szlaku syntezy Ang II w postępującym uszkodzeniu nerek.

Chymaza będąca proteazą serynową, magazynowana jest w ziarnistościach komórek tucznych [Urata i wsp., 1993; Miyazaki i Takai, 2001]. Przechowywana jest w komórce w formie nieaktywnej, ale pod wpływem zmian pH z 5,5 do 7-9 (pod wpływem uszkodzenia tkanki lub toczącego się stanu zapalnego) uwalniana jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie po natychmiastowym przekształceniu w aktywny enzym katalizuje konwersję Ang I do Ang II [McEuen i wsp., 1995; Takai i wsp., 1999]. Obecność chymazy stwierdzono u psa [Gondo i wsp., 1989], pawiana [Hoit i wsp., 1995], chomika [Shiota i wsp., 1997] oraz człowieka [Urata i wsp., 1990a], natomiast sporną kwestią była jej obecność u szczura i myszy [Urata i wsp., 1993; Miyazaki i Takai, 2001]. Stwierdzono, że w sercu człowieka chymaza jest syntetyzowana i gromadzona w komórkach endotelialnych i mezenchymatycznych i jest wydzielana bezpośrednio do śródmiąższu tkanki, gdzie odpowiada za syntezę 80% Ang II w sercu [Petrie i wsp., 2001]. Obecność szczurzej chymazy stwierdzono w ścianie naczyń krwionośnych [Leife i wsp., 1997], w sercu i innych tkankach [Müller i wsp., 1998]. Natomiast u myszy z wywołanym nadciśnieniem podwyższony poziom chymazy stwierdzono w ścianie naczyń krwionośnych [Ju i wsp., 2001]. Wysoki poziom ekspresji szczurzej chymazy stwierdzono u szczurów SHR w komórkach mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych, gdzie enzym konstytutywnie przekształca Ang I w II [Guo i wsp., 2001]. Po przejściu do krwioobiegu chymaza jest od razu unieczynniana pod wpływem inhibitorów proteaz serynowych, obecnych w dużym stężeniu we krwi [Urata i wsp., 1993; Miyazaki i Takai, 2000, 2001], dlatego enzym jest aktywny jedynie w tkankach. W pracy Akasu i wsp. (1998) stwierdzono nawet, że w komórkach izolowanych z aorty szczurów normotensyjnych (badania *in vitro*) szlak syntezy Ang II zależny od chymazy jest dominujący w stosunku do szlaku zależnego od ACE.

Niewiele jest doniesień o roli chymazy w nerce. U myszy pozbawionych genu dla ACE nie stwierdzono zmian poziomu Ang II w nerkach. Przeciwnie, nastąpił 14-krotny wzrost aktywności chymazy w nerce, co sugeruje istotny udział enzymu innego niż ACE w powstawaniu naczyniokurczącej Ang II w tym narządzie [Wei i wsp., 2002]. W badaniach Murakami i wsp. (1997) stwierdzono, że synteza Ang II w korze nerki u psa w szlaku zależnym od chymazy sięga 20% całej ilości syntetyzowanego w tkance peptydu. Badania te wskazują na istotną parakrynną rolę naczyniokurczącej Ang II, która powstaje w nerce pod wpływem chymazy. Również badania Tokuyamy i wsp. (2002) potwierdzają, że pod wpływem chymostatyny (selektywnego inhibitora chymazy) następuje istotne obniżenie poziomu Ang II w niedokrwionej szczurzej nerce w modelu

Goldblatta. U tych nadciśnieniowych szczurów obserwowano także podwyższony poziom ekspresji mRNA dla chymazy oraz podwyższony poziom samego enzymu w tkance [Tokuyama i wsp., 2002].

Poza przekształceniem Ang I w II chymaza może pełnić w tkankach wiele innych funkcji. Przekształca tzw. dużą endotelinę (1-38) do endoteliny 1 (1-21), unieczynnia bradykininę oraz katalizuje rozkład substancji P [Harrison-Bernard i wsp., 2013]. Chymaza ma też wpływ na proteolizę cząsteczek apolipoprotein zawartych w płaszczu cząsteczek lipoprotein wysokiej gęstości (HDL, ang. *high-density lipoprotein*). Proteolityczna modyfikacja zależna od chymazy upośledza zwrotny transport cholesterolu ze ściany naczynia przyczyniając się do rozwoju zmian miażdżycowych [Kun i Szpunar, 2001]. W stanach patologicznych chymaza może także aktywować prozelatynazę B (MMP-9) i TGF- β 1 (Transformujący czynnik wzrostu- β 1), przez co odgrywa ważną rolę w przebudowie tkanek w obszarze układu sercowo-naczyniowego [Harrison-Bernard i wsp., 2013]. Enzym może też bezpośrednio wpływać na degradację białek macierzy (np. fibronektyny czy kolagenu typu IV) [Urata, 2000]. Poprzez pobudzanie tworzenia kolagenu i pośrednio poprzez syntezę Ang II chymaza ma udział w proliferacji komórek mięśni gładkich [Guo i wsp., 2001]. Chymaza ma tutaj 20-krotnie wyższą aktywność katalityczną w stosunku do Ang I niż inne enzymy tworzące Ang II, ale to ACE jest głównym enzymem odpowiedzialnym za tworzenie krążącej Ang II [Wei i wsp., 2002]. Rola chymazy, w porównaniu do ACE, w tworzeniu Ang II na terenie tkanek jest wciąż badana. Badania potwierdziły jej obecność w wielu ludzkich narządach/ tkankach: płucach, nerkach, ścianach naczyń krwionośnych, śródmiaższu serca oraz w kardiomiocytach i komórkach śródbłonkowych, w których jest ona zarówno syntetyzowana jak i magazynowana [Hollenberg i wsp., 1998]. Choć w warunkach fizjologicznych wykazano niezbyt wysoką aktywność chymazy, enzymu konwertującego i mRNA dla receptorów AT₁ w komórkach mezangialnych oraz nabłonkowych kłębuszków i kanalików nerkowych, to wzrost aktywności wymienionych elementów RAAS, obserwowany np. w nefropatii immunologicznej, korelował ze stopniem uszkodzenia w obrębie kanalików i śródmiaższu nerki [Miyake-Ogawa i wsp., 2005]. Z drugiej strony, komórki tuczne uwalniające duże ilości chymazy prawdopodobnie uczestniczą w zainicjowaniu i rozwoju zwłóknienia kanalikowo-śródmiaższowego obserwowanego w wielu chorobach nerek [Li i wsp., 2007].

W badaniach na psach z użyciem modelu 2k1c (two kidney, one clip), naśladującym nadciśnienie spowodowane zwężeniem tętnicy nerkowej, stwierdzono, że za wzrost produkcji Ang II w niedokrwionej nerce odpowiada chymaza. Po zastosowaniu specyficznego inhibitora - chymostatyny uzyskano około 4-krotne obniżenie stężenia Ang II w nerce oraz istotny wzrost przepływu osocza [Tokuyama i wsp., 2002]. Z kolei u chomików stwierdzono istotny wzrost aktywności chymazy w chorobach serca, natomiast jej zablokowanie istotnie obniżało śmiertelność

po ostrym zawale serca oraz zmniejszało zwłóknienie miocytów prowadzące do rozwoju kardiomiopatii. Z badań wynika, że inhibitory chymazy mogą efektywnie zapobiegać różnorodnym chorobom sercowo-naczyniowym, zwłaszcza w zakresie lokalnego uszkodzenia tkanki [Miyazaki i wsp., 2006].

Możliwe, że podstawowa, niezbyt wysoka aktywność chymazy staje się znacząca i ma bardzo duży udział w powstawaniu Ang II w warunkach patologicznych, przyczyniając się do uszkodzania tkanek, nie tylko w nadciśnieniu czy cukrzycy, ale również w chorobie wieńcowej i miażdżycy naczyń [Miyaka-Ogawa i wsp., 2005; Morikawa i wsp., 2005; McPherson i wsp., 2004].

Choć przekształcanie Ang I w II odbywa się głównie w obrębie śródbłónka naczyń płuc, jak wspomniano istnieją także wewnątrznerkowe ścieżki tej konwersji. Zawartość mRNA dla angiotensynogenu w nerce (w korze i rdzeniu) wzrasta pod wpływem diety niskosodowej [Ingelfinger i wsp., 1986]. Obserwacja ta potwierdza doniesienia o istnieniu miejscowego układu RAAS, a jego aktywność wzrasta w odpowiedzi na dietę niskosodową. W nerce ACE występuje w śródbłónku naczyniowym aparatu przykłębuszkowego i tętniczek odprowadzających, czyli w miejscach istotnego działania Ang II [Edwards, 1983]. Jak wskazują badania filogenetyczne, wewnątrznerkowy układ reninowy istniał miliony lat zanim pojawiły się płazy z tkanką płucną [Hollenberg i Williams, 1990]. Jak twierdzą badacze, układ ten jest „początkowym, pierwotnym systemem regulującym wolemie, który przez strategiczną wewnątrznerkową lokalizację reguluje perfuzję nerki”. Bardzo ciekawe są opisy przypadków osób charakteryzujących się nadmierną wewnątrznerkową produkcją Ang II. Osoby te nie są w stanie odpowiedzieć wzrostem nerkowego przepływu krwi na duże zwiększenie podaży jonów sodu. Taki brak reaktywności naczyń na Ang II nazywa się niemodulacją, a dotyczy głównie sodowrażliwych chorych z nadciśnieniem. Tylko zahamowanie ACE przewraca prawidłową pracę nerek w odpowiedzi na zwiększoną podaż sodu [Hollenberg i Williams, 1990].

3. Zwierzęce modele nadciśnienia

Nadciśnienie to jedna z najczęściej występujących chorób na świecie. Jest też ważnym czynnikiem ryzyka chorób serca, niewydolności nerek i udaru mózgu. Nadciśnienie ma wieloczynnikowy, poligeniczny charakter i jest spowodowane wzajemnym oddziaływaniem czynników genetycznych i środowiskowych, dlatego jego badanie wymaga zastosowania różnorodnych zwierzęcych modeli nadciśnienia. Modele zwierzęce zapewniają nieocenioną pomoc w wyjaśnianiu mechanizmów powstawania nadciśnienia tętniczego i skutków wywołanych przez postępującą chorobę. Różne modele nadciśnienia wykorzystują hodowlę opartą o selekcję zwierząt wykazujących żądany fenotyp. Natomiast w stworzeniu modeli genetycznych wykorzystuje się transgeniczne techniki, pozwalające na wyselekcjonowanie genów, podejrzewanych o bycie

odpowiedzialnymi za nadciśnienie. Kombinacja genotypowej i fenotypowej strategii w uzyskiwaniu zwierzęcych modeli nadciśnienia jest nieocenionym źródłem wiedzy w badaniach eksperymentalnych oraz pozwala na ich wykorzystanie w praktyce klinicznej.

3.1. Nadciśnienie sodozależne

W regulacji ciśnienia tętniczego krwi podstawowe znaczenie odgrywa zdolność nerek do wydalania lub zatrzymywania sodu. W warunkach fizjologicznych stężenie sodu (135-150 mM) i potasu (3,5-5,0 mM) w płynach pozakomórkowych utrzymywane jest w wąskich granicach. Badania wskazują, że ograniczenie spożycia sodu wiąże się z obniżeniem ciśnienia tętniczego a ten efekt jest największy u osób z wysokim ciśnieniem, otyłych i w starszym wieku. Jednak odpowiedź organizmu na ograniczenie spożycia sodu jest zmienna osobniczo i może nie prowadzić do istotnego obniżenia ciśnienia u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym. Z kolei wysokie spożycie potasu wpływa na obniżenie ciśnienia tętniczego, co może być spowodowane zdolnością potasu do zwiększenia wydalania sodu przez nerki oraz bezpośrednim wpływem naczyniorozszerzającym [Geleijnse i wsp., 2003].

Rola jonów sodu w patogenezie nadciśnienia tętniczego (sodozależność ciśnienia) związana jest z zaburzeniami mechanizmów odpowiedzialnych za transport jonu przez błony komórkowe. Pacjenci reagujący wzrostem ciśnienia na zwiększoną podaż sodu w diecie (sodowrażliwi) charakteryzują się zwiększonym oporem naczyniowym, zwiększoną reaktywnością naczyń na substancje presyjne, zmniejszonym stosunkiem receptorów adrenergicznych α_2 i β_1 oraz niższą aktywnością reninową osocza i opornością tkanek obwodowych na insulinę [Melander i wsp., 2000]. Zjawisko sodozależności częściej obserwuje się u rasy żółtej i czarnej niż u rasy białej. Z sodozależnością ściśle wiąże się mechanizm natriurezy ciśnieniowej, czyli sprawność nerkowych mechanizmów wydalania sodu. Przewlekłe podwyższone ciśnienie tętnicze krwi związane ze zwiększonym spożyciem sodu świadczyć może o zaburzeniu mechanizmów natriurezy. W warunkach prawidłowej homeostazy kationów sodu, sporadycznemu zwiększeniu zawartości sodu w organizmie towarzyszą procesy adaptacyjne, które prowadzą do zwiększenia wydalania sodu (natriurezy) i przywrócenia bilansu sodu do normy bez długotrwałych zmian wartości ciśnienia tętniczego krwi.

Nagły wzrost stężenia sodu w organizmie wyzwała kaskadę reakcji adaptacyjnych organizmu, związanych ze zwiększeniem nerkowego przepływu krwi, zwiększeniem stężenia przedsionkowego peptydu natriuretycznego i tlenu azotu, a także ze zmniejszeniem stężenia amin katecholowych, aktywności reninowej osocza, stężenia Ang II i aldosteronu. W końcowym stadium tej kaskady reakcji kompensujących dochodzi do zwiększenia filtracji kłębuszkowej (GFR, ang.

glomerular filtration rate) oraz hamowania kanalikowej reabsorpcji sodu i wody, co chroni organizm przed zaburzeniem bilansu sodu. W myśl teorii Guytona kaskada ta wyzwała obronny i kompensacyjny nerkowy mechanizm diurezy (wydalania wody) i natriurezy (wydalania sodu) z nadciśnienia [Guyton i wsp., 1972]. Długoterminowy stały wzrost spożywanego sodu w diecie może skutkować zwiększeniem jego stężenia w płynach pozakomórkowych, również w osoczu, co z kolei prowadzi do zwiększenia objętości krwi w łożysku naczyniowym (hiperwolemia), zwężenia światła naczyń krwionośnych (wazokonstrykcja) i w konsekwencji do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi. W przypadku zakłóceń mechanizmu natriurezy ciśnieniowej (ang. *pressure natriuresis*) dochodzi do podwyższenia ciśnienia tętniczego krwi z powodu wyżej wspomnianych: hiperwolemii i/lub zwężenia naczyń – liniowa zależność między wydalaniem sodu równym jego dostarczeniu a średnim ciśnieniem krwi tętniczej przesuwają się ku wyższym wartościom ciśnienia. W ten sposób organizm próbuje przywrócić równowagę wodno-elektrolitową. Jednak w konsekwencji długotrwałego zwiększenia podaży sodu w diecie dochodzi także do nasilenia wysoce energochłonnych procesów transportu kanalikowego. Obniżona w ten sposób dostępność tlenu w tkance w związku z niskim ciśnieniem parcjalnym tlenu (PO_2) może prowadzić do wielu zaburzeń metabolicznych, a w konsekwencji doprowadzić do uszkodzenia struktury i upośledzenia funkcji kanalików.

Chroniczne spożycie sodu prowadzące do wzrostu stężenie jonów sodu w płynach ustrojowych może być przyczyną zmian czynnościowych i strukturalnych w naczyniach krwionośnych. Najnowsze badania wskazują [Moriguchi i wsp., 2011], że w śródbłonku naczyń rozwija się chroniczny stan zapalny o niskim natężeniu. Podwyższenie stężenia jonów sodu w osoczu (P_{Na}) o 15 mM wyzwała kaskadę zmian w tętnicach i przyczynia się do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi w krótkim czasie [Friedman i wsp., 1990; Kamari i wsp., 2010]. Podwyższone stężenie sodu w osoczu koreluje z wzrostem stężenia tego jonu w komórkach, także w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych, co wyzwała wzrost stężenia wolnych jonów wapnia i zwiększenie napięcia mięśniówki [Bell, 2000]. Podwyższony poziom sodu w osoczu ma wpływ na zaburzenie reaktywności (wzmoczenie lub osłabienie) naczyń zarówno na czynniki naczyniokurczące jak i naczyniorozszerzające. Podwyższone ciśnienie krwi, będące konsekwencją wzrostu stężenia jonów sodu w osoczu prowadzi do uszkodzenia naczyń a w dalszej perspektywie do ich zwłóknienia i zeszywnienia. Różne procesy prowadzące do usunięcia z ustroju nadmiaru sodu pozostają w ścisłym związku ze sobą (interakcja). Mogą też wyzwać kolejne, inne procesy, jak wytworzenie lokalnych stanów niedoboru tlenu w tkankach [Escobales i Crespo, 2005], przebudowę struktur, związaną z przerostem i/ lub rozplemem (hiperplazją) komórek, czy też kumulacją włókien macierzy zewnątrzkomórkowej [Flamant i wsp., 2007]. Może też dojść do

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

W zależności od charakteru czynnika zaburzającego sprawność natriurezy ciśnieniowej, nadciśnienie może być sodooporne (zwiększona podaż sodu nie zwiększa już dalej ciśnienia) lub sodowrażliwe (średnie ciśnienie tętnicze zmienia się wraz z ilością spożywanego sodu) [Kurokawa, 1996]. Za nadciśnienie sodooporne odpowiadają takie czynniki jak: stałe zwiększenie oporu przedkłębuszkowego, wysokie stężenie czynników wazopresyjnych w osoczu, czynniki wewnątrznerkowe upośledzające kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne oraz czynniki nasilające reabsorpcję sodu w odcinkach kanalików nerkowych przed plamką gęstą. Natomiast przyczyną nadciśnienia sodowrażliwego mogą być: nasiloną reabsorbcją sodu i obwodowe zwężenie naczyń oraz zmniejszona podatność naczyń na rozszerzanie.

Jednym z głównych mechanizmów, które prowadzą do rozwoju nadciśnienia tętniczego jest nieprawidłowa aktywność układu RAAS, szczególnie w tkankach, spowodowana nadmiarem soli w diecie. Najistotniejsza wydaje się tu rola jaką odgrywa Ang II i jej efekty hipertensyjne, za które odpowiada aktywacja AT₁R. Ang II wykazuje wiele wewnątrznerkowych działań, wywołuje m.in. skurcz tętniczek kłębuszka, zwiększa także czułość kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego, nasila reabsorpcję sodu w kanaliku proksymalnym i dystalnym. Ang II może także sprzyjać rozwojowi sodozależnego nadciśnienia poprzez wiele działań pozanerkowych, jak nasilenie uwalniania aldosteronu, produkcję i uwalnianie katecholamin, uwalnianie ADH, przerost kardiomiocytów, obkurczanie naczyń obwodowych oraz przerost ich mięśniówki [Navar, 2005]. W nadciśnieniu dochodzi do nieproporcjonalnego wzrostu stężenia Ang II w nerce, za co odpowiada wiele złożonych mechanizmów. Ang II jest wewnątrznerkowo syntetyzowana, ale również dochodzi do jej wychwytywania z krwi krążącej przez wewnątrznerkowe receptory AT₁R [Liu, 2009].

Reakcja naczyń na naczyniokurczącą Ang II zależy w znacznym stopniu od spożycia sodu w diecie: przy wzroście P_{Na} obserwuje się spadek ekspresji reniny, natomiast rośnie ekspresja ACE a także receptorów AT₁R [Samuel i wsp., 2012].

Wiele różnorodnych procesów zaangażowanych jest w rozwój sodozależnego nadciśnienia tętniczego, a zmiany w naczyniach nie są jedynymi, choć są bezpośrednim skutkiem zwiększonego spożycia soli. Zachodzące pod wpływem podwyższonego stężenia jonów sodu w osoczu zmiany w strukturze naczyń krwionośnych wyraźnie zaburzają ich plastyczność. U zwierząt z doświadczalnym nadciśnieniem tętniczym stwierdzono zaburzenia transportu jonów lub ich zawartości w komórkach, które mogą być przyczyną zmian potencjału błonowego i zaburzeń stężenia wapnia w komórce determinujących napięcie mięśni gładkich. Sód wpływa bezpośrednio na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia i wywołuje skurcz mięśniówki naczyń, a reakcja ta

jest nasiloną przez zwiększenie stężenia Ang II oraz wzrost ekspresji AT₁R. Natomiast zwiększenie ekspresji ACE prowadzi do zmniejszenia dostępności czynników naczyniorozszerzających: NO i bradykininy. Natomiast działanie TGFβ, który wpływa na gromadzenie macierzy zewnątrzkomórkowej, prowadzi do zmniejszenia średnicy światła naczyń; dochodzi do pogrubienia ścian naczyń i do wzrostu oporu obwodowego. Już wg Tobiana i wsp. (1961) zwiększenie naczyniowego oporu obwodowego miało zależeć m.i. od nadmiernego gromadzenia się jonów wapnia, sodu i wody w ścianie naczyń, co prowadzi do jej obrzmienia [Tobian i Duke, 1969]. Znacznie późniejsze badania Tobiana i Hanlona (1990) wskazują, że wzrost zawartości wody i sodu w ścianie tętnicy nerkowej u chorych z nadciśnieniem tętniczym oraz w aorcie u szczurów z nadciśnieniem doświadczalnym może być skutkiem zachwiania stosunku sodu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego, co powoduje wzmożone napięcie ściany naczyń.

Upośledzenie czynności mechanizmów transportujących sód zwiększa jego wewnątrzkomórkowe stężenie, dochodzi do wymiany jonów sodu na jony wapniowe, co przyczynia się do skurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych z wtórnym wzrostem oporu obwodowego. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia sodu prowadzi do zwiększenia wrażliwości ścian naczyń krwionośnych na działanie amin katecholowych i Ang II, co prowadzi do dalszego wzrostu oporu obwodowego i ciśnienia tętniczego.

Powszechnie stosowaną metodą wytwarzania nadciśnienia u szczurów jest tzw. 5/6 redukcja masy nerek, jednak jej skutkiem jest wkrótce niewydolność wielonarządowa. W moich badaniach zastosowałam metodę opracowaną wcześniej w naszym Zakładzie, która prowadzi do wyraźnego nadciśnienia, porównywalnego z obserwowanym w modelu Golblatta (patrz niżej). Zwierzęta utrzymywane są na dwutygodniowej diecie wysokosodowej (4% NaCl), co samo w sobie nie wywołuje widocznego nadciśnienia. Dlatego szczurom usuwa się jedną nerkę; kombinacja wysokiej podaży sodu i nefrektomii powoduje rozwój nadciśnienia po dwóch tygodniach [Badzyska i Sadowski, 2004].

3.2. Model Goldblatta, czyli nadciśnienie naczyniowo-nerkowe

Nadciśnienie naczyniowo-nerkowe jest najczęstszą postacią wtórnego nadciśnienia tętniczego o potencjalnie usuwalnej przyczynie, a spowodowane jest nadmiernym wytwarzaniem reniny przez niedokrwioną nerkę z powodu zwężenia tętnicy nerkowej [Derckx i Schalekamp, 1994; Ram, 1997]. Etiologicznie u ludzi zwężenie tętnicy nerkowej jest często następstwem stanu patologicznego, jak rozwój miażdżycy (u osób po 50 roku życia) lub dysplazji włóknisto-mięśniowej (zwłaszcza u młodych kobiet). Inne, rzadziej występujące, przyczyny nadciśnienia naczyniowo-nerkowego to np. uszkodzenie tętnicy nerkowej, zakrzepice czy zatory (czynniki

wewnątrzpochodne) lub opadanie nerki czy guzy chromochłonne nadnercza (czynniki zewnątrzpochodne).

Bezpośredni związek między ciśnieniem krwi a zmianami w ukrwieniu nerki, zwłaszcza jej niedokrwieniem, został udowodniony przez Goldblatta i wsp., którzy w 1934 roku po raz pierwszy opracowali model doświadczalny nadciśnienia naczyniowo-nerkowego. W swoim klasycznym doświadczeniu Goldblatt wykazał, że niedokrwienie nerki u psa poprzez założenie zacisku na tętnicy nerkowej przy równoczesnym usunięciu drugiej nerki prowadzi do powstania nadciśnienia tętniczego. Co ciekawe, u psa zaciśnięcie jednej tętnicy nerkowej przy nienaruszonej drugiej nerce pozostawało bez wpływu na ciśnienie tętnicze krwi lub powodowało jedynie przemijający jego wzrost. Stopień rozwoju nadciśnienia uzależniony był od stopnia zwężenia jednej lub obu tętnic nerkowych. W przypadku bardzo silnego zwężenia obu tętnic lub jednej z nich z równoczesnym usunięciem drugiej nerki dochodziło do powstania nadciśnienia złośliwego z objawami niewydolności nerek [Goldblatt i Lynch, 1934].

W 1939 roku Wilson i Byron wywołali ciężkie i długotrwałe nadciśnienie u szczura za pomocą zwężenia jednej tętnicy nerkowej, przy czym w odróżnieniu od psa czy królika nadciśnienie to udało się wywołać przy nienaruszonej drugiej tętnicy nerkowej. Stwierdzono rozwój zmian naczyniowych w nerce z prawidłową tętnicą nerkową, natomiast w początkowym okresie takich zmian nie stwierdzono w nerce niedokrwionej. Wynikało z tego, że zwężenie światła tętnicy nerkowej chroni w pewnym stopniu układ naczyniowy niedokrwionej nerki przed powikłaniami rozwijającego się nadciśnienia [Cerqua i Samaan, 1939]. U szczura, podobnie jak u człowieka już przy zwężeniu tętnicy jednej nerki i bez zmian w drugiej nerce dochodzi do rozwoju nadciśnienia naczyniowo-nerkowego. W trakcie kolejnych badań stwierdzono, że przebieg i mechanizm nadciśnienia różnią się istotnie zależnie od typu zastosowanej ingerencji. W modelu 2k1c z dwiema nerkami (ang. two-kidney one-clip) dochodzi do zwiększenia aktywności reninowej osocza i poziomu aldosteronu (szczególnie w pierwszej fazie choroby), natomiast w modelu 1k1c bez jednej nerki (one-kidney one-clip) aktywność reniny w osoczu jest prawidłowa [Wales i Tange, 1971], a o wzroście ciśnienia decyduje zwiększona objętość wewnątrznaczyniowa [Brunner i wsp., 1971; Koletsky i wsp., 1971]. Długotrwałe zwężenie tętnicy nerkowej w warunkach doświadczalnych prowadzi do zaniku nerki niedokrwionej oraz do przerostu drugiej nerki. Badania Wilsona i Byrona (1941) wykazały, że usunięcie u szczura nerki ze zwężoną tętnicą nerkową, w momencie gdy zmiany patologiczne w drugiej nerce nie są jeszcze zaawansowane, powoduje obniżenie a nawet normalizację ciśnienia krwi. Co więcej, samo usunięcie zacisku z tętnicy może znormalizować ciśnienie krwi, o ile zmiany w drugiej nerce nie są zaawansowane. Jednak gdy zmiany w drugiej nerce są już nasilone, to usunięcie niedokrwionej nerki nie powoduje już obniżenia ciśnienia krwi tętniczej, a nawet może spowodować jego podwyższenie.

W patogenezie nadciśnienia naczyniowo-nerkowego zasadniczą rolę odgrywa układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Mechanizm nadciśnienia naczyniowo-nerkowego zależy od aktywacji RAAS przez niedokrwioną nerkę, co miałyby zapobiec spadkowi filtracji w narządzie. Upośledzenie perfuzji nerki wiąże się także z rozrostem aparatu przykłębuszkowego [Hackam i wsp., 2007] i zwiększonym powstawaniem naczyniokurczącej angiotensyny II. Jak opisano wyżej (patrz rozdział 1.4 i 1.5) Ang II aktywuje cały szereg układów regulacyjnych i prowadzi do wielu zmian odpowiadających za nadciśnienie lub mu towarzyszących. W dalszej perspektywie rozwijającego się stanu patologicznego nieskompensowany wzrost wolemii może prowadzić do zaostrzeń zastoinowej niewydolności serca, włącznie z nawracającymi obrzękami płuc.

Jak wynika z badań w doświadczalnym nadciśnieniu naczyniowo-nerkowym, stwierdza się nie tylko zwiększenie aktywności reninowej krążącego osocza, ale też zwiększoną aktywność RAAS w ścianie naczyń krwionośnych. Może to świadczyć o znaczeniu miejscowego wytwarzania reniny i roli tkankowych układów RAAS w patogenezie w tej postaci nadciśnienia tętniczego [Covic i Gusbeth-Tatomir, 2009].

Równocześnie ale także niezależnie od nadciśnienia obserwuje się postępujące upośledzenie funkcji nerki [Chonchol i Linas, 2006]. Stopniowo dochodzi do zmniejszania się wielkości nerki, ścieńczenia (zmniejszenia grubości) warstwy korowej, w drugiej nerce może zaś dojść do przerostu wyrównawczego. Atrofia postępuje szczególnie gwałtownie przy całkowitym zamknięciu tętnicy nerkowej, jednak nawet niecałkowite zajęcie naczynia powoduje zanik miąższu nerkowego. Proces ten częściowo spowodowany jest martwicą komórek tworzących nefrony w prostym mechanizmie niedoboru tlenu [Gobé i wsp., 1990]. Większość krwi doprowadzanej przez tętnicę nerkową to krew potrzebna do zachowania właściwej filtracji, a mniej niż 10% tlenu dostarczanego przez nią jest niezbędne dla zachowania prawidłowego metabolizmu nerki. Zmiany dotyczą też drugą nerkę, w której dochodzi stopniowo do procesów szkliwienia oraz przerostu tkanki łącznej. Ogół tych procesów określamy pojęciem nefropatii niedokrwiennej, która bezpośrednio wynika ze zwężenia tętnicy nerkowej [Chonchol i Linas, 2006].

W patogenezie nadciśnienia naczyniowo-nerkowego dochodzi także do aktywacji czynników naczyniorozszerzających o właściwościach antymitogennych. W przebiegu tej postaci nadciśnienia tętniczego zwiększa się sekrecja prostaglandyn, przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) i adrenomeduliny przez niedokrwioną nerkę. Prawdopodobnie jest to mechanizm wyrównawczy, który przeciwdziała wzrastającemu ciśnieniu krwi [Chonchol i Linas, 2006].

Mechanizm rozwoju nadciśnienia naczyniowo-nerkowego zależy od rodzaju zmian w tętnicach nerkowych. W przypadku jednostronnego zwężenia tętnicy nerkowej główną przyczyną

rozwoju nadciśnienia jest wzmożona aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron. W tej postaci nadciśnienia, gdzie kluczowa jest zwiększona aktywność reninowa i zwiększone wydzielanie Ang II, podanie antagonistów Ang II powoduje obniżenie ciśnienia tętniczego. W przypadku obustronnego zwężenia, główną rolę odgrywają mechanizmy związane z zatrzymywaniem sodu.

Opracowano techniki doświadczalnego wytwarzania nadciśnienia naczyniowo-nerkowego, których wspólną cechą jest wywołanie niedokrwienia nerki poprzez założenie różnego typu zacisków na tętnicę nerkową zwierząt doświadczalnych. Za znamienne zwężenie tętnicy nerkowej, które wiąże się z istotnym spadkiem przepływu krwi przez naczynie, uważa się zwężenie przekraczające 70-80% średnicy naczynia, a 50-70% redukcja średnicy ma już powodować zmiany potencjalnie istotne. Zmiany na skutek zwężenia tętnicy nerkowej mogą dotyczyć upośledzenia czynności wydalniczej, endokrynnej oraz homeostatycznej nerek. Dochodzi także do rozwoju nefropatii niedokrwiennej, czyli zmniejszenia przesączania kłębuszkowego, co ostatecznie może prowadzić do schyłkowej niewydolności nerek [Ploth, 1983].

3.3. Nadciśnienie o podłożu genetycznym

Patogeneza nadciśnienia tętniczego ma charakter złożony i wieloczynnikowy, prawie 95% wszystkich przypadków nadciśnienia nadal pozostaje niewyjaśniona. Wyniki najnowszych badań podkreślają znaczenie czynnika genetycznego w patogenezie nadciśnienia tętniczego [Butler, 2010; Ehret i Caulfield; 2013]. Jednym z najważniejszych doświadczalnych modeli genetycznie uwarunkowanego nadciśnienia tętniczego są spontanicznie rozwijające nadciśnienie szczury SHR. Pod względem przebiegu, zmian aktywności układów regulujących wielkość ciśnienia krwi oraz przebiegu zmian narządowych nadciśnienie tętnicze u tych szczurów jest podobne do zaburzeń występujących w nadciśnieniu pierwotnym u człowieka.

Szczep szczurów SHR wyhodowano na Uniwersytecie w Kyoto (Kyoto School of Medicine) w Japonii w 1963 z tych niekrewniaczych szczurów Wistar Kyoto (WKY), które charakteryzowały się podwyższonym ciśnieniem krwi [Okamoto i Aoki, 1963; Okamoto i wsp., 1972; Adams i wsp., 1989]. Krzyżowanie było na tyle skuteczne, że już w trzecim pokoleniu dało niemal 100% pewność wystąpienia nadciśnienia u potomstwa [Okamoto i Aoki, 1963]. Szczury szczepu SHR żyją przeciętnie od 1 do 2 lat, natomiast szczury WKY, z których SHR zostały wyselekcjonowane, żyją ok. 2,5 do 3 lat [Folkow, 1982].

Choć nadciśnienie o podłożu genetycznym determinowane jest poligenicznie [Tanase i Suzuki 1971; Yen i wsp., 1974], to jednak tak szybki rezultat selektywnej hodowli w kierunku wyższego ciśnienia krwi wskazuje, że tylko kilka loci (obszarów) genetycznych na chromosomach

było zaangażowanych w wytworzenie nadciśnienia w tym szczepie szczurów. Według danych literaturowych prawdopodobnie jest ich od 2 do 4 [Tanase i Suzuki, 1971; Yen i wsp., 1974; Yamamoto i wsp., 2013], w tym przynajmniej jeden autosomalny i drugi zlokalizowany na chromosomie Y [Suzuki i wsp., 1987; Ely i wsp., 1993].

Między 7 a 15 tygodniem życia szczury szczepu SHR w sposób spontaniczny rozwijają nadciśnienie tętnicze [Trippodo i wsp., 1981; Folkow, 1982]. Zespół Okamoto wykazał, że u szczurów SHR rozwój nadciśnienia zaczyna się około 5-6 tygodnia życia osiągając wartości skurczowego ciśnienia tętniczego krwi między 180 a 200 mm Hg, w fazie nadciśnienia ustalonego. Postać nadciśnienia u tych szczurów wykazuje wiele cech nadciśnienia na tle całkowitej niewydolności nerek. Dochodzi do niewydolności i przerostu mięśnia sercowego oraz głębokiego zaburzenia czynności nerek [Yamamoto i wsp., 2013]. Począwszy od 40 do 50 tygodnia życia, szczury SHR rozwijają cechy chorób układu krążenia, takie jak przerost ściany naczyń i serca [Conrad i wsp., 1995].

Samce szczurów SHR szybciej rozwijają nadciśnienie niż samice. Wysokie ciśnienie skurczowe krwi, rzędu 170 mm Hg samce osiągają już ok. 10 tygodnia życia [Tanase i Suzuki, 1971]. Według Yamori (1984), szczury mają utrwalone nadciśnienie krwi w wieku 7-15 tygodni. Ostatecznie samce mogą osiągnąć wartości skurczowego ciśnienia krwi nawet powyżej 250 mm Hg, podczas gdy samice nie przekraczają 180 mm Hg [Roba, 1976].

Zmiany histopatologiczne nerek pojawiają się u samców ok. 8 miesiąca życia, a u samic dopiero po 12-15 miesiącach życia. Samice żyją dłużej niż samce [Wexler i wsp., 1981]. Następuje przerost ścian naczyń krwionośnych, który pogłębia się z wiekiem [Smith i Hutchins, 1979]. Ten model genetyczny charakteryzuje się także zwiększonym obwodowym oporem naczyniowym przy zachowaniu prawidłowych wartości pojemności minutowej serca (ang. cardiac output).

Wiele badań wskazuje na istotne znaczenie komponentu neurogennego w patogenezie nadciśnienia tętniczego szczurów SHR. Praca Gray'a (1984) wskazuje, że układ współczulny rozwija się szybciej u szczurów SHR w porównaniu do WKY. Aktywność układu współczulnego w szczepie SHR jest zwiększona. Choć u szczurów SHR do 15 tygodnia życia aktywność nerwów współczulnych jest hamowana poprzez wzrost stymulacji baroreceptorów (tak jak u szczurów Wistar Kyoto), to już u starszych osobników, u których doszło do utrwalenia nadciśnienia tętniczego, obserwuje się utratę zdolności do takiego hamowania nerwów współczulnych [Campbell i wsp., 1995]. W genetycznym modelu nadciśnienia występuje zwiększona częstość skurczów serca, obserwuje się wyraźne osłabienie odruchu z baroreceptorów i zaburzenie ośrodkowej regulacji ciśnienia tętniczego. Stwierdzono także zwiększenie liczby receptorów dla Ang II i wzrost stężenia peptydów opioidowych, natomiast zmniejszeniu ulega liczba receptorów dla ANP [Campbell i wsp., 1995; Yamamoto i wsp., 2013]. W mózgu zaobserwowano zmniejszenie

zawartości wazopresyny przy jednoczesnym wzroście tempa obrotu noradrenaliny w ośrodkowym układzie nerwowym. Stężenie reniny w mózgu jest podwyższone, a ośrodkowe podanie antagonistów Ang II skutkuje obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi do wartości prawidłowych [Campbell i wsp., 1995]. Przepływ krwi przez mózg w modelu genetycznym nadciśnienia jest utrzymywany w normie jak u osobników z prawidłowym ciśnieniem krwi, co oznacza, że opór naczyniowy w krążeniu mózgowym szczurów SHR wzrasta proporcjonalnie do ciśnienia tętniczego krwi. Innym wyrazem przystosowania krążenia mózgowego do nadciśnienia tętniczego u szczurów SHR jest zachowanie autoregulacji przepływu z jednoczesnym przesunięciem jej granic w kierunku wyższych wartości ciśnienia. Takie przesunięcie granic autoregulacji, które jest korzystnym przystosowaniem naczyń krwionośnych mózgu do nadciśnienia, może skutkować niekorzystnymi konsekwencjami w postaci upośledzonej tolerancji na leki hipotensyjne, zwłaszcza u starszych osobników [Campbell i wsp., 1995].

Zwiększenie oporu naczyniowego i przesunięcie granic autoregulacji są związane ze zmianami strukturalnymi w naczyniach. We wczesnym etapie rozwoju nadciśnienia zmiany te polegają na hipertrofii komórek mięśni gładkich i przemodelowaniu ściany naczyń krwionośnych. Taka hipertrofia u SHR prowadzi do zwiększenia grubości ściany naczyniowej oraz do zmniejszenia średnicy wewnętrznej naczynia. Obserwuje się zmniejszenie światła naczynia i zwiększenie oporu naczyniowego. Podczas gdy hipertrofia i związane z nią zmniejszenie podatności ściany naczyniowej na czynniki naczynioaktywne dotyczy przede wszystkim większych naczyń w narządach, o tyle przemodelowanie naczynia (zwiększenie oporu naczyniowego) są głównymi zmianami występującymi w małych tętniczkach oporowych nerek, mózgu czy serca. Powyższe zmiany strukturalne są z jednej strony korzystne ze względu na ochronę najmniejszych naczyń mikrokrążenia, ale z drugiej strony upośledzają zdolność naczyń oporowych do maksymalnego rozszerzenia, a więc do maksymalnego zwiększenia przepływu krwi. Upośledzenie zdolności naczyń do maksymalnego zwiększenia przepływu krwi wydaje się być istotną przyczyną dużej wrażliwości na ogniskowe niedokrwienie narządów u szczurów SHR [Zhang-James i wsp., 2013].

Rozwój nadciśnienia u SHR jest skorelowany z uszkodzeniem nerek. Szczury SHR mają mniej kłębuszków nerkowych niż WKY i choć są one podobnej wielkości u obu szczepów to jednak różnica w ich liczbie skutkuje mniejszą sprawnością filtracyjną narządu [Hultström; 2012]. Fakt ten jest zgodny z hipotezą, że nerki pełnią istotną rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego u szczurów SHR [Skov i wsp., 1994]. Transplantacja nerki ze szczura SHR do normotensyjnego szczura stada Wistar powoduje wzrost ciśnienia krwi u biorcy. Zabieg odwrotny, czyli przeszczepienie nerki ze szczura Wistar do szczura szczepu SHR normalizuje ciśnienia krwi u biorcy [Kawabe i wsp., 1978]. Dzieje się tak również w przypadku transplantacji do szczura SHR

w fazie rozwoju nadciśnienia: ciśnienie krwi również normalizuje się w późniejszym wieku biorcy, co wskazuje na podstawową rolę nerek w rozwoju nadciśnienia tętniczego u szczurów SHR [Rettig 1993].

U szczurów SHR występuje także zwiększona aktywność nerkowych nerwów współczulnych, osłabiona aktywność układu kalikreina-kinina, podwyższona synteza tromboksanu, zwiększony metabolizm kwasu arachidonowego poprzez szlak monoaminooksygenazy cytochromu P-450 oraz zwiększone wydzielanie wazopresyny [Xiao i wsp., 2010]. Wspólnie czynniki te powodują zwiększenie zatrzymania sodu i wody w organizmie oraz prowadzą do zwiększenia napięcia mięśni gładkich naczyń. We wczesnym okresie życia skurcz naczyń u tych zwierząt prowadzi do funkcjonalnego upośledzenia mikrokrążenia, a w późniejszym etapie życia do zaniku i rzeczywistego uszczuplenia liczby naczyń mikrokrążenia. Ogólnie rzecz biorąc, naczynia w tym modelu charakteryzują się zwiększonym napięciem neurogennym, dochodzi też do przerostu ich ścian [Hultström; 2012].

Szczury SHR charakteryzują się podwyższoną reaktywnością naczyń na działanie substancji presyjnych, jak np. Ang II, ale wzrasta u nich też wrażliwość na działanie substancji naczyniorozszerzających, np. przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP, ang. *atrial natriuretic peptide*). Stężenie Ang II, wazopresyny i endoteliny u szczurów SHR jest podwyższone [Xiao i wsp., 2010]. Blokada obwodowych receptorów wazopresyny skutkuje znacznym obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi. Podobne działanie u tych szczurów wywołuje blokada obwodowych receptorów Ang II lub ACE. Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono mniejszą efektywność działania naczyniorozszerzających czynników pochodzenia śródbłonkowego. Nie wiadomo jednak, czy przyczyną ich słabszego działania jest ich mniejsze wytwarzanie czy może utrudnione warunki przejścia z komórek śródbłonka do mięśni gładkich naczyń, co może mieć związek z przerostem ściany naczyń [Hultström; 2012].

Choć szczep SHR wyselekcjonowany został ze szczepu WKY w kierunku wysokiego ciśnienia krwi, by posłużyć do badań nad nadciśnieniem tętniczym, szczury te są także stosowane jako model zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD, ang. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) oraz w badaniach nad lękiem [Sagvolden i wsp., 2009]. Szczury SHR charakteryzują się opornością na insulinę i są również dobrym modelem dla badania insulinooporności w nadciśnieniu tętniczym u nieotyłych pacjentów [Swislocki i Tsuzuki, 1993]. Ze szczepu WKY wyselekcjonowano także kilka podszczepów SHR: szczury podatne na udar mózgu (ang. *Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Rat*, SHR-SP), na chorobę niedokrwinną serca (ang. *Spontaneously Hypertensive Multiple Smooth Muscle microRNA rats*, SHR-MIR) oraz na miażdżycę (ang. *Spontaneously Hypertensive Arteriolipidosis-prone rats*, SHR-ALR). Wiadomo, że chorzy z nadciśnieniem nie stanowią jednorodnej grupy pod względem etiologii choroby, jednak

modele nadciśnienia skupiające się na poszczególnych czynnikach w powstawaniu nadciśnienia tętniczego dają szansę na sprawdzenie jaki jest rzeczywisty udział tych poszczególnych czynników w patogenezie nadciśnienia.

4. Peptydowe inhibitory konwersji angiotensyny I

4.1. Mechanizm działania peptydowych inhibitorów ACE w terapii nadciśnienia tętniczego

Działanie peptydów o potencjale inhibitorów ACE jest związane z hamowaniem syntezy Ang II, która jest bezpośrednio odpowiedzialna za wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz obniżeniem tempa rozkładu bradykininy, substancji rozszerzającej naczynia. W odniesieniu do peptydów hamujących ACE mówi się także o roli nefroprotekcynnej, antyproliferacyjnej i przeciwzkrzepowej [Konieczny i wsp., 2006].

Chociaż zależność między strukturą, a funkcją dla peptydowych inhibitorów ACE nadal nie jest w pełni poznana, wykazują one pewne wspólne cechy strukturalne: są bogate w aminokwasy hydrofobowe i w większości odporne na działanie endopeptydaz przewodu pokarmowego. Mogą też stosunkowo łatwo przenikać ze światła jelita do układu krwionośnego [Kitts i Weiler, 2003]. Peptydowe inhibitory ACE są przeważnie krótkołańcuchowe (dwu- lub tryaminokwasowe), mogą posiadać rozgałęziony łańcuch boczny lub pierścień aromatyczny. Są to zwykle inhibitory kompetycyjne, które przyłączają się do centrum aktywnego i zmieniając konformację enzymu uniemożliwiają powstanie aktywnego połączenia enzym-substrat. Zbudowane są zazwyczaj z 2 do 12 reszt aminokwasowych, choć zdarzają się sekwencje dłuższe [Norris i Fitzgerald, 2013]. Te inhibitory ACE, które charakteryzują się dłuższą sekwencją aminokwasów, mają na C końcu łańcucha argininę lub lizynę, a dodatni ładunek tych reszt ma znaczenie dla aktywności tych peptydów [Norris i Fitzgerald, 2013]. Wykazano, że zmiana C-końcowej reszty argininy powodowała zanik bioaktywności peptydu, stąd wniosek, że mechanizm hamowania ACE wymaga połączenia inhibitora z miejscem wiązania o charakterze anionu, które różni się od miejsca katalicznego enzymu. Taki mechanizm właściwy jest inhibitorom niekompetycyjnym. Inhibitor niekompetycyjny wiąże się w zupełnie innym miejscu enzymu niż centrum aktywne i centrum allosteryczne i jest to typ inhibicji odwracalnej. Po związaniu się z enzymem w miejscu innym niż centrum aktywne, peptyd nadal może zdeformować centrum aktywne enzymu i uniemożliwić wiązanie się z substratem. Niektóre z peptydowych inhibitorów ACE mają C-końcową resztę kwasu glutaminowego, która wykazuje zdolność chelatowania jonu cynku, czyli składnika centrum katalicznego ACE. W ten sposób wiązanie peptydu z jonem cynku unieczynnia enzym konwertujący. Wiele peptydów pochodzących z żywności zawiera także C-końcową resztę proliny, natomiast na N-końcu znajduje się przeważnie izoleucyna lub walina [Iwaniak, 2011].

Zależnie od sposobu wiązania peptydu z ACE, inhibitory te można podzielić na trzy grupy. W pierwszej grupie są tzw. prawdziwe inhibitory (ang. *true inhibitors type*). Ich aktywność nie ulega zmianie pod wpływem hydrolizy przez ACE lub inne enzymy proteolityczne do krótszych fragmentów. Drugą grupę stanowią inhibitory substratowe (ang. *substrate inhibitors type*), których aktywność ulega osłabieniu pod wpływem związania z ACE. Ostatnią kategorię peptydów hamujących enzym konwerujący stanowią tzw. proleki (ang. *pro-drug inhibitors type*), które pod wpływem działania enzymów trawiennych przewodu pokarmowego lub po związaniu się z ACE ulegają przekształceniu do aktywnych inhibitorów. Bioaktywne peptydy mogą być uwolnione z białkowych prekursorów (proleków) również podczas procesów fermentacji dzięki aktywności proteolitycznej mikroorganizmów lub w wyniku enzymatycznej hydrolizy *in vitro*. Z badań przeprowadzonych *in vivo* na szczurach SHR wynika, że tylko peptydy z pierwszej i ostatniej grupy wykazują zdolność obniżania ciśnienia krwi [Ryan i wsp., 2011]. Przykładem ostatniego typu peptydu (proleku) jest sekwencja LKPNM (Leucyna-Lizyna-Prolina-Asparagina-Metionina) pozyskiwana z białek sardynki, którą ACE hydrolizuje do tripeptydu LKP (Leucyna-Lizyna-Prolina), posiadającego ośmiokrotnie wyższą aktywność niż wyjściowy prolek [Fujita i Yoshikawa, 1999].

Większość peptydowych inhibitorów ACE (przeważnie długołańcuchowych) wykazuje największą aktywność biologiczną przy podaniu doustnym, natomiast podanie dożylnie często wymaga wcześniejszego potraktowania preparatem mikrobiologicznym z enzymami hydrolitycznymi lub enzymami przewodu pokarmowego (pepsyna, chymotrypsyna). W badaniach Möllera i wsp. (2008) podawano doustnie białka z żółtka jaj, które wykazywały w ustroju działanie hipotensyjne. Jednak przy podaniu dożylnym niezbędne okazało się trawienie enzymami proteolitycznymi, które uwolniły z białek niskocząsteczkowe oligopeptydy. Dożylnie podanie szczurom roztworu tych oligopeptydów powodowało obniżenie skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi o 10%. Objętość mieszanki wynosiła 5 ml/kg masy ciała, co odpowiadało aż 500 mg hydrolizatu/kg masy ciała.

Z białek rzepaku poddanych działaniu subtilizyny także wyizolowano krótkołańcuchowe aktywne peptydy: IY (Izoleucyna-Tyrozyna), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna), VWV (Walina-Tryptofan-Walina), WIS (Tryptofan-Izoleucyna-Seryna). Jak wykazały badania [Korhonen i Pihlanto, 2006] peptydy te były odporne na działanie enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego, a dożoładkowa dawka 150 mg/kg masy ciała obniżała ciśnienie krwi u szczura i to znacznie szybciej niż po podaniu dożylnym.

Pomimo szeroko zakrojonych badań, biologiczna aktywność peptydów hamujących ACE stwierdzona w warunkach *in vitro*, nie zawsze przekłada się na efekty biologiczne *in vivo*. Przyczyną są złożone mechanizmy molekularne absorpcji i transportu biopeptydów oraz podatność

peptydów na hydrolizę do nieaktywnych fragmentów w ustroju [Hernández-Ledesma i wsp. 2007]. Zasadnicze znaczenie dla efektu fizjologicznego ma zachowanie stabilnej, natywnej struktury peptydów podczas interakcji z docelowym receptorem/enzymem. Stwierdzono, że obecność prolina na C-końcu peptydu może wykazywać działanie protekcyjne i chronić peptyd przed hydrolizą enzymatyczną w układzie pokarmowym i pośrednio wpływać na jego biodostępność [Segura-Campos i wsp., 2011]. W badaniach dotyczących mechanizmu transportu bioaktywnych peptydów z zastosowaniem linii komórkowej Caco-2 wykazano, że peptydy antyhipertensyjne np. IPP (Izoleucyna-Prolina-Prolina) i VPP (Walina- Prolina-Prolina) zachowują stabilną strukturę podczas przenikania przez monowarstwę nabłonka. Udowodniono, że efektywność transportu zależy od ładunku, masy cząsteczkowej oraz hydrofobowości peptydów [Sienkiewicz-Szłapka i wsp., 2009]. W badaniach z wykorzystaniem szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR) wykazano, że trójpeptydy IPP oraz VPP są wchłaniane z pożywienia w przewodzie pokarmowym, czego potwierdzeniem była ich obecność w aorcie brzusznej oraz obniżenie ciśnienia tętniczego krwi u badanych zwierząt [Kawaguchi i wsp., 2012].

4.2. Syntetyczne inhibitory ACE stosowane w leczeniu nadciśnienia i ich działania niepożądane

Inhibitory konwertazy angiotensyny I (ACEi) to jedna z najważniejszych współczesnych grup leków w terapii nadciśnienia tętniczego, wciąż znajduje się dla nich kolejne zastosowania i dowodzi korzystnych właściwości. Działanie ACEi polega nie tylko na hamowaniu powstawania naczyniokurczącej Ang II, ale także zapobiega rozkładowi działającej naczyniorozszerzająco bradykininy. Ponadto zahamowanie szlaku powstawania Ang II powoduje przekształcanie Ang I w Ang 1-7, o działaniu przeciwnym do Ang II. Inhibitorom ACE przypisuje się nie tylko działanie hipotensyjne, ale również antyproliferacyjne, nefroprotekcyjne, a nawet przeciwzakrzepowe.

Jednak pomimo wielokierunkowych korzystnych efektów przyjmowanie ACEi przez pacjentów z nadciśnieniem tętniczym może skutkować pojawieniem się działań niepożądanych ze strony układu oddechowego, pokarmowego, moczowego, nerwowego czy też może dojść do zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej. Obserwowane są także takie niepożądane efekty przyjmowania ACEi jak: zmęczenie, zawroty głowy, reakcje skórne jak wysypka (kaptopryl, lizynopryl), świąd, pokrzywka, nadmierne wypadanie włosów czy nadwrażliwość na światło [Koniczny i wsp., 2006; Iwaniak i wsp., 2013].

Najczęstszy objaw ze strony układu oddechowego to właśnie suchy kaszel, który jest stosunkowo częstym działaniem niepożądanym ACEi i uniemożliwia przewlekłe stosowanie tych

leków u niektórych chorych. Objaw ten jest wynikiem wzrostu stężenia bradykininy oraz substancji P w oskrzelach na skutek zmniejszenia aktywności ACE (pacjenci powyżej 60. roku życia) [Iwaniak i wsp., 2013].

Do zaburzeń w funkcjonowaniu układu pokarmowego z powodu przyjmowania przez pacjentów ACEi zaliczyć należy wymioty, nudności, zaparcia lub przeciwnie, biegunki oraz zaburzenia smaku. Zdarzają się także uszkodzenia wątroby, zwłaszcza u pacjentów leczonych enalaprylem. Z kolei większość dostępnych na rynku ACEi może prowadzić do ostrego zapalenia trzustki [Konieczny i wsp., 2006].

Leczenie nadciśnienia tętniczego ACEi może powodować wzrost stężenia mocznika i kreatyniny w surowicy świadczący o zaburzeniach w czynności nerek. Jest to szczególnie niebezpieczne u pacjentów cierpiących na ich niewydolność [Konieczny i wsp., 2006].

Leczenie inhibitorami ACE może także prowadzić do zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej. Zalecane jest, aby pacjenci z niewydolnością nerek kontrolowali stężenie potasu w surowicy krwi, ponieważ na skutek terapii ACEi może dojść do hiperkalemii (wzrostu stężenia potasu we krwi powyżej wartości 5,5 mmol/l). Z kolei pacjenci cukrzycowi leczeni ACEi muszą liczyć się z ryzykiem wystąpienia hipoglikemii, ponieważ ACEi wpływają na zmniejszenie insulinooporności [Konieczny i wsp., 2006].

W badaniach na ludziach z wykorzystaniem kaptoprylu i innych inhibitorów ACE coraz częściej zwraca się uwagę na fakt, że wciąż pozostaje duża pula Ang II, której nie sposób zredukować poprzez zastosowanie samych inhibitorów ACE [Hollenberg i wsp., 1998]. Od kiedy Okunishi i wsp. (1984) wykazali w badaniach *in vitro* (w ścianie naczyń krwionośnych u ludzi) istnienie alternatywnego wobec ACE enzymu, który równie skutecznie co ACE konwertuje Ang I do II, lokalne szlaki syntezy Ang II są punktem zainteresowań naukowców i skłaniają do poszukiwań nowych metod terapii nadciśnienia tętniczego krwi.

Warto zwrócić także uwagę, że alternatywne szlaki przemiany Ang I w Ang II (tkankowe RAAS), które nie są hamowane przez inhibitory ACE, stanowią potencjalne ograniczenie skuteczności długotrwałego stosowania ACEi, ponieważ dochodzi do zwiększenia aktywności lokalnych, ACE-niezależnych szlaków syntezy Ang II w różnych tkankach w organizmie.

Obecny stan wiedzy i badań doświadczalnych dotyczących alternatywnych dróg powstawania peptydów hormonalnych RAAS przedstawiono wcześniej, w rozdziałach 2.1 i 2.2.

4.3. Naturalne peptydy pochodzące z białek żywności obniżające ciśnienie tętnicze krwi

Pożywienie nie jest tylko źródłem energii i składników odżywczych o tradycyjnie pojmowanej roli zaspokojenia potrzeb pokarmowych organizmu;, podstawowym kryterium oceny

wartości odżywczej zawartego w nim białka jest skład aminokwasowy oraz przyswajalność aminokwasów egzogennych dla człowieka. Ostatnio zaproponowano dodatkowe kryterium oceny białek, jakim jest możliwość uwalniania biologicznie aktywnych peptydów podczas enzymatycznej hydrolizy białek; peptydy te mogą regulować różne funkcje organizmu. Ponieważ nadciśnienie tętnicze jest bardzo rozpowszechnioną chorobą cywilizacyjną, wciąż poszukuje się skutecznych metod jego leczenia. Patrząc na czynniki sprzyjające rozwojowi nadciśnienia, jak wiek, predyspozycje genetyczne, styl życia czy masa ciała pacjenta, uwagę zwraca fakt, że dwa ostatnie czynniki są dietozależne. Z tego powodu poszukuje się składników żywności, które wykazują zdolność obniżania ciśnienia krwi. Najnowsze kierunki badań skupiają się na szukaniu takich sekwencji aminokwasowych białek i peptydów pochodzących z żywności, które miałyby potencjał hamowania enzymów wchodzących w skład RAAS. Ponieważ inhibitory konwertazy angiotensyny są jednymi z najczęściej stosowanych farmaceutyków w leczeniu nadciśnienia, badania w dużej mierze skupiają się na poszukiwaniu nowych peptydów przeciwnadciśnieniowych będących inhibitorami ACE i one stanowią najlepiej poznaną grupę takich biologicznie aktywnych peptydów.

Coraz częściej podkreśla się konieczność poszukiwania nowych form działania profilaktycznego, a nawet terapeutycznego w celu wspomaganie leczenia chorób dietozależnych poprzez m.in. modyfikowanie spożywanej diety jako źródła naturalnie występujących w żywności związków bioaktywnych. Dobór odpowiedniej diety wspomagającej leczenie farmakologiczne jest uzasadniony zwłaszcza wtedy, gdy działania profilaktyczne mają na celu zapobieganie chorobom dietozależnym oraz nadciśnieniu tętniczemu, chorobom neurodegradacyjnym czy nowotworowym. Peptydy pochodzące z żywności, które mają potencjał hipotensyjny, mogą znaleźć zastosowanie w produkcji tzw. żywności funkcjonalnej oraz nutraceutyków wspomagających profilaktykę niektórych dietozależnych chorób cywilizacyjnych.

Na przestrzeni lat zastosowanie znalazło wiele naturalnych inhibitorów ACE, jak peptydy pochodzące z hydrolizatów białek żywności. W oparciu o ich strukturę stworzono także wiele związków syntetycznych [Iwaniak, 2011; Pihlanto i Mäkinen, 2013]. Ponieważ stosowanie syntetycznych leków wiąże się z szeregiem skutków ubocznych coraz powszechniej mówi się o stosowaniu naturalnych, hamujących ACE peptydów z żywności, które nie wywołują wyżej wymienionych efektów ubocznych. Niestety jak dotąd peptydy te nie są też tak skuteczne jak leki syntetyczne.

Bogatym źródłem peptydów obniżających ciśnienie krwi są zarówno produkty pochodzenia zwierzęcego jak i roślinnego: m. in. białka mleka [Darewicz i wsp., 2011], surowce i produkty roślinne (hydrolizaty glutenu pszenicy, zeiny kukurydzy, białek ryżu, soi, gryki, kielków pszenicy, fasoli zwyczajnej, fasoli Adzuki, rzepaku, czosnku, ziemniaków), produkty zwierzęce (z białek osocza krwi, żelatyny, drożdży, mięsa wieprzowego i drobiowego, jaj) oraz surowce pochodzące

z organizmów morskich, np. z alg, ryb i owoców morza [Fujita i wsp., 2000; Li i wsp., 2004; Faria i wsp., 2008; Escudero i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2010a, b; Pihlanto i Mäkinen, 2013]. W badaniach na szczurach potwierdzono właściwości przeciwnadciśnieniowe owokininy 2-7 otrzymanej z owoalbuminy jaja [Yamada i wsp., 2008]. Peptydy hamujące ACE otrzymano także z białek mięśni kurczaka rozkładanych przez termolizynę: IKW (Izoleucyna-Lizyna-Tryptofan), LAP (Leucyna-Alanina-Prolina) i LKP (Leucyna-Lizyna-Prolina) skutecznie obniżały rozkurczowe ciśnienie krwi u szczurów SHR odpowiednio o 50, 40 i 75 mmHg po dożylnym podaniu w dawce 10 mg peptydu/kg masy ciała [Ryan i wsp., 2011]. Substancje o podobnym działaniu znajdują się także w roślinach. Badania wykazały, że podczas trawienia białek soi w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, powstają peptydy o sekwencjach np. VLIVP (Walina-Leucyna-Izoleucyna-Walina-Prolina), YLAGNQ (Tyrozyna-Leucyna-Alanina-Glicyna-Asparagina-Glutamina), FF (Fenyloalanina-Fenyloalanina), które wyraźnie hamowały działanie konwertazy angiotensyny I [Chen i wsp., 2009]. Obecność peptydów inhibitorów ACE potwierdzono również w szpinaku; peptydy o sekwencjach MRW (Metionina-Arginina-Tryptofan) oraz MRWD (Metionina-Arginina-Tryptofan-Kwas asparaginowy) obniżały ciśnienie krwi u szczurów SHR już po 2 h od podania dawki odpowiednio 20 lub 30 mg peptydu/kg masy ciała [Yang i wsp., 2003].

4.3.1. Peptydy blokujące tkankowe szlaki RAAS

Obecne wielokierunkowe podejście do leczenia chorych z nadciśnieniem tętniczym jest w coraz większej mierze oparte na zrozumieniu zaburzeń mechanizmów regulacyjnych, odgrywających kluczową rolę w złożonej patogenezie tej choroby. Z tego powodu RAAS znalazł się w centrum zainteresowania lekarzy i naukowców. Jak dotąd najwięcej uwagi poświęcano ogólnoustrojowemu RAAS, jednak, co już obecnie wiadomo niezależnie od klasycznego, systemowego układu RAAS, bardzo ważną rolę odgrywają lokalne, tkankowe RAAS, które wpływają na czynność i strukturę narządów na drodze parakrynej i działają niezależnie od układu osoczowego.

Choć w nadciśnieniu synteza Ang I jest ograniczona, tempo powstawania Ang II jest nadal duże. Pomimo, że stopniowo dochodzi do wyciszenia ogólnoustrojowego RAAS, w tym samym czasie następuje uaktywnienie wewnątrzkomórkowych parakrynych układów - tkankowych RAAS, co prowadzi do ponownego wzrostu stężenia Ang II. Udział lokalnych RAAS, m.in. w ścianach naczyń krwionośnych może być nawet istotniejszy niż rola układu systemowego i substancji krążących ogólnoustrojowo. Układy te odpowiadają za za przewlekłe i trudne do odwrócenia zmiany lokalnego przepływu krwi powstające w następstwie zmian strukturalnych naczyń. Wytworzona lokalnie angiotensyna II pobudza receptory tej samej komórki (działanie

autokryjne) lub sąsiadujących (działanie parakryjne), a wytwarzana lokalnie w komórkach śródbłonna angiotensyna II jest jednym z najważniejszych czynników wzrostu współodpowiedzialnych za proliferację mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych. Angiotensyna II zwiększa również syntezę kolagenu w ścianie naczyniowej oraz w obrębie mięśnia serca, przyczyniając się do ich pogrubienia i sztywnienia. Nie tylko komórki naczyń, lecz także innych struktur w nerce, np. komórki kanalików nerkowych, zdolne są do syntezy elementów lokalnego RAAS, głównie w stanach patologicznych [Navar i wsp., 2011]. Wydaje się, że lokalne oddziaływania wewnątrzkomórkowych układów RAAS mogą mieć wpływ na krążenie ogólnoustrojowe.

W pracy Marczak i wsp. (2003) stwierdzono, że izolowane z nasion rzepaku peptydy (VW - Walina-Tryptofan, IY - Isoleucyna-Tyrozyna, VWIS - Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna oraz RIY - Arginina-Isoleucyna-Tyrozyna) skutecznie obniżały ciśnienie krwi, nawet o 15 mmHg, u starszych szczurów SHR w wieku 24-28 tygodni życia, u których inhibitory ACE okazały się zdecydowanie mniej efektywne. W celu sprawdzenia *in vivo* hipotensyjnych efektów badanych peptydów autorzy publikacji podawali je dożołądkowo: VW, IY oraz RIY w dawce po 7,5 mg/kg, natomiast VWIS w dawce 12,5 mg/kg. Każdy z badanych peptydów wykazywał hipotensyjne efekty i skutecznie obniżył ciśnienie krwi u szczurów SHR o ok. 10 mmHg po 2h od podania ($p \leq 0,01$). Jedynie peptyd RIY istotnie obniżył ciśnienie krwi po 4h od podania [Marczak i wsp., 2003].

Wyniki stały się przesłanką do podjęcia badań nad rolą tych peptydów w hamowaniu powstawania Ang II w szlaku zależnym od chymazy, w tkankowych RAAS, co jest przedmiotem uwagi niniejszej pracy. Obniżenie tkankowego powstawania Ang II, mogłoby także zapobiegać przebudowie tkanek w układzie krążenia. Niski koszt i łatwość pozyskania takich peptydów z rośliny powszechnie uprawianej na całym świecie (rzepak, *brassica napus L. var. napus*) przemawia dodatkowo za podjęciem badań nad ich przydatnością w walce z nadciśnieniem a także w profilaktyce choroby nadciśnieniowej.

II. Cel badań

Celem było zbadanie wpływu blokowania lokalnie działających enzymów wrażliwych na chymostatynę (takich jak chymaza i nowo opisana u szczurów elastaza-2), odpowiadających za powstawanie angiotensyny II (Ang II) w tkankach, na ciśnienie krwi i funkcję nerek u szczurów z doświadczalnym nadciśnieniem o różnym podłożu. Posłużono się trzema modelami nadciśnienia: (1) formą zależną od zwiększonego podawania sodu; (2) nadciśnieniem wywołanym zwężeniem, tętnicy nerkowej (model Goldblatta), oraz (3) nadciśnieniem o podłożu genetycznym (SHR), zarówno w fazie rozwoju (7. tydzień życia) oraz w fazie ustalonego nadciśnienia (16. tydzień życia).

Badania podzielono na dwie zasadnicze części :

Część I: Wpływ blokowania lokalnych szlaków powstawania Ang II (za pomocą chymostatyny, komercyjnie dostępnego inhibitora chymazy i elastazy-2) na ciśnienie tętnicze krwi, hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek w trzech modelach nadciśnienia u szczura.

Część II: Wpływ peptydów pochodzących z nasion rzepaku o potencjalnym hipotensyjnym i hamującym działaniu na tkankowe układy RAAS, na ciśnienie tętnicze krwi oraz hemodynamikę i czynność wydalniczą nerek w wybranych (szczury SHR) modelach nadciśnienia u szczura.

III. Materiały i metody

1. Zwierzęce modele nadciśnienia

Doświadczenia przeprowadzano na samcach szczurów stada Sprague-Dawley oraz samcach szczepu SHR ze zwierzętarni IMDiK PAN. Procedury doświadczalne zostały zaaprobowane przez IV Lokalną Komisję Etyczną d.s. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała Nr 30/2011 z dnia 09.05.2011 r. do wniosku 20/2011), a następnie pozwolenie na wykonywanie doświadczeń przedłużono (Uchwała Nr 10/2014 z dnia 15.04.2014 r. do wniosku 10/2014).

1.1. Model nadciśnienia sodozależnego

U samców szczurów Sprague-Dawley (masa przedoperacyjna 240 ± 21 g) wytworzono nadciśnienie poprzez jednostronną nefrektomię a następnie zwiększoną podaż sodu w diecie. Zwierzętom w stanie uśpienia (krótkotrwała narkoza: morbital 40 mg kg^{-1} i.p., Biowet, Puławy, Polska) w warunkach aseptycznych odsłaniano z cięcia lędźwiowego prawą nerkę i uwalniano ją z otaczającej tkanki tłuszczowej. Następnie podwiązywano tętnicę i żyłę nerkową i wycinano nerkę. Mięśnie i skórę zaszywano nićmi chirurgicznymi stosując pojedyncze szwy. Po zabiegu zwierzętom podawano podskórnie Meloxicam (Metacam, Boehringer/Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Niemcy, $45 \mu\text{g kg}^{-1}$), środek przeciwbólowy o działaniu ośrodkowym, oraz antybiotyk Baytril (Bayer, Kiel, Niemcy, 5 mg kg^{-1}). Po ok. 2 godzinach od podania narkozy zwierzęta budziły się i wracały do pełnej sprawności motorycznej. Zwierzętom po przeprowadzonej jednostronnej nefrektomii zmieniano dietę ze standardowej (0,25% Na w/w) na wysokosodową (HS, 4% Na w/w). Po 14 dniach ekspozycji na zwiększoną podaż sodu w diecie, co prowadziło do nadciśnienia, przeprowadzano doświadczenia ostre na następujących grupach zwierząt:

- UNX HS+CH (n= 6) – model nadciśnienia zależny od ekspozycji zwierząt jednostronnie nefrektomizowanych na wysoką podaż sodu + infuzja chymostatyny;
- UNX HS+C (n=8) – ten sam model nadciśnienia + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (grupa kontrolna).

1.2. Model doświadczalny nadciśnienia naczyniowo-nerkowego (tzw. model Goldblatta)

U samców stada Sprague-Dawley (przedoperacyjna masa ciała ok. 180 ± 17 g) zastosowano tzw. model Goldblatta; 2k1c - z ang. *two kidney one clip*.

Zwierzęta usypiano (krótkotrwała narkoza: morbital 40 mg kg⁻¹ i.p., Biowet, Puławy, Polska), następnie odsłaniano prawą tętnicę nerkową (boczne cięcie tuż pod żebrami, na wysokości nerki) i zakładano na nią srebrny (nie mający działania alergizującego) zacisk o średnicy 0,2 mm, przy jak najmniejszym uszkodzeniu okolicznych tkanek. Następnie mięśnie i skórę zszywano osobno wyjałowionymi nićmi chirurgicznymi, stosując pojedyncze szwy. Po zabiegu zwierzętom podawano podskórnie Meloxicam (Metacam, Boehringer/Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Niemcy, 45 µg kg⁻¹), środek przeciwbólowy o działaniu ośrodkowym, oraz antybiotyk Baytril (Bayer, Kiel, Niemcy, 5 mg kg⁻¹). W ciągu 28 dni od zabiegu i zwężenia tętnicy nerkowej u zwierząt rozwijało się nadciśnienie. Przez cały ten okres zwierzęta miały nieograniczony dostęp do paszy standardowej (STD, 0,25% Na w/w, SSNIFF GmbH, Soest, Niemcy) i świeżej wody.

Doświadczenia ostre wykonywano po upływie 28 dni od momentu zwężenia tętnicy nerkowej na następujących grupach zwierząt:

- 2K1C+CH (n=9) – model 2k1c + infuzja chymostatyny;
- 2K1C+C (n=6) – model 2k1c + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (grupa kontrolna).

1.3. Model nadciśnienia o podłożu genetycznym

Samce szczurów SHR (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*), ze spontanicznym nadciśnieniem, podzielono na 2 grupy zależnie od stadium rozwoju nadciśnienia: 7-tygodniowe szczury w fazie rozwoju nadciśnienia oraz 16-tygodniowe - w fazie utrwalonego nadciśnienia.

SHR w fazie rozwoju nadciśnienia:

- SHR 7+CH (n=8) – 7-tygodniowe SHR + infuzja chymostatyny;
- SHR 7+C (n=9) – 7-tygodniowe SHR + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (grupa kontrolna).

SHR w fazie ustalonego nadciśnienia:

- SHR 16+CH (n=8) – 16-tygodniowe SHR + infuzja chymostatyny;
- SHR 16+C (n=9) – 16-tygodniowe SHR + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (grupa kontrolna).

2. Doświadczenia ostre

2.1. Chirurgiczne przygotowanie zwierząt do doświadczenia ostrego

Szczury usypiano tiopentalem sodu (100 mg kg⁻¹ i.p.; Thiopental, Sandoz GmbH, Kundl, Austria), który w powyższej dawce pozwala na prowadzenie doświadczeń ostrych w pełnym ogólnoustrojowym znieczuleniu przez kilka godzin. Narkoza wywierała na zwierzę trójkierunkowe

działanie: przeciwbólowe, utraty świadomości oraz unieruchomienia (rozluźnienie mięśni i obniżenie przewodnictwa nerwowego). Podczas całego doświadczenia monitorowano odruch rogówkowy, występowanie ruchów spontanicznych (ruchy kończyn), napięcie mięśni oraz sztywność ogona i w razie potrzeby podawano dożylnie odpowiednią objętość (ok. 0,05 ml i. v.) tiopentalu sodu.

Uwaga metodyczna odnośnie szczurów z nadciśnieniem sodozależnym: Na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w naszym Zakładzie zaobserwowano zwiększoną wrażliwość zwierząt na diecie wysokosodowej na tiopental sodu. Wyżej wymieniona dawka, skuteczna i bezpieczna dla zwierząt na diecie standardowej, u zwierząt na diecie wysokosodowej w większości przypadków prowadziła do zapaści i w konsekwencji do zgonu (za K.H. Olszyński, praca doktorska pt. „Modyfikacja czynności i struktury nerki w zależności od wysokiej podaży sodu – udział wybranych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej”). Dlatego też ostatecznie zwierzętom ze zwiększoną podażą sodu w diecie podawano ok. 2/3 zalecanej dawki.

Temperatura ciała szczura w uśpieniu utrzymywana była 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); czujnik temperatury umieszczony został w odbycie. Pierwszym etapem chirurgii była tracheotomia, następnie w tchawicy umieszczano rurkę polietylenową, która zapewniała swobodną wentylację płuc. Utrata płynów w trakcie zabiegu chirurgicznego była rekompensowana poprzez infuzję dożylną (kaniula polietylenowa wprowadzona do żyły szyjnej) 3% roztworu albuminy bydlęcej (albumina, frakcja V, AppliChem GmbH, Darmstadt, Niemcy) w płynie Ringera ($10 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Baxter Polska Sp. z o. o., Warszawa, Polska).

Do tętnicy szyjnej wprowadzono polietylenową kaniulę w celu pobierania próbek krwi. Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP, ang. *mean arterial blood pressure*) oraz częstość skurczów serca (HR - *heart rate*) mierzono za pomocą kaniuli wprowadzonej do tętnicy udowej i połączonej z miernikiem (Transducer M1567A, Philips Medizin Systeme Böblingen GmbH, Böblingen, Niemcy). Umiejscowioną na tętnicy biodrowej sondą ultradźwiękową (Transonic, Ithaca, NY, USA) mierzono przepływ krwi przez tylną kończynę szczura (IBF, ang. *iliac blood flow*). Następnie wykonywano cięcie lędźwiowe, delikatnie wyłaniono lewą nerkę, oddzielono ją od otaczających tkanek i tłuszczu, pozostawiając nienaruszoną torebkę włóknistą oraz szypułę nerkową. Tak przygotowany narząd umieszczano w holderze stosowanym do badań mikropunkcyjnych. Do wypreparowanego moczowodu wprowadzano cewnik umożliwiający zbiórkę moczu. Na lewą tętnicę nerkową (po częściowym jej odpreparowaniu) 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

wyrażony w ml min^{-1} (RBF, ang. *renal blood flow*). RBF oraz IBF odzwierciedlały stan krążenia w wybranych obszarach naczyniowych szczura. Obliczano także nerkowy opór naczyniowy (RVR, ang. *renal vascular resistance*) oraz opór naczyniowy w krążeniu tylnej kończyny (IVR, ang. *iliac vascular resistance*), jako MABP/RBF oraz MABP/IBF.

Przepływ krwi przez poszczególne 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, ang. *cortical blood flow*) i sond igłowych (zewnątrz-rdzeniowy i wewnątrz-rdzeniowy przepływ krwi, odpowiednio OMBF, ang. *outer medullary blood flow* i IMBF, ang. *inner medullary blood flow*). Po wstępnej ocenie wielkości nerki sondy igłowe były wkłuwane 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 przez trzy strefy nerki wyrażano w umownych jednostkach PU (Perfusion Unit). Wcześniejsze kalibrowanie sond w płynie kalibracyjnym (sygnał pomiarowy swobodnych ruchów Browna = 250 PU) umożliwiało porównywanie pomiarów pomiędzy różnymi doświadczeniami. Po zakończeniu doświadczeń ostrych pobierano wybrane narządy, następnie zwierzęta usypiano poprzez przedawkowanie narkozy. Położenie sond w lewej nerce weryfikowano wykonując cięcie podłużne nerki.

2.2. Protokół doświadczenia ostrego z infuzją substancji czynnych

Po zakończeniu przygotowania chirurgicznego infuzję 3% roztworu albuminy (podawana w trakcie zabiegu chirurgicznego przez ok. 40 min) zastępowano infuzją 3% inuliny ($10 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ w ciągu 10 min) rozpuszczonej w izotonicznym roztworze soli fizjologicznej (Fresenius Kabi Polska Sp. z o. o., Warszawa, Polska), po czym do końca doświadczenia podawano 1,5% roztwór inuliny dla podtrzymania stałego jej poziom w osoczu; inulina służyła do oznaczania tempa przesączania kłębuszkowego (GFR, ang. *glomerular filtration rate*).

Po ustabilizowaniu się parametrów hemodynamicznych rozpoczynano ciągły pomiar ciśnienia krwi i skurczów serca, całkowitego przepływu krwi przez lewą nerkę, przepływu przez tętnicę biodrową oraz przepływów przez poszczególne strefy nerki.

Po dwóch krótkich okresach kontrolnych (2 x 15 min), w których zwierzętom podawano sól fizjologiczną rozpoczynał się okres eksperymentalny z godziną (2 x 30 min) infuzją wybranej substancji czynnej zależnie od grupy badanej:

- rozpuszczalnik chymostatyny (mieszanina 0,05% dimetylosulfotlenku – DMSO, PBS (sól fizjologiczna zbuforowana fosforanami, ang. *phosphate buffered saline*) i soli fizjologicznej) - grupa kontrolna;

- chymostatyna w dawce $2 \text{ mg kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ (z powodu bardzo słabej rozpuszczalności w rozpuszczalnikach polarnych, w oparciu o dane literaturowe, zastosowano rozpuszczalnik organiczny – DMSO, ang. *dimethyl sulfoxide*);
- wybrane peptydy z nasion rzepaku: VW - Walina-Tryptofan, IY - Isoleucyna-Tyrozyna, VWIS - Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna oraz RIY - Arginina-Isoleucyna-Tyrozyna (rozpuszczone w soli fizjologicznej);
- sól fizjologiczna (grupa kontrolna dla peptydów).

Po zakończeniu infuzji substancji czynnej (okres eksperymentalny) ponownie podawano sól fizjologiczną i prowadzono wszystkie pomiary przez kolejne 30 minut (ang. *recovery period*), aby zbadać efekty po odstawieniu badanej substancji.

W trakcie doświadczenia prowadzono okresowe zbiórki moczu i pobierano próbki krwi. Obliczano diurezę minutową (objętość moczu wydalona w ciągu 1 min), mierzono stężenie i wydalanie sodu (odpowiednio U_{Na} i $U_{\text{Na}}V$) oraz wydalanie substancji osmotycznie czynnych ($U_{\text{osm}}V$). Wszystkie parametry wydalnicze przeliczano na gram nerki ze względu na znaczne różnice w masie nerek w poszczególnych grupach, wynikające z właściwości poszczególnych modeli nadciśnienia.

Dodatkowa grupa ekperymentalna

U 16-tygodniowych szczurów (SHR 16) w fazie ustalonego nadciśnienia podawano dożylnie chymostatynę ($2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) i kaptopryl (inhibitor ACE, E. R. Squibb & Sons Ltd, Hounslow, Wielka Brytania) w formie 5-minutowej infuzji; kaptopryl podawano dożylnie w dawce 1 mg kg^{-1} w objętości 0,5 ml soli fizjologicznej na tle infuzji chymostatyny, 30 min po jej rozpoczęciu.

2.3. Pobranie materiału do analiz biochemicznych

Po zakończeniu doświadczenia pobierano narządy (nerka, serce, aorta) do badań morfometrycznych i biochemicznych; narządy tuż po pobraniu ważono.

Nerkę rozcinano wzdłuż: połowę nerki utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA; Eurochem BGD Sp. z o. o., Tarnów, Polska) w celu wykonania preparatów mikroskopowych, natomiast drugą połowę mrozono w izopentanie schłodzonym ciekłym azotem i przechowywano w temp. -80°C w celu późniejszego wykorzystania do oznaczeń biochemicznych. Pobierano próbki krwi, odwirowywano (1500 g, 10 min), a w osoczu oznaczono stężenie sodu, potasu i substancji osmotycznie czynnych (odpowiednio: P_{Na} , P_{K} , P_{osm}). Pozostałą objętość próbek osocza zamrażano

w temperaturze -20°C oraz -80°C . Z serca, które uprzednio ważono, wycinano i ważono lewą komorę oraz pobierano aortę (mrożenie w -80°C) do późniejszych badań biochemicznych.

3. Analiza próbek moczu, krwi i tkanek

3.1. Analiza parametrów moczu i osocza oraz czynności wydalniczej nerek

Objętość moczu określano poprzez ważenie, przy założeniu, że gęstość moczu jest równa gęstości wody. Na tej podstawie obliczano diurezę minutową (V) i wyrażano w $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Próbkę moczu wirowano (800 g, 5 min). Mocz mrożono w -20°C . Krew wirowano (1500 g, 10 min), uzyskane tak osocze mrożono w temperaturze -20°C do oznaczeń stężenia jonów oraz -80°C do oznaczeń biochemicznych (poziom angiotensyny II). Przed mrożeniem w próbkach moczu i osocza oznaczano zawartość substancji osmotycznie czynnych (odpowiednio U_{osm} , P_{osm}) za pomocą osmometru (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Niemcy), mierząc obniżenie punktu zamarzania próbki względem punktu zamarzania wody. Stężenie sodu i potasu w osoczu (P_{Na} , P_{K}) oraz w moczu (U_{Na} , U_{K}) mierzono przy użyciu fotometru płomieniowego (model PFP7, Jenway, Essex, UK), po czym odczytywano z odpowiedniej krzywej standardowej (stosownie do rodzaju jonu i płynu, którego dotyczył pomiar) wykreślonej na podstawie pomiarów roztworów standardowych o znanym stężeniu odpowiedniego jonu (Na^+ , K^+).

3.2. Pomiar przesączania kłębuszkowego (GFR)

Na podstawie klirensu inuliny obliczano wielkość przesączania kłębuszkowego. Inulina jako naturalny wielocukier swobodnie przesącza się w nerkach, nie ulegając reabsorpcji ani sekrecji w kanalikach nerkowych, dlatego cały przesączony ładunek inuliny wydzielany jest do moczu. Metoda mierzenia GFR oparta na klirensie inuliny nadal jest uważana za złoty standard w tej dziedzinie [Dubourg et. al., 2010]. Na potrzeby laboratorium zmodyfikowano metodę spektrofotometrycznego pomiaru inuliny we krwi i moczu opisaną przez Nolina i wsp. (2002).

Zebrane i odpowiednio rozcieńczone zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) próbki osocza i moczu (w rozcieńczeniu odpowiednio: 1:3 oraz 1:100) poddawano inkubacji (1h, 37°C) z roztworem dwóch enzymów (1000 U ml^{-1} katalazy i 100 U ml^{-1} oksydazy glukozowej, w objętości $100 \mu\text{l}$) aby usunąć endogenną glukozę. Następnie dodawano 50 mM kwas indolilo-3-octowy ($150 \mu\text{l}$) i 38% kwas solny (3 ml) i inkubowano w łaźni wodnej (20 min, 60°C). Próbkę poddawano chłodzeniu, następnie nakładano na płytkę 96-dołkową i dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego (długość fali 490 nm, FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH,

Ortenberg, Niemcy). Znając stężenie inuliny w moczu (U_{in}) i osoczu (P_{in}) oraz diurezę minutową (V) i korzystając ze wzoru ogólnego na klirens nerkowy obliczano GFR:

$$GFR = \frac{U_{in} \cdot V}{P_{in}} \text{ [ml min}^{-1}\text{]}$$

3.3. Wykonanie testów ELISA na próbkach osocza i tkankach

Pobrane próbki osocza i tkanek wykorzystano do oznaczenia poziomu angiotensyny II (Ang II). Oznaczenia zostały wykonane za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA według instrukcji załączonych przez producenta (nr kat. EK-002-12, EIA Kit Human, Rat, Mouse, Canine, (range: 0-25 ng ml⁻¹), PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.) w Zakładzie Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie dzięki uprzejmości i pomocy zespołu kierowanego przez dr hab. n. med. Wojciecha Bika. Zgodnie z zaleceniami producenta przeprowadzono procedurę oczyszczania próbek osocza i tkanek na kolumnach ekstrakcyjnych SPE (ang. *solid phase extraction*).

Homogenizacja tkanek

Tkanki gotowano w 0,1 M kwasie octowym w 100 °C przez 20 min aby unieczynnić enzymy tkankowe. Aortę gotowano w objętości 0,5 ml 0,1 M kwasu octowego, natomiast pozostałe tkanki (serce, nerki) w 0,75 ml roztworu kwasu. Tkanki gotowano w 2-ml próbkach umieszczonych w styropianowych statywach. Następnie tkanki przenoszono na lód gdzie przeprowadzono mechaniczną homogenizację w homogenizatorach szklanych (mechaniczne ucieranie tkanek do całkowitego roztarcia). Gotowe homogenaty wirowano przez 15 min w 4 °C (1200 g). Osad odrzucano, a supernatant zbierano do próbek, aby przeprowadzić ekstrakcję na kolumnach SPE (ang. *solid phase extraction*).

Oczyszczanie osocza i tkanek na kolumnach ekstrakcyjnych SPE

W celu oczyszczenia osocza i tkanek z większych białek i zanieczyszczeń przed wykonaniem testu ELISA przeprowadzono procedurę oczyszczania osocza na kolumnach ekstrakcyjnych (nr kat. 7020-02, Bond Elut-PH, BAKERBOND spe Oktadecyl (C18); 3 mL, 200 mg) wykorzystując technikę SPE. Metoda ekstrakcji na kolumnach SPE polega na przepuszczeniu cieplej próbki przez złożę sorbentu i adsorpcji oznaczanych związków na tym złożu. Sorbentem na kolumnie SPE jest złożę krzemionkowe o dużej chłonności.

Osocze rozpuszczano w stosunku 1:1 z buforem ekstrakcyjnym A (nr kat: RK-BA-1, 1% kwasu trifluorooctowego, TFA), natomiast homogenaty tkanek rozpuszczono w buforze A w stosunku 1:3. Następnie wirowano próbki przez 20 min w 4 °C (1200 g). Osad odrzucano, a supernatant przenoszono na kolumny ekstrakcyjne uprzednio aktywowane 1 ml buforu

ekstrakcyjnego B (nr kat: RK-BB-1, ang. buffer B - 60% acetonitryl w 1% TFA), a następnie przemywano kolumny 3x3 ml buforu A. Po nałożeniu na złożę ekstrakcyjne próbek, kolumny ekstrakcyjne przemywano 2x3 ml buforu A. Po tym etapie następował etap wymycia Ang II (oznaczany peptyd) ze złoża, przemywając złożę kolumnienki 3 ml buforu B. Była to ostateczna selektywna izolacja Ang II ze złoża do probówek pod wpływem rozpuszczalnika jakim jest bufor B.

Gotowe ekstrakty odparowywano do sucha azotem technicznym (6.5 M3, Nord Gaz s.c., Warszawa, Polska) a następnie zamrażano w -80°C aż do wykonania testu ELISA.

4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano w programie STATISTICA (wersja 10, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). W tekście, tabelach i na rycinach przedstawiono średnie (*mean*) oraz błąd standardowy średniej (SEM, *Standard Error of the Mean*) jako miarę rozrzutu danych. Do oceny statystycznej profilów mierzonych zmiennych w czasie (wewnątrz jednej grupy) stosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów. Do porównania między grupami stosowano klasyczną odmianę ANOVA, a następnie zmodyfikowany test t Studenta dla zmiennych niezależnych lub test *post-hoc* Tukey'a. Za istotną statystycznie różnicę przyjmowano poziom istotności $p \leq 0,05$.

IV. Wyniki

1. Wpływ blokowania lokalnych szlaków powstawania Ang II za pomocą chymostatyny w poszczególnych zwierzęcych modelach nadciśnienia

1.1. Model nadciśnienia sodozależnego

1.1.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) i częstość skurczów serca (HR)

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian ciśnienia tętniczego krwi (5% tendencja do obniżenia MABP) i częstości skurczów serca (14% tendencja do obniżenia HR) w odpowiedzi na infuzję chymostatyny w modelu nadciśnienia zależnego od wysokiej podaży sodu (UNIX HS). Rozpuszczalnik chymostatyny również nie wpłynął na mierzone parametry (Tab. 1).

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) i osmolalność osocza (P_{osm})

Chymostatyna i jej rozpuszczalnik nie wpłynęły na P_{Na} w modelu UNIX HS. Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę spowodowało istotny aczkolwiek niespecyficzny (t.j. nie różniący się od działania rozpuszczalnika) 17% wzrost P_K (UNIX HS+CH: $4,9 \pm 0,4$ vs $4,0 \pm 0,4$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,001$); porównywalny 13% wzrost obserwowano także w odpowiedzi na infuzję rozpuszczalnika chymostatyny w grupie UNIX HS+C ($4,0 \pm 0,4$ vs $3,5 \pm 0,3$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,001$; Tab. 1).

1.1.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

W modelu nadciśnienia UNIX HS obserwowano obniżenie przepływu przez tętnicę biodrową i niespecyficzny wzrost IVR, zarówno po chymostatynie (43 ± 5 vs 31 ± 3 mmHg ml^{-1} ; $p < 0,05$) jak i w odpowiedzi na jej rozpuszczalnik (42 ± 8 vs 32 ± 5 mmHg ml^{-1} ; $p < 0,05$; Tab. 1).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

Nie zaobserwowano istotnych zmian w całkowitym przepływie krwi przez nerkę ani w RVR w modelu UNIX HS, zarówno w odpowiedzi na chymostatynę oraz jej rozpuszczalnik (Tab. 1).

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Przepływ przez korę (CBF) oraz przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF) nie zmienił się w żadnej z badanych grup. Natomiast blokowanie chymazy spowodowało specyficzne obniżenie

przepływu przez rdzeń wewnętrzny nerki (IMBF) w grupie UNX HS+CH (139 ± 31 vs 197 ± 36 PU; $p<0,05$; Ryc. 3, Tab. 1).

1.1.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

Nie zaobserwowano istotnych zmian w filtracji kłębuszkowej w modelu UNX HS, zarówno w odpowiedzi na chymostatynę jak i jej rozpuszczalnik (Tab. 1).

Wydalanie: moczu ($V g^{-1}$), sodu ($U_{Na}V g^{-1}$), potasu ($U_KV g^{-1}$) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V g^{-1}$)

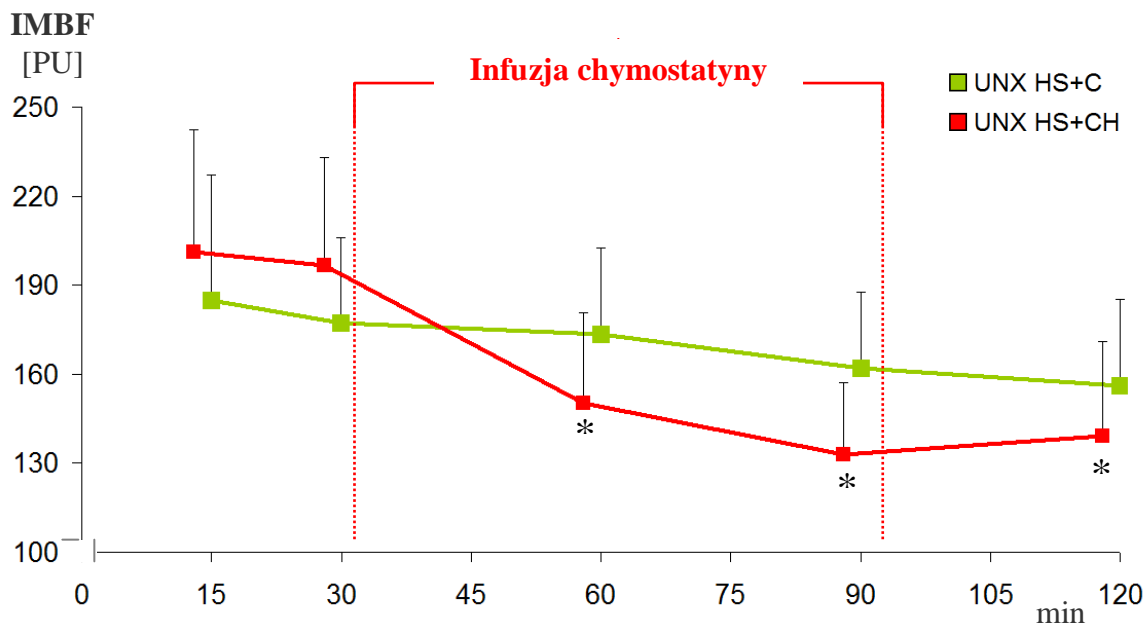
Nie było zmian w wydalaniu moczu oraz w wydalaniu sodu w żadnej z badanych grup. Po infuzji chymostatyny istotnie wzrósł poziom $U_KV g^{-1}$ (UNX HS+CH: $0,8\pm 0,2$ vs $0,6\pm 0,2 \mu\text{mol min}^{-1} g^{-1}$; $p<0,05$), podobną reakcję zaobserwowano w odpowiedzi na rozpuszczalnik w grupie kontrolnej (UNX HS+C; Ryc. 4); wydaje się, że ta zmiana zależy od rozpuszczalnika chymostatyny. Zaobserwowano 29% obniżenie $U_{osm}V g^{-1}$ w odpowiedzi na rozpuszczalnik chymostatyny ($7,5\pm 1,7$ vs $10,2\pm 1,4 \mu\text{Osm min}^{-1} g^{-1}$; $p<0,05$) w grupie kontrolnej, z kolei blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę przeciwdziało takiemu spadkowi (5% obniżenie: $6,2\pm 0,4$ vs $8,1\pm 2,1 \mu\text{Osm min}^{-1} g^{-1}$; NS; Ryc. 5).

1.1.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

W grupie z infuzją chymostatyny (UNX HS+CH) zaobserwowano dziesięciokrotnie niższy poziom Ang II w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną ($0,13\pm 0,01$ vs $1,36\pm 0,39 \text{ ng ml}^{-1}$; $p<0,05$; Ryc. 6).

W modelu UNX HS wysoki poziom Ang II stwierdzono w nerce (UNX HS+C: $6,45\pm 0,83 \text{ ng g}^{-1}$), natomiast najniższe stężenie stwierdzono w sercu (UNX HS+C: $0,26\pm 0,07 \text{ ng g}^{-1}$).

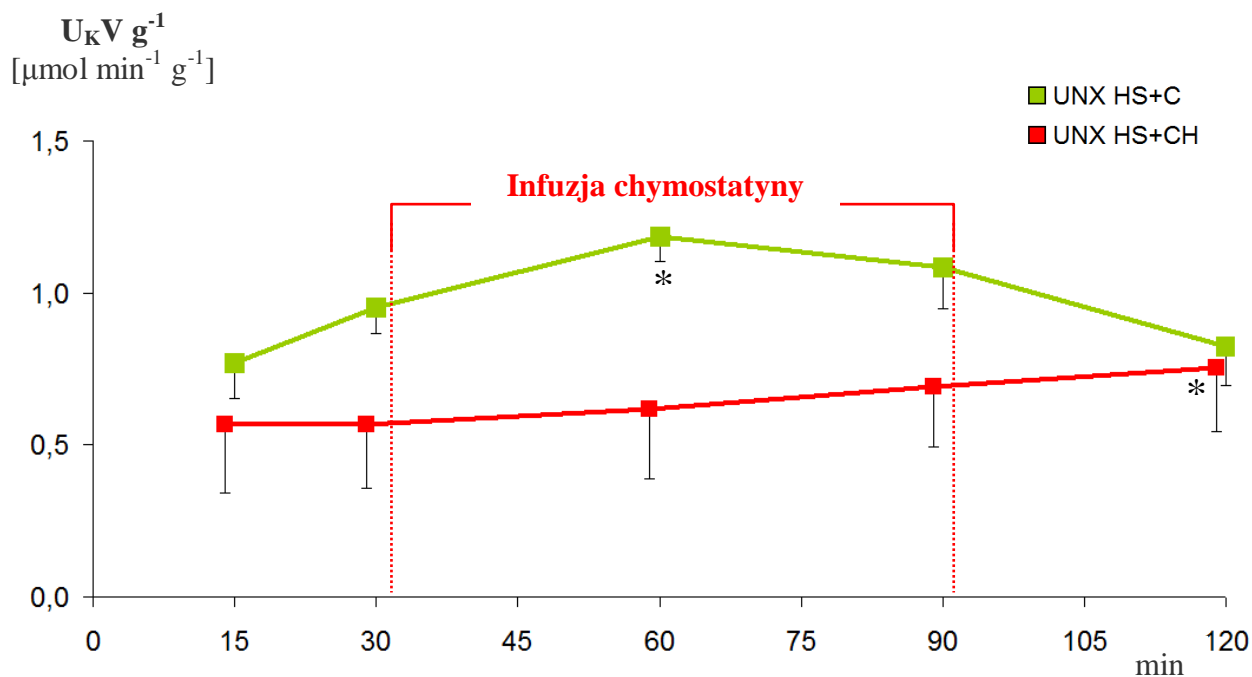
W grupie z infuzją chymostatyny zaobserwowano dwukrotnie niższy poziom Ang II w nerce w porównaniu z grupą, w której podawano rozpuszczalnik ($3,39\pm 0,55$ vs $6,45\pm 0,83 \text{ ng g}^{-1}$; $p<0,05$), natomiast chymostatyna nie zmieniła poziomu Ang II w pozostałych badanych tkankach (serce: $0,38\pm 0,06$ vs $0,26\pm 0,07 \text{ ng g}^{-1}$ w grupie kontrolnej; NS oraz aorta: $5,28\pm 1,27$ vs $4,88\pm 0,85 \text{ ng g}^{-1}$ w grupie kontrolnej; NS).



Ryc. 3. Zmiany przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki (IMBF) u szczurów otrzymujących chymostatynę (UNX HS+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (UNX HS+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy UNX HS+CH n=5; UNX HS+C n=8.

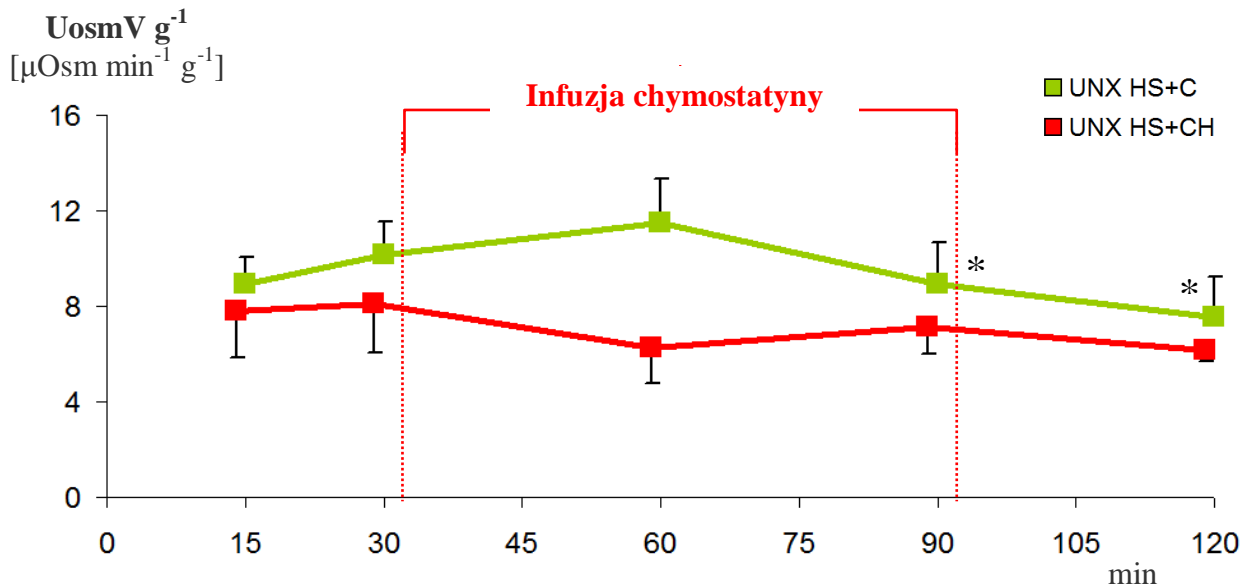
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 4. Zmiany wydalania potasu w moczu ($U_K V g^{-1}$) u szczurów otrzymujących chymostatynę (UNX HS+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (UNX HS+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy UNX HS+CH n=7; UNX HS+C n=7.

* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



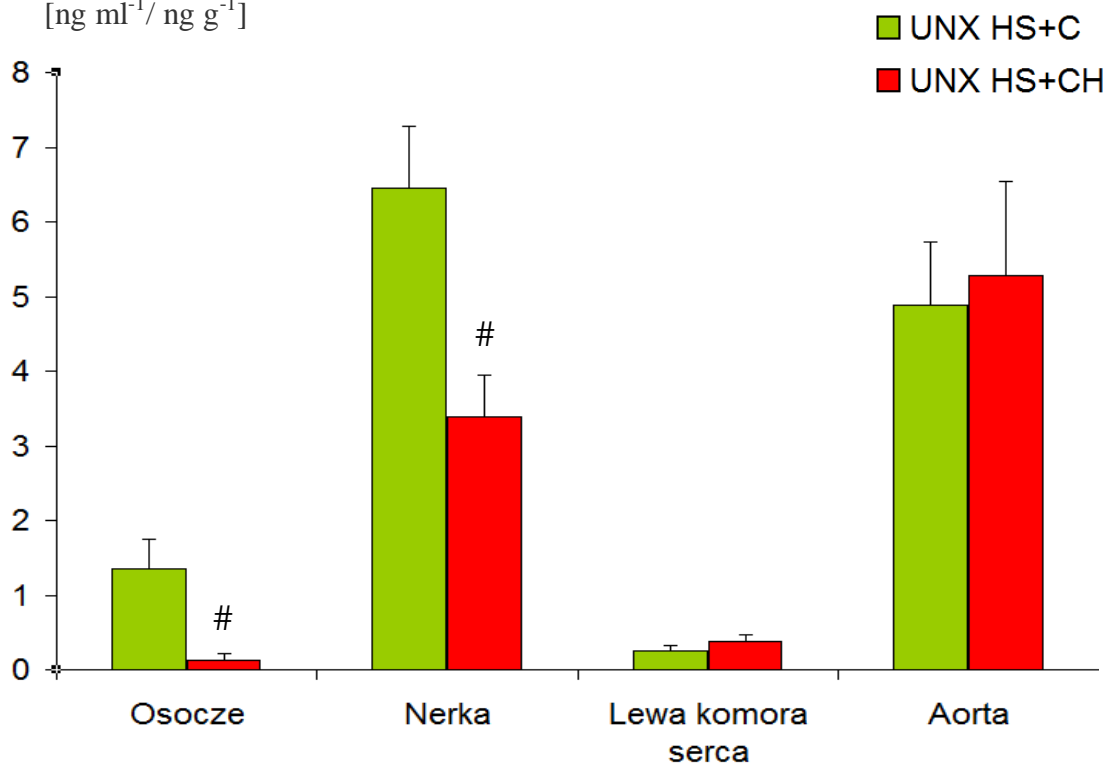
Ryc. 5. Zmiany wydalania substancji osmotycznie czynnych w moczu (UosmV g^{-1}) u szczurów otrzymujących chymostatynę (UNX HS+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (UNX HS+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy UNX HS+CH $n=5$; UNX HS+C $n=7$.

* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej.

Stężenie Ang II

[$\text{ng ml}^{-1} / \text{ng g}^{-1}$]



Ryc. 6. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml^{-1}) i w tkankach (ng g^{-1}) u szczurów otrzymujących chymostatynę (UNX HS+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (UNX HS+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy UNX HS+CH $n=5-6$; UNX HS+C $n=5$.

– znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy $p<0,05$ lub mniej.

1.2. Model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego (tzw. model Goldblatta)

1.2.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) i częstość skurczów serca (HR)

W naczyniowo-nerkowym modelu nadciśnienia nie obserwowano zmian ciśnienia krwi tętniczej w odpowiedzi na blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę. Infuzja chymostatyny istotnie obniżyła częstość skurczów serca (3% obniżenie; $p < 0,05$) w grupie 2K1C+CH, jednak efekt zanikł w okresie po odstawieniu chymostatyny; podobny kierunek zmian (7% obniżenie; $p < 0,05$) HR obserwowano w grupie z rozpuszczalnikiem chymostatyny (Tab. 1).

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) i osmolalność osocza (P_{osm})

Zarówno chymostatyna jak i jej rozpuszczalnik nie wpłynęły istotnie na parametry osocza (P_{Na} oraz P_{osm}) w modelu 2K1C, jedyna obserwowana zmiana dotyczyła stężenia potasu w osoczu. W grupie 2K1C+CH blokowanie chymazy spowodowało 18% wzrost P_K ($4,4 \pm 0,2$ vs $3,7 \pm 0,2$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,001$). Wzrost ten był niespecyficzny ponieważ obserwowano go również w odpowiedzi na rozpuszczalnik chymostatyny (8% wzrost: stężenie potasu w osoczu $4,3 \pm 0,4$ vs $3,9 \pm 0,3$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,05$; Tab. 1).

1.2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

W tym typie nadciśnienia obserwowano niespecyficzne obniżenie IBF, zarówno po chymostatynie ($3,1 \pm 0,3$ vs $4,5 \pm 0,6$ $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$; $p < 0,01$) jak i w odpowiedzi na jej rozpuszczalnik ($3,4 \pm 0,3$ vs $4,0 \pm 0,4$ $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$; $p < 0,05$). W modelu 2K1C w odpowiedzi na chymostatynę istotnie wzrósł opór naczyniowy w obszarze krążenia zaopatrywanym przez tętnicę biodrową (IVR; 53 ± 6 vs 40 ± 6 $\text{mmHg ml}^{-1} \text{min}^{-1}$; $p < 0,01$), natomiast rozpuszczalnik nie wpłynął na IVR (Ryc. 7).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

W modelu 2K1C obserwowano niespecyficzne obniżenie RBF, zarówno po chymostatynie ($6,8 \pm 0,9$ vs $8,2 \pm 0,8$ $\text{ml min}^{-1} \text{g}^{-1}$; $p < 0,05$), jak i w odpowiedzi na jej rozpuszczalnik ($8,8 \pm 1,4$ vs $9,5 \pm 1,3$ $\text{ml min}^{-1} \text{g}^{-1}$; $p < 0,01$). Natomiast opór naczyniowy w krążeniu nerkowym wzrósł specyficznym w odpowiedzi na chymostatynę (+26%, 53 ± 9 vs 35 ± 2 $\text{mmHg ml}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$; $p = 0,058$); rozpuszczalnik nie wpłynął na ten parametr (Ryc. 7).

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Nie zaobserwowano istotnych zmian w przepływie przez korę nerki (CBF) w modelu 2K1C (Tab. 1). Wystąpiły natomiast zmiany w perfuzji głębszych warstw nerki. W tym modelu zarówno chymostatyna (203 ± 14 vs 252 ± 12 PU; $p < 0,01$) jak i jej rozpuszczalnik (218 ± 27 vs 234 ± 28 PU; $p < 0,05$) istotnie obniżyły przepływ przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF). Co więcej, blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę spowodowało istotne 8% obniżenie przepływu przez rdzeń wewnętrzny nerki (169 ± 19 vs 193 ± 25 PU; $p = 0,05$), podczas gdy infuzja rozpuszczalnika nie wpłynęła na IMBF (Ryc. 8).

Wydaje się, że obserwowane zmiany w przepływach wewnątrznerkowych nie są zależne od zmian w ciśnieniu krwi, ponieważ ten ostatni parametr nie uległ zmianom w trakcie doświadczenia (Tab. 1).

1.2.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

Nie zaobserwowano istotnych zmian GFR w modelu 2K1C (Tab. 1). W odpowiedzi na infuzję chymostatyny zaobserwowano jedynie tendencję do obniżenia GFR (19% obniżenie: $1,05 \pm 0,40$ vs $1,14 \pm 0,29$ ml min⁻¹; NS). Rozpuszczalnik chymostatyny nie wpłynął na badany parametr ($1,60 \pm 0,20$ vs $1,70 \pm 0,40$ ml min⁻¹; NS).

Wydalanie: moczu (V g⁻¹), sodu ($U_{Na}V$ g⁻¹), potasu (U_KV g⁻¹) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$ g⁻¹)

Chymostatyna nie wpłynęła istotnie na parametry wydalnicze nerki w modelu 2K1C (Tab. 1). Jedyne zmiany dotyczyły wpływu rozpuszczalnika chymostatyny, który istotnie obniżył $U_{osm}V$ g⁻¹ (25% spadek: $7,6 \pm 1,6$ vs $9,5 \pm 1,1$ μ Osm min⁻¹g⁻¹; $p < 0,05$), natomiast chymostatyna (2K1C+CH) przeciwdziałała takiemu obniżeniu ($3,2 \pm 1,0$ vs $3,4 \pm 0,7$ μ Osm min⁻¹g⁻¹).

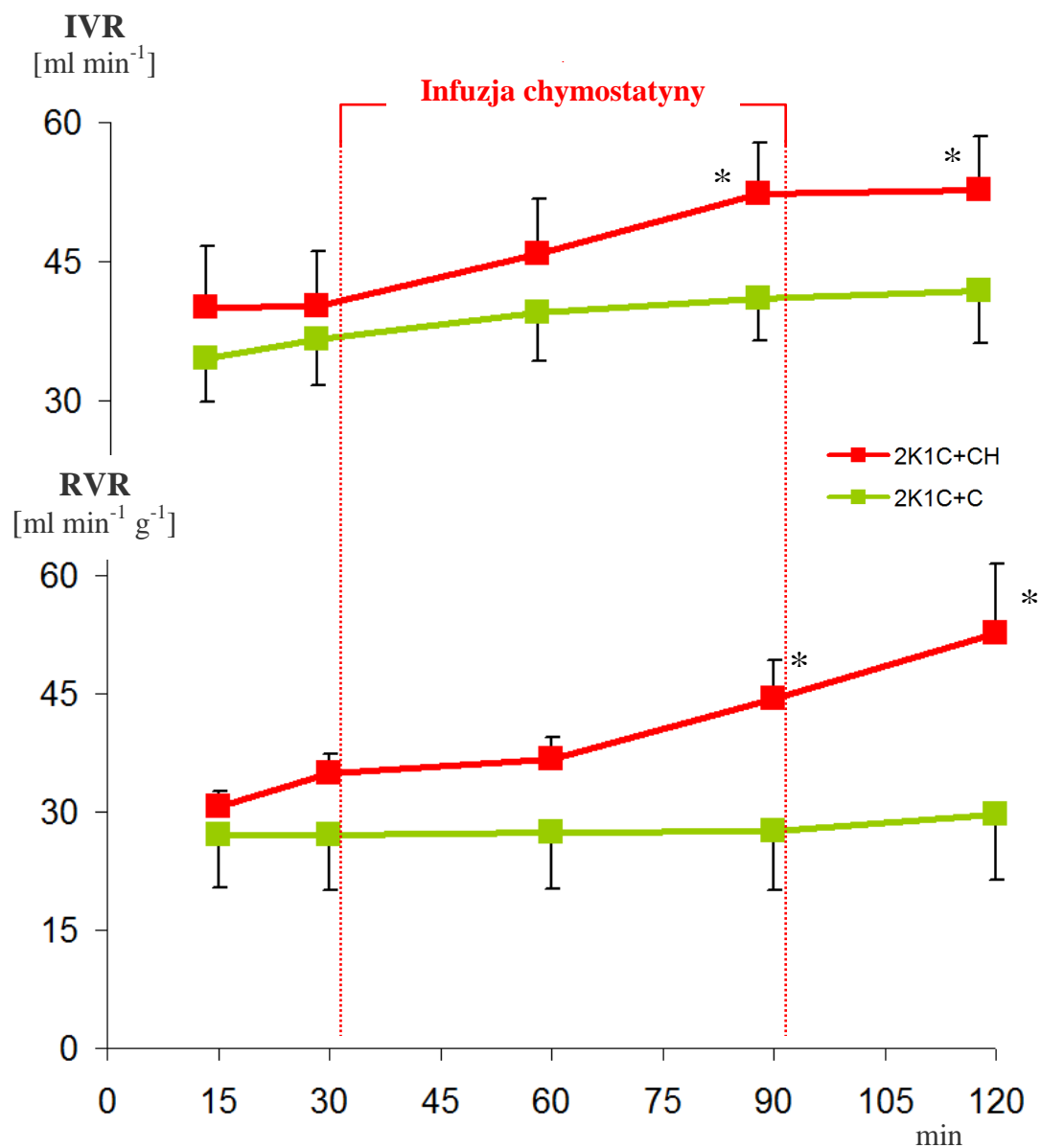
1.2.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

Po zablokowaniu niezależnego od ACE szlaku syntezy Ang II zaobserwowano istotnie niższe stężenie tego hormonu w osoczu w grupie 2K1C+CH w porównaniu z grupą kontrolną ($0,75 \pm 0,13$ vs $2,28 \pm 0,40$ ng ml⁻¹; $p < 0,01$; Ryc. 9).

Najwyższe stężenie Ang II w modelu 2K1C zaobserwowano w nerce (2K1C+C: $38,52 \pm 1,79$ ng g⁻¹), natomiast najniższe stężenie Ang II charakteryzowało serce (2K1C+C: $3,86 \pm 0,95$ ng g⁻¹).

Po zablokowaniu enzymów wrażliwych na chymostatynę zaobserwowano istotny, prawie sześciokrotnie niższy poziom Ang II w nerce w grupie 2K1C+CH w porównaniu z grupą kontrolną 2K1C+C ($6,77 \pm 4,91$ vs $38,52 \pm 1,79$ ng g⁻¹; $p < 0,001$), taki sam efekt (dziesięciokrotnie niższy

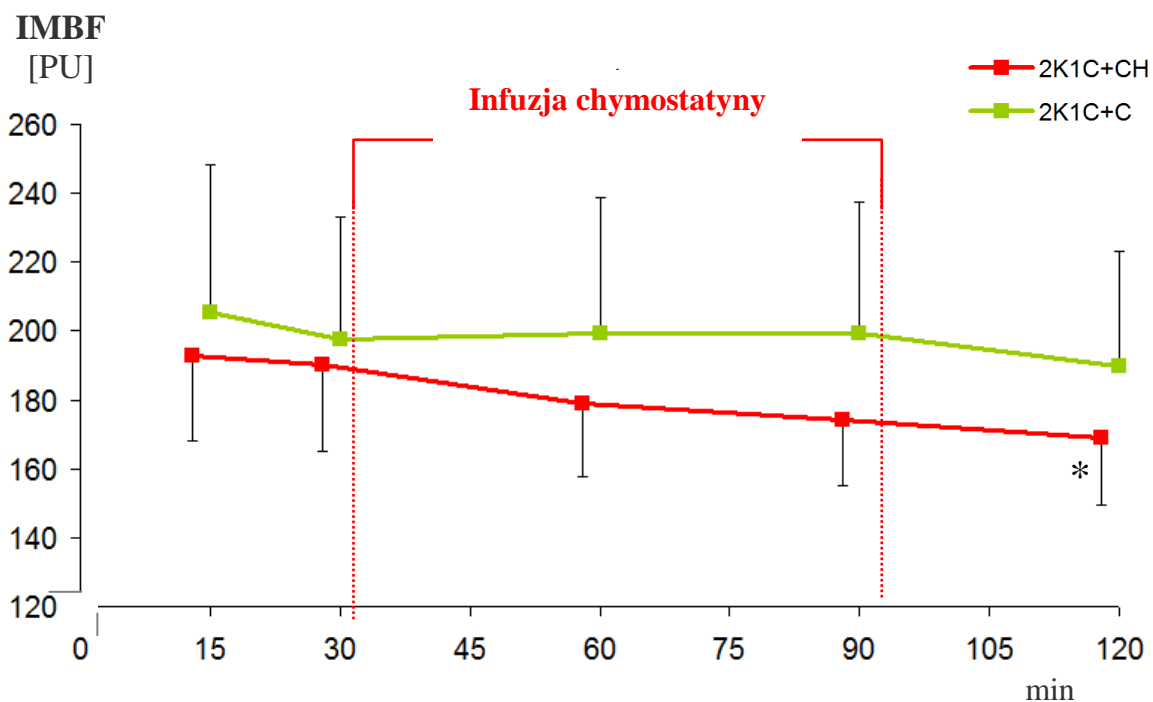
poziom peptydu w grupie 2K1C+CH) obserwowano w sercu ($0,40 \pm 0,06$ vs $3,86 \pm 0,95$ ng g⁻¹; $p < 0,05$). W aorcie nie było istotnych różnic w stężeniu Ang II między grupą z infuzją chymostatyny (2K1C+CH: $8,50 \pm 2,23$ ng g⁻¹) a grupą otrzymującą jej rozpuszczalnik (2K1C+C: $6,28 \pm 1,18$ ng g⁻¹).



Ryc. 7. Zmiany oporu naczyniowego w obszarze krążenia zaopatrywanym przez tętnicę biodrową (IVR) oraz w oporze naczyniowym nerki (RVR) u szczurów otrzymujących chymostatynę (2K1C+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (2K1C+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy 2K1C+CH n=6-9; 2K1C+C n=6-9.

* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



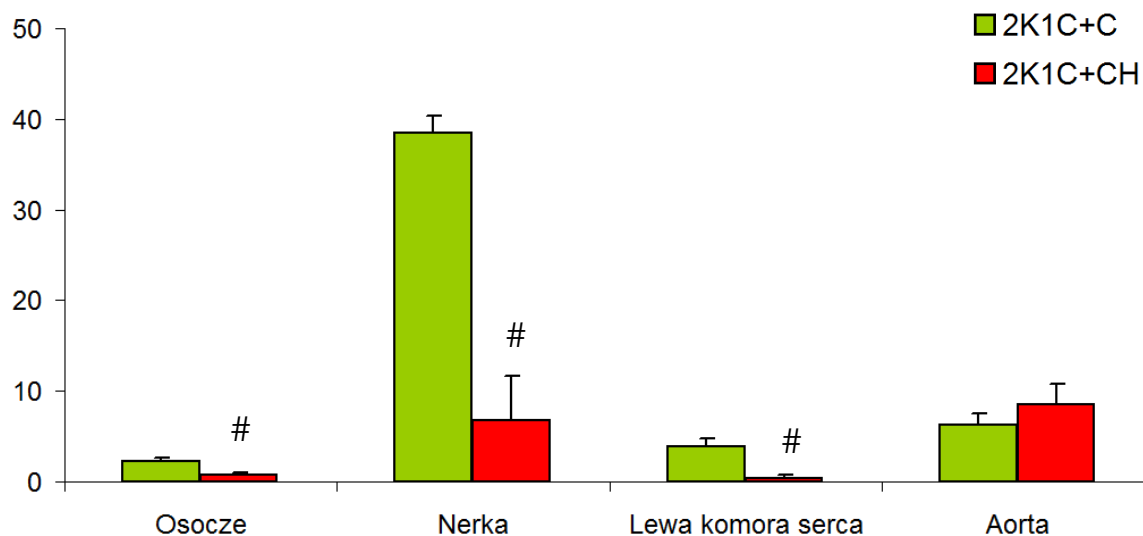
Ryc. 8. Zmiany przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki (IMBF) u szczurów otrzymujących chymostatynę (2K1C+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (2K1C+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy 2K1C+CH n=8; 2K1C+C n=6.

* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.

Stężenie Ang II

[ng ml⁻¹/ ng g⁻¹]



Ryc. 9. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml⁻¹) i w tkankach (ng g⁻¹) u szczurów otrzymujących chymostatynę (2K1C+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (2K1C+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy 2K1C+CH n=6-8; 2K1C+C n=5-6.

– znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy $p < 0,05$ lub mniej.

1.3. Model nadciśnienia o podłożu genetycznym (SHR)

1.3.1. Szczury SHR w fazie rozwoju nadciśnienia

1.3.1.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) i częstość skurczów serca (HR)

W genetycznym modelu nadciśnienia u szczurów SHR w fazie rozwoju nadciśnienia nie było zmian w ciśnieniu tętniczym krwi w odpowiedzi na blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę. Młode, 7-tygodniowe szczury SHR miały średnie ciśnienie tętnicze na poziomie 127 ± 4 mmHg (SHR 7+C; Tab. 2).

Nie było także różnic w częstości skurczów serca między grupami w tym modelu nadciśnienia (Tab. 2).

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) i osmolalność osocza (P_{osm})

Infuzja chymostatyny (SHR7+CH) nie wpłynęła istotnie na P_K , ale zaobserwowano istotny wzrost wartości P_{Na} w tej grupie szczurów (144 ± 3 vs 139 ± 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,01$); zmianę obserwowano po odstawieniu chymostatyny. Rozpuszczalnik chymostatyny nie wpłynął na stężenie sodu w osoczu (137 ± 1 vs 137 ± 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$; NS; Ryc. 10).

Rozpuszczalnik nie wpłynął na większość parametrów osocza, natomiast podwyższył istotnie P_K (43% wzrost: $4,7 \pm 0,4$ vs $3,4 \pm 0,3$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,05$). Wzrost P_K obserwowano już pod koniec infuzji rozpuszczalnika i efekt utrzymał się także po jego odstawieniu. Natomiast w grupie otrzymującej chymostatynę (SHR 7+CH) obserwowano jedynie tendencję wzrostową (28%) w odniesieniu do stężenia potasu w osoczu ($4,6 \pm 0,4$ vs $3,8 \pm 0,4$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; NS; Ryc. 10).

Nie było zmian w P_{osm} w żadnej z badanych grup (Tab. 2).

1.3.1.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

Na etapie rozwoju nadciśnienia (SHR 7) obserwowano niespecyficzne obniżenie IBF, zarówno po chymostatynie (28% obniżenie: $1,7 \pm 0,3$ vs $2,4 \pm 0,4$ ml min^{-1} ; $p < 0,001$) jak i w odpowiedzi na jej rozpuszczalnik (19% obniżenie: $1,8 \pm 0,3$ vs $2,2 \pm 0,3$ ml min^{-1} ; $p < 0,01$; Tab. 2).

W modelu SHR 7 istotnie wzrósł opór naczyniowy w obszarze krążenia zaopatrywanym przez tętnicę biodrową, zarówno w odpowiedzi na chymostatynę (IVR; 83 ± 12 vs 60 ± 8 $\text{mmHg ml}^{-1} \text{min}^{-1}$; $p < 0,01$) jak i jej rozpuszczalnik (76 ± 9 vs 62 ± 7 $\text{mmHg ml}^{-1} \text{min}^{-1}$; $p < 0,05$). SHR 7 charakteryzowały się bardzo dużymi wartościami oporu naczyniowego w krążeniu kończyny dolnej

(IVR), które były ok. dwukrotnie wyższe niż opór w pozostałych modelach eksperymentalnych (UNX HS oraz 2K1C; Tab. 1, 2).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

W grupie kontrolnej (SHR7+C) obserwowano 29% istotne obniżenie RBF ($2,0 \pm 0,4$ vs $2,9 \pm 0,4$ ml min⁻¹ g⁻¹; $p < 0,05$), natomiast chymostatyna przeciwdziałała tym zmianom utrzymując RBF na stałym poziomie (SHR7+CH: $3,6 \pm 0,5$ vs $3,6 \pm 0,5$ ml min⁻¹ g⁻¹; NS).

Nie było zmian w oporze naczyniowym nerki w żadnej z grup (Tab. 2).

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Nie było istotnych zmian w przepływie przez korę nerki (CBF) w modelu SHR7. Zmiany wystąpiły w rdzeniu zewnętrznym nerki (OMBF). Chymostatyna istotnie obniżyła przepływ przez rdzeń zewnętrzny nerki (11% obniżenie: 275 ± 32 vs 311 ± 35 PU; $p < 0,01$), natomiast rozpuszczalnik nie wpłynął na OMBF (226 ± 38 vs 246 ± 34 PU; NS; Ryc. 12). Po infuzji chymostatyny obserwowano także izolowaną tendencję do obniżenia przepływu krwi przez drugi z badanych obszarów, rdzeń wewnętrzny nerki (11% obniżenie: 215 ± 32 vs 264 ± 58 PU; NS). Rozpuszczalnik pozostał bez wpływu na IMBF (272 ± 41 vs 299 ± 33 PU; NS).

Mimo znamienności statystycznych dla zmian po chymostatynie, nie wydają się one mieć istotnego znaczenia fizjologicznego w porównaniu do zmian po rozpuszczalniku (Tab. 2).

1.3.1.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

Zarówno chymostatyna (27% obniżenie: $0,25 \pm 0,03$ vs $0,34 \pm 0,04$ ml min⁻¹; $p < 0,05$) jak i jej rozpuszczalnik (44% obniżenie: $0,26 \pm 0,09$ vs $0,46 \pm 0,10$ ml min⁻¹; $p < 0,05$) istotnie obniżyły GFR u 7-tygodniowych szczurów SHR; obniżenie obserwowane było w trakcie infuzji chymostatyny/rozpuszczalnika i utrzymało się po jej odstawieniu (Ryc. 13).

Wydalanie: moczu (V g⁻¹), sodu ($U_{Na}V$ g⁻¹), potasu (U_KV g⁻¹) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$ g⁻¹)

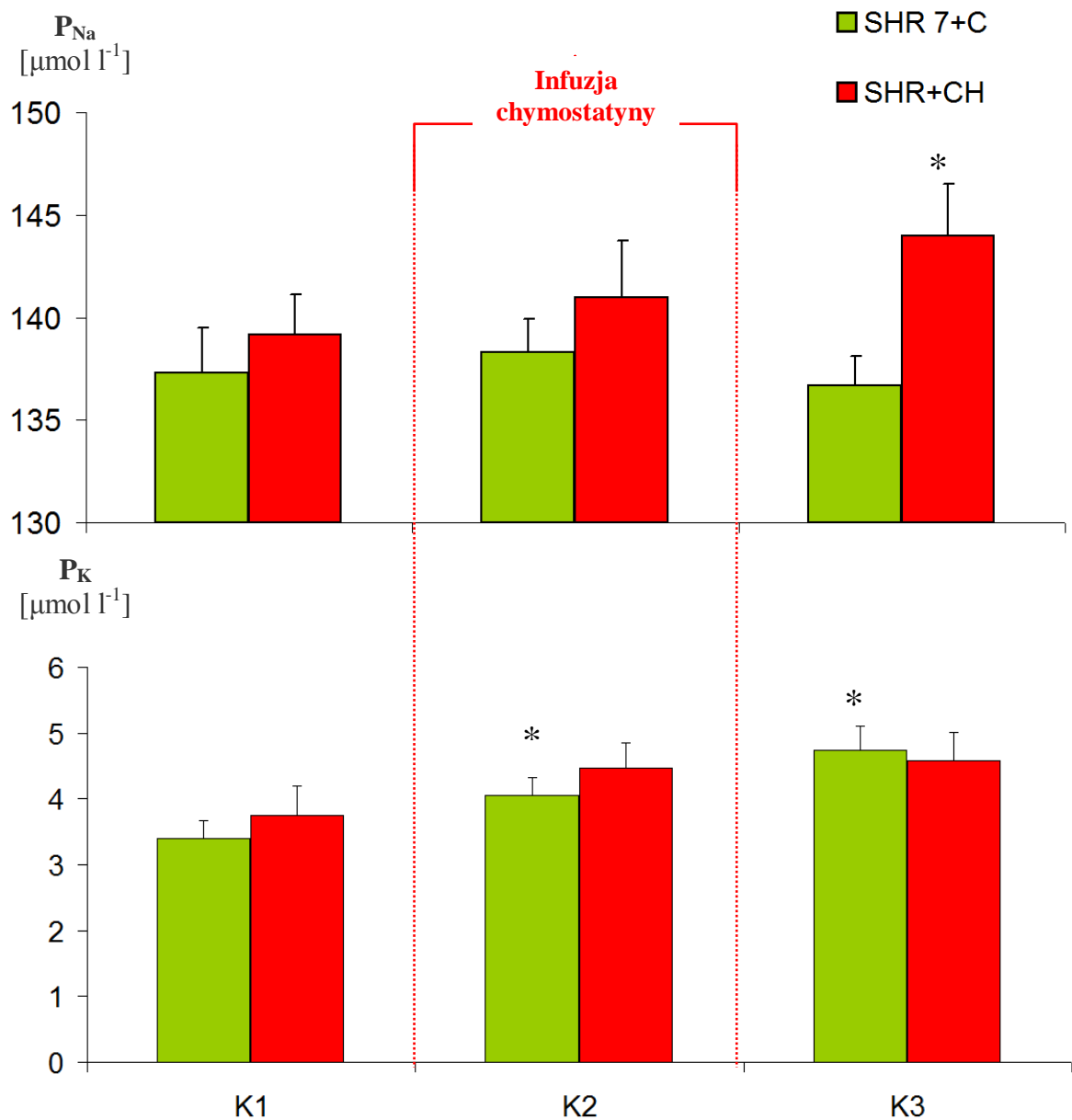
Chymostatyna oraz jej rozpuszczalnik nie wpłynęły istotnie na parametry wydalnicze nerki w modelu SHR7. Zaobserwowano jedynie bliską istotności tendencję do obniżenia $U_{osm}V$ g⁻¹ w obu grupach: w grupie SHR7+CH (30% obniżenie: $2,1 \pm 0,2$ vs $3,3 \pm 0,5$ μ Osm min⁻¹g⁻¹; $p = 0,08$) oraz w grupie kontrolnej, SHR7+C (42% obniżenie: $1,7 \pm 0,5$ vs $2,9 \pm 0,2$ μ Osm min⁻¹g⁻¹; $p = 0,06$; Tab. 2).

1.3.1.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

Nie było zmian w poziomie Ang II w osoczu u szczurów SHR 7. Blokowanie tkankowego RAAS wydaje się nie mieć wpływu na poziom krążącej Ang II u 7-tygodniowych szczurów SHR w fazie rozwijania nadciśnienia (Ryc. 14).

Istotnie statystycznie różnice w modelu SHR 7 w poziomie Ang II lokalnie (w tkankach) zaobserwowano jedynie w sercu. Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę w grupie SHR7+CH skutkowało prawie dwukrotnie niższym poziomem Ang II w sercu niż w grupie otrzymującej rozpuszczalnik ($0,19 \pm 0,01$ vs $0,35 \pm 0,03$ ng g⁻¹; $p < 0,01$).

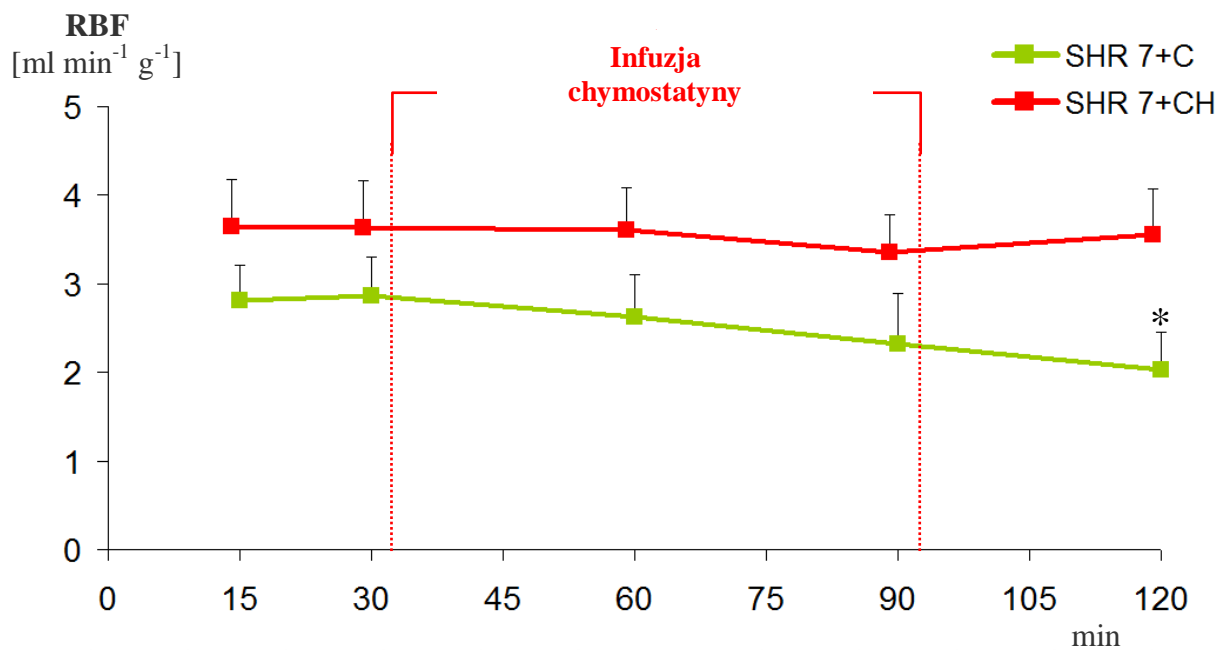
W pozostałych tkankach nie było istotnych statystycznie zmian. Nerkę charakteryzował wysoki poziom Ang II w obu grupach (SHR7+C: $25,96 \pm 5,59$ ng g⁻¹; SHR7+CH: $19,90 \pm 2,72$ ng g⁻¹). W grupie otrzymującej chymostatynę (SHR 7+CH) poziom Ang II w aorcie był o ok. 1/3 niższy niż w grupie kontrolnej ($8,14 \pm 0,55$ vs $13,36 \pm 3,74$ ng g⁻¹; NS) w porównaniu z grupą eksperymentalną, ale różnica nie osiągnęła istotności statystycznej (Tab. 2).



Ryc. 10. Zmiany stężenia sodu (P_{Na}) i potasu (P_K) w osoczu u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 7+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 7+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+CH $n=6$; SHR 7+C $n=5$.

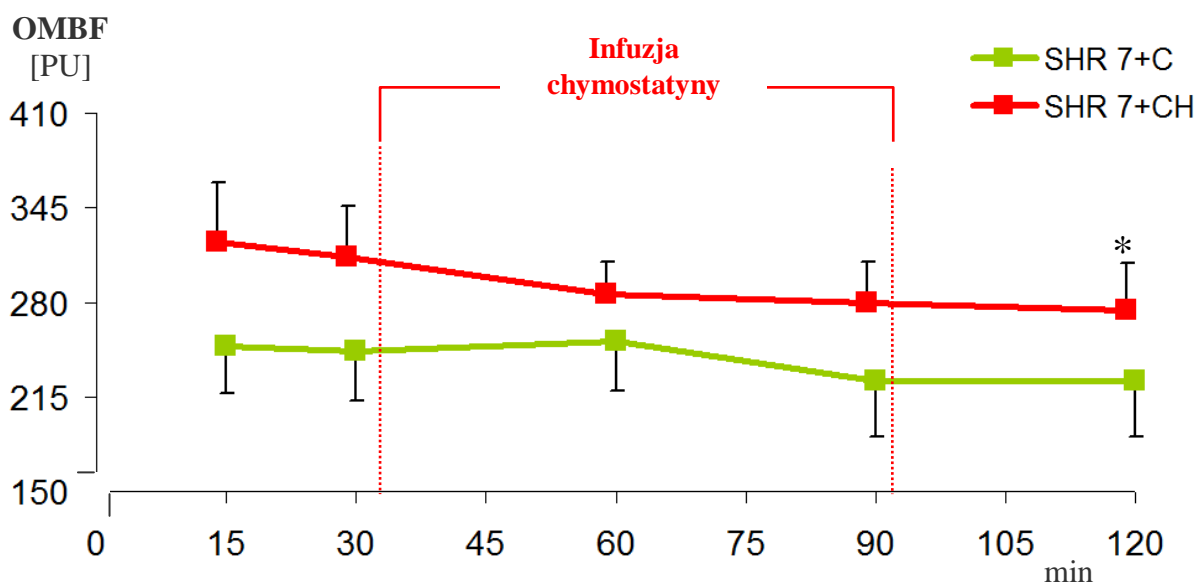
* – znamienne różnie od wartości w okresie kontrolnym (K1) przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 11. Zmiany w całkowitym przepływie krwi przez nerkę (RBF) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 7+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 7+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+CH n=7; SHR 7+C n=7.

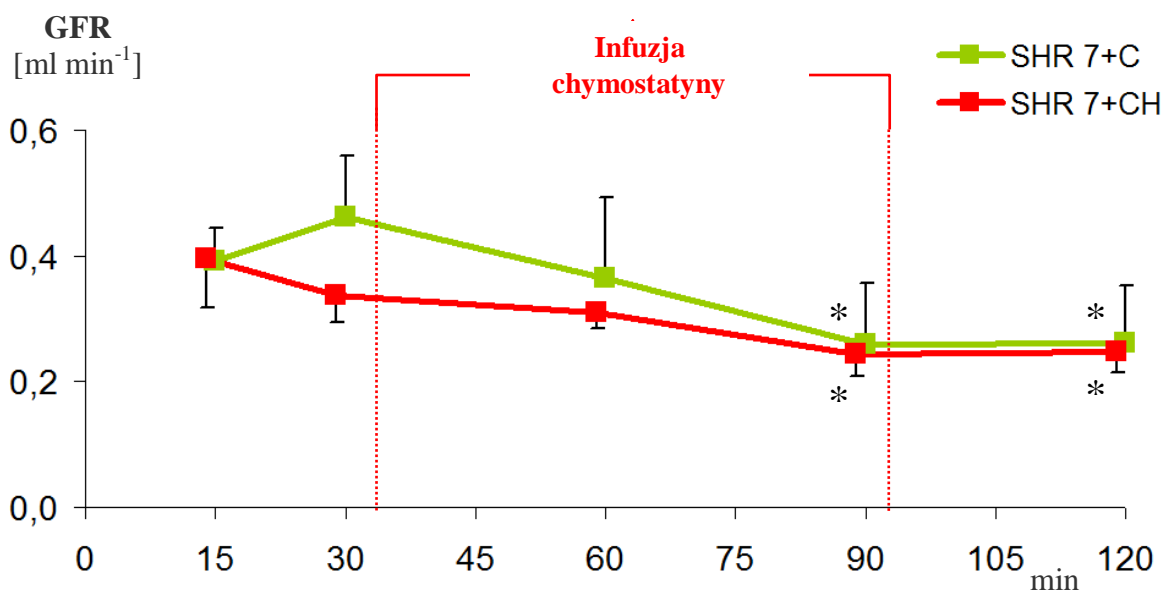
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 12. Zmiany przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 7+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 7+C).

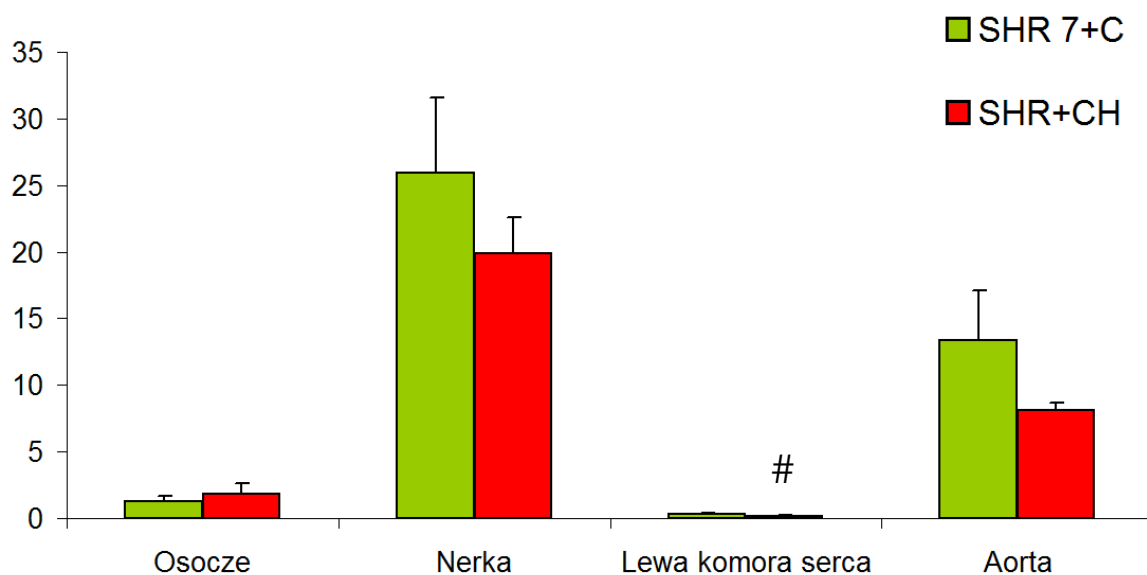
Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+CH n=8; SHR 7+C n=7.

* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 13. Zmiany filtracji kłębuszkowej (GFR) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 7+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 7+C). Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+CH $n=7$; SHR 7+C $n=5$.
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej.

Stężenie Ang II [ng ml⁻¹/ ng g⁻¹]



Ryc. 14. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml⁻¹) i w tkankach (ng g⁻¹) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 7+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 7+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+CH $n=6-8$; SHR 7+C $n=5-6$.

– znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy $p<0,05$ lub mniej.

1.3.2. Szczury SHR w fazie ustalonego nadciśnienia

1.3.2.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) i częstość skurczów serca (HR)

U szczurów SHR w fazie ustalonego nadciśnienia doszło do 6% obniżenia ciśnienia tętniczego krwi w odpowiedzi na blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę (Ryc. 15). Obniżenie MABP obserwowano dopiero w 30 minucie po zakończeniu infuzji chymostatyny (145 ± 5 vs 154 ± 5 mmHg; $p < 0,05$). Rozpuszczalnik chymostatyny nie wpłynął na MABP (149 ± 4 vs 152 ± 5 mmHg; NS). Szczury SHR 16 osiągały średnie wartości ciśnienia na poziomie 154 ± 5 mmHg (MABP, SHR 16+C; Tab. 2).

Obniżenie ciśnienia tętniczego krwi nie zależało od zmian HR; nie obserwowano też zmian w częstości skurczów serca w zależności od rozpuszczalnika (Tab. 2).

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) i osmolalność osocza (P_{osm})

Nie było zmian w poziomie stężenia sodu w osoczu (P_{Na}) w żadnej z grup (Tab. 2). U szczurów SHR w utrwalonej fazie nadciśnienia niespecyficznie wzrósł poziom potasu w osoczu (P_K), zarówno po zablokowaniu chymazy ($4,4 \pm 0,1$ vs $3,7 \pm 0,2$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,05$) jak i w odpowiedzi na rozpuszczalnik ($4,2 \pm 0,2$ vs $3,9 \pm 0,2$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,05$; Ryc. 16). Co istotne, chymostatyna spowodowała ponad dwukrotnie większy (19%) wzrost P_K niż rozpuszczalnik (8%; NS). Nie było zmian w osmolalności osocza w żadnej z grup (Tab. 2).

1.3.2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

Zarówno chymostatyna jak i jej rozpuszczalnik nie wpłynęły na IBF. Nie obserwowano zmian w oporze naczyniowym w obszarze krążenia zaopatrywanym przez tętnicę biodrową w żadnej z badanych grup (Tab. 2).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

W grupie SHR 16+CH obserwowano istotne 15% obniżenie RBF ($4,8 \pm 0,9$ vs $5,6 \pm 0,9$ $\text{ml min}^{-1} \text{g}^{-1}$; $p < 0,05$), podczas gdy rozpuszczalnik pozostawał bez wpływu na RBF ($7,7 \pm 0,6$ vs $8,4 \pm 0,8$ $\text{ml min}^{-1} \text{g}^{-1}$; NS; Ryc. 17). Nie było zmian w oporze naczyniowym nerki w żadnej z badanych grup (Tab. 2).

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Podobnie jak u szczurów SHR 7, w modelu SHR 16 nie zaobserwowano istotnych zmian w przepływie przez korę nerki (CBF). Zmiany wystąpiły w rdzeniu zewnętrznym nerki (OMBF;

Ryc. 18). Chymostatyna spowodowała 15% obniżenie przepływu przez rdzeń zewnętrzny nerki (172 ± 19 vs 207 ± 24 PU; $p < 0,05$), zmiana wystąpiła już po odstawieniu substancji. Choć rozpuszczalnik podwyższył o 5% OMBF (265 ± 19 vs 252 ± 17 PU; $p < 0,05$), zmiana ta była jedynie przejściowa i efekt zanikł po odstawieniu rozpuszczalnika (253 ± 18 vs 252 ± 17 PU, NS). W konsekwencji nie było różnic w końcowym efekcie chymostatyny i jej rozpuszczalnika na wartości OMBF (Ryc. 18). W wyniku infuzji rozpuszczalnika obserwowano silną 13% tendencję do wzrostu przepływu przez rdzeń wewnętrzny nerki (234 ± 20 vs 209 ± 17 PU; $p = 0,08$), natomiast chymostatyna nie wpłynęła na IMBF (148 ± 27 vs 156 ± 31 PU; NS; Tab. 2).

1.3.2.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

16-tygodniowe szczury SHR w odpowiedzi na chymostatynę zareagowały 28% obniżeniem GFR ($0,4 \pm 0,1$ vs $0,6 \pm 0,1$ ml min⁻¹; $p < 0,05$), podczas gdy rozpuszczalnik nie wpłynął na poziom filtracji kłębuszkowej ($0,6 \pm 0,2$ vs $0,8 \pm 0,2$ ml min⁻¹; NS; Ryc. 19).

Wydalanie: moczu (V g⁻¹), sodu ($U_{Na}V$ g⁻¹), potasu (U_KV g⁻¹) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$ g⁻¹)

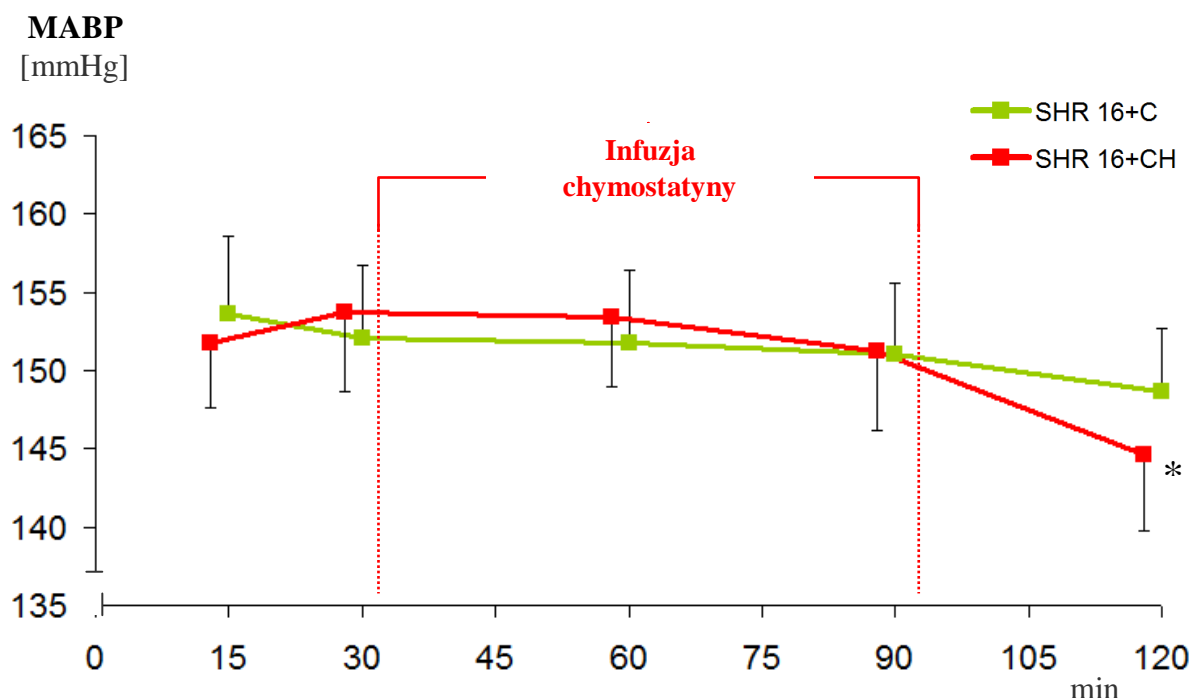
Blokowanie chymazy spowodowało obniżenie diurezy oraz wydalania sodu w modelu SHR 16. W grupie SHR 16+CH zaobserwowano istotny statystycznie 42% spadek V g⁻¹ ($1,8 \pm 0,3$ vs $3,4 \pm 0,6$ μ l min⁻¹ g⁻¹; $p < 0,05$; Ryc. 20). W tej grupie blokowanie chymazy spowodowało także istotne 76% obniżenie $U_{Na}V$ g⁻¹ ($0,10 \pm 0,03$ vs $0,42 \pm 0,04$ μ mol min⁻¹ g⁻¹; $p < 0,001$; Ryc. 21). Zaobserwowano także silną 36% tendencję do obniżenia $U_{osm}V$ g⁻¹ w odpowiedzi na chymostatynę ($2,0 \pm 0,6$ vs $3,3 \pm 0,8$ μ Osm min⁻¹ g⁻¹; $p = 0,06$). Chymostatyna wpłynęła na wydalanie potasu z moczem, natomiast sam rozpuszczalnik nie wpłynął na żaden z mierzonych parametrów wydalniczych nerki (Tab. 2).

1.3.2.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

Biorąc pod uwagę zmiany poziomu Ang II w osoczu i badanych tkankach tylko u szczurów SHR w fazie ustalonego nadciśnienia blokowanie chymazy wpłynęło na poziom Ang II w każdym z tych obszarów (Ryc. 22). Efektem blokowania lokalnych szlaków syntezy Ang II były ponad trzykrotnie niższe wartości stężenia Ang II w osoczu w grupie eksperymentalnej w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą rozpuszczalnik chymostatyny ($0,83 \pm 0,14$ vs $2,95 \pm 0,35$ ng ml⁻¹; $p < 0,001$). W ustalonej fazie nadciśnienia o podłożu genetycznym (SHR 16+C) poziom Ang II jest bardzo wysoki w nerce w porównaniu do szczurów młodych, u których nie doszło jeszcze do

rozwoju nadciśnienia (Tab. 2). Wydaje się, że ten wzrost Ang II jest zależny od aktywności chymazy w genetycznym modelu nadciśnienia.

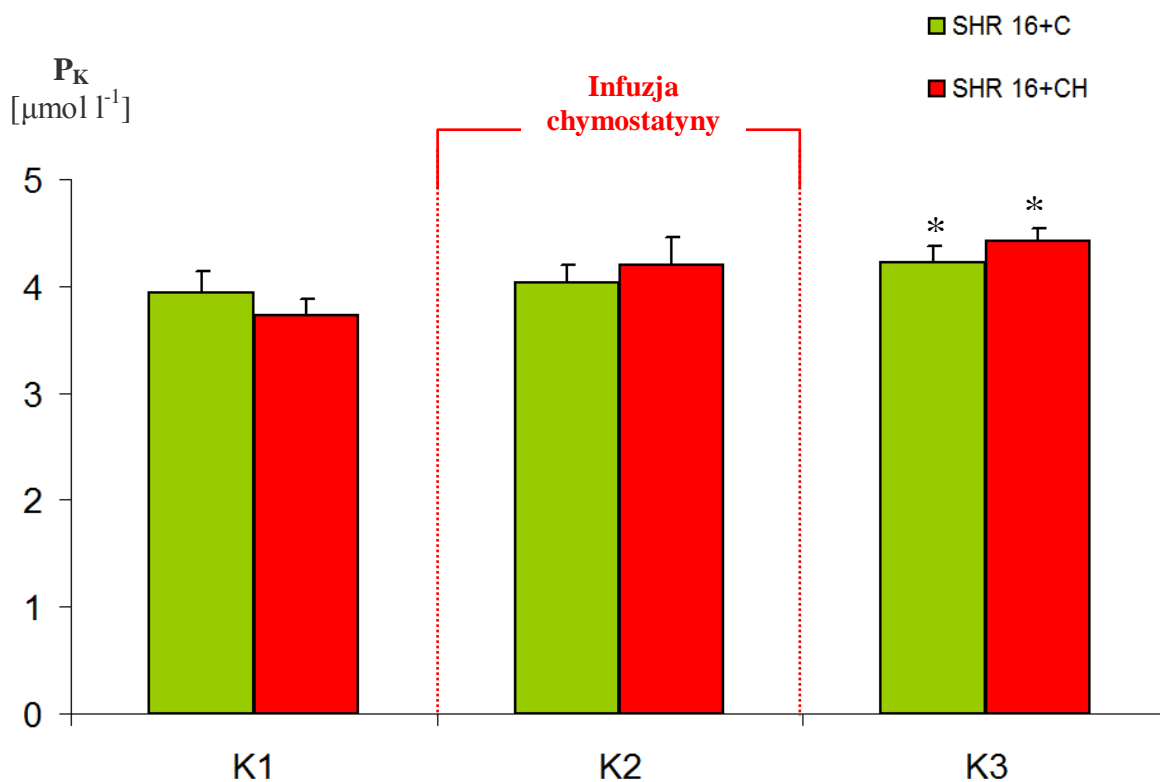
Blokowanie tkankowych szlaków syntezy Ang II za pośrednictwem chymostatyny dało efekty zarówno w osoczu jak i w każdej z badanych tkanek, co sugeruje istotny udział enzymów wrażliwych na chymostatynę w syntezie Ang II w tym typie nadciśnienia (SHR 16). W każdej z tkanek były istotne różnice w poziomie peptydu (Ang II) po zablokowaniu lokalnych RAAS (SHR16+CH) w porównaniu z grupą kontrolną (SHR16+C): w nerce ($17,78 \pm 1,59$ vs $61,99 \pm 4,33$ ng g^{-1} ; $p < 0,0001$), w sercu ($0,18 \pm 0,02$ vs $0,38 \pm 0,06$ ng g^{-1} ; $p < 0,01$) oraz w aorcie ($4,14 \pm 0,70$ vs $6,81 \pm 0,96$ ng g^{-1} ; $p < 0,05$). Infuzja chymostatyny co najmniej dwukrotnie obniżyła poziom Ang II w tych tkankach (Ryc. 22).



Ryc. 15. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi (MABP) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH $n=7$; SHR 16+C $n=8$.

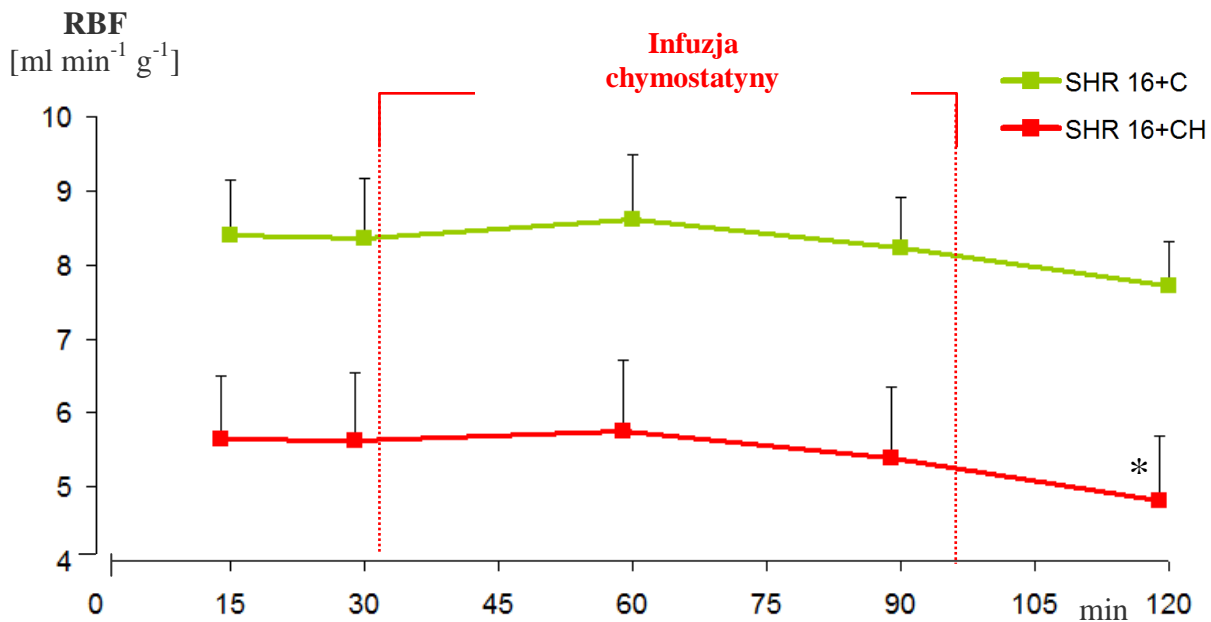
* – znamienne różnie od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 16. Zmiany stężenia potasu (P_K) w osoczu u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH $n=7$; SHR 16+C $n=6$.

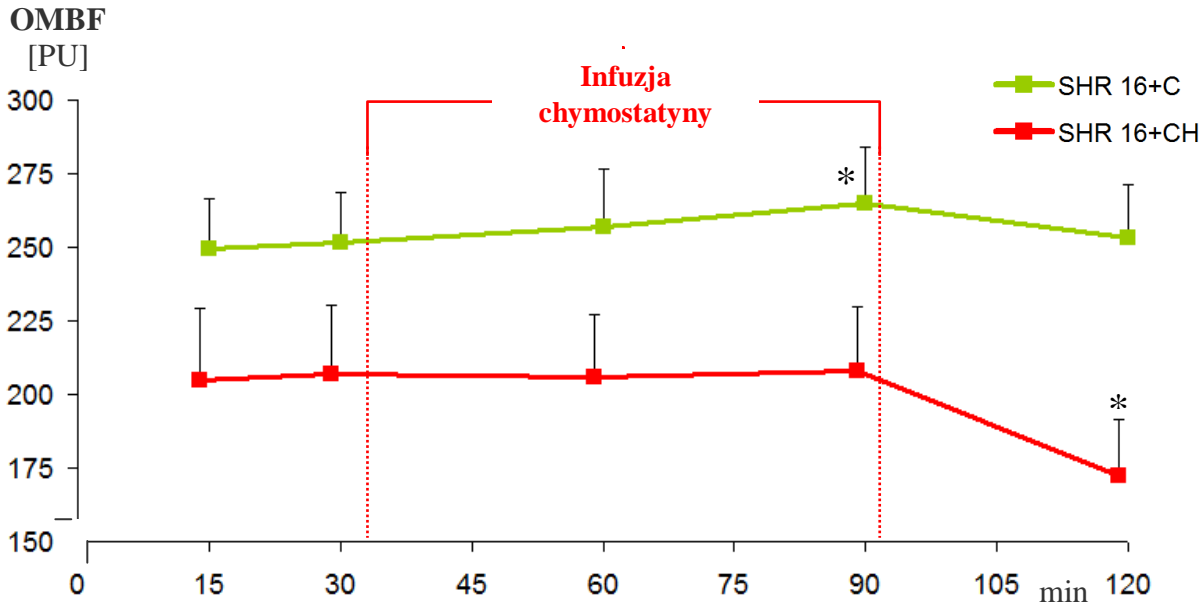
* – znamienne różnie od wartości w okresie kontrolnym (K1) przy $p<0,05$ lub mniej.



Ryc. 17. Zmiany w całkowitym przepływie krwi przez nerkę (RBF) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH n=7; SHR 16+C n=8.

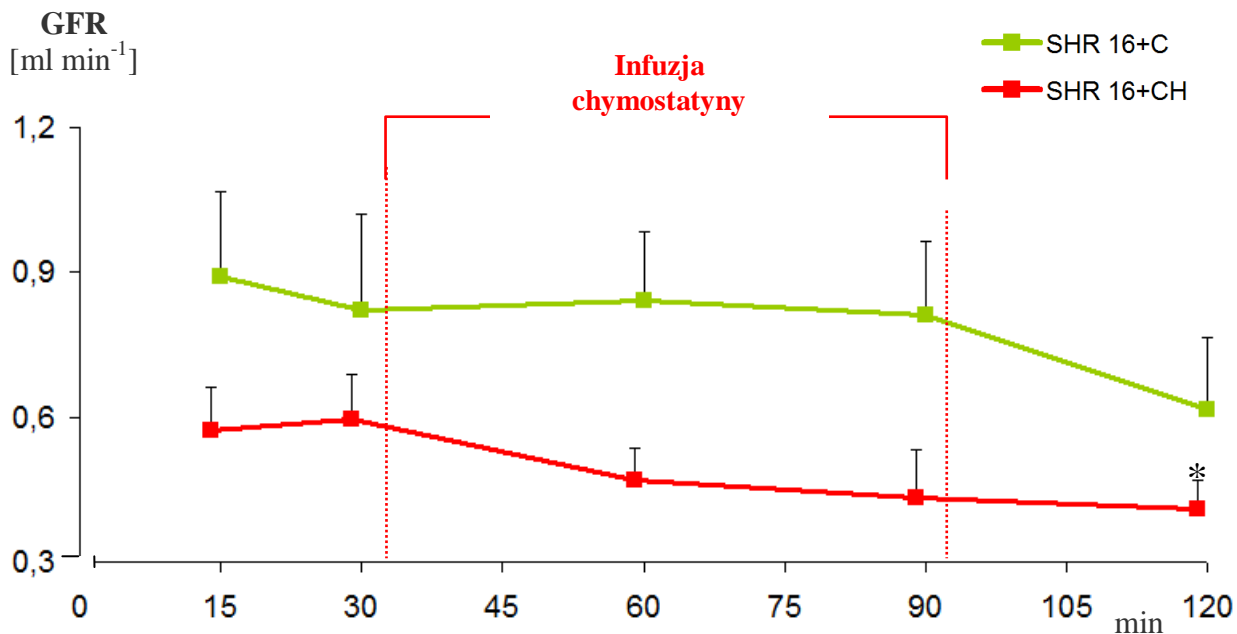
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



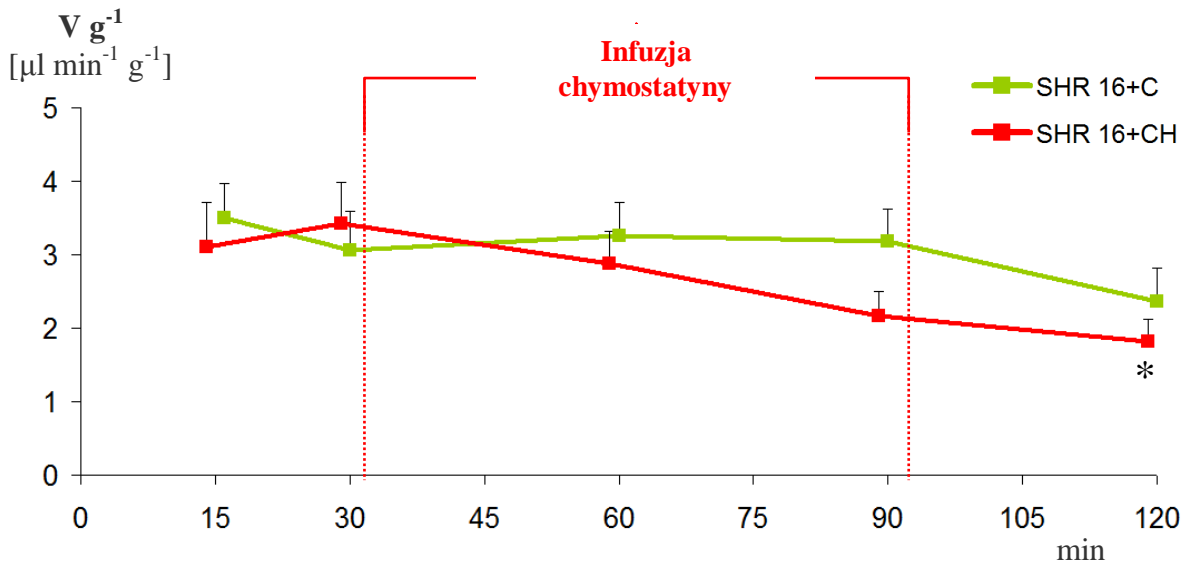
Ryc. 18. Zmiany przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH n=7; SHR 16+C n=8.

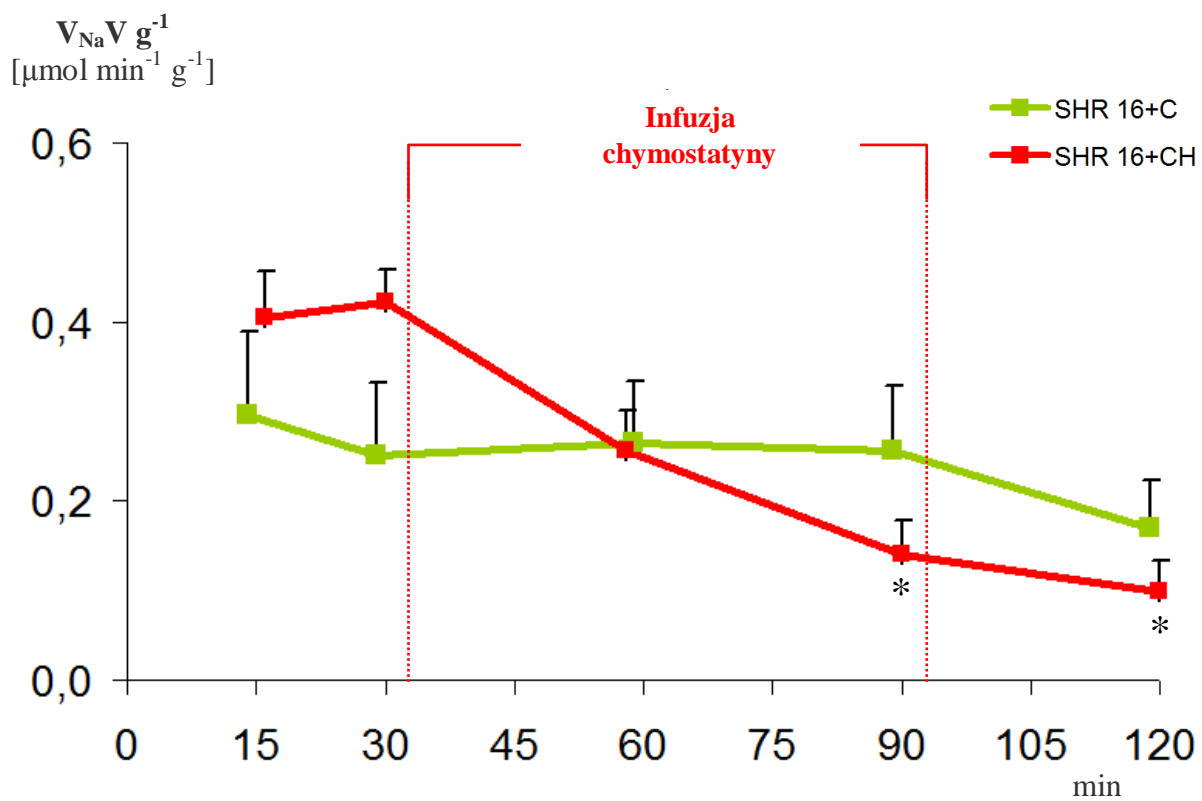
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 19. Zmiany filtracji kłębuszkowej (GFR) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C). Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH n=7; SHR 16+C n=7.
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



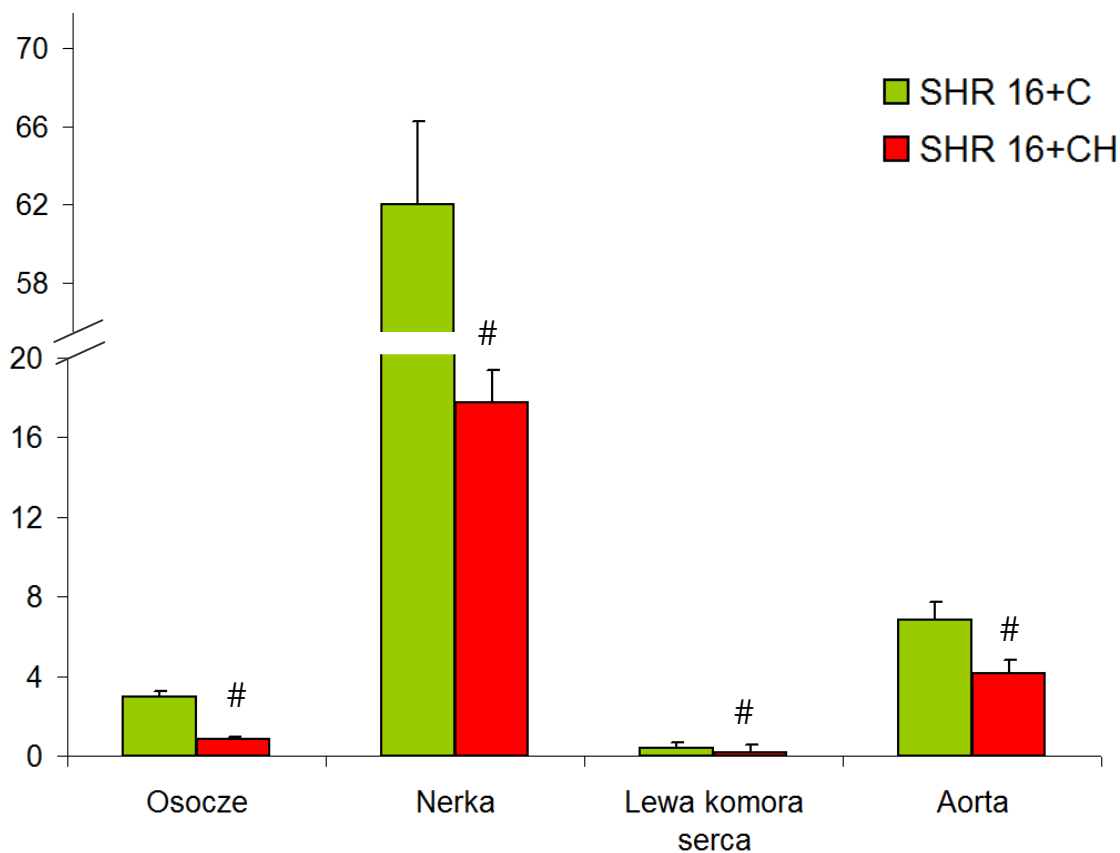
Ryc. 20. Zmiany wydalania moczu ($V g^{-1}$) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C). Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH n=6; SHR 16+C n=7.
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 21. Zmiany wydalania sodu z moczem ($U_{Na}V \text{ g}^{-1}$) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C). Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH $n=6$; SHR 16+C $n=7$.

* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej.

Stężenie Ang II
[ng ml⁻¹/ ng g⁻¹]



Ryc. 22. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml⁻¹) i w tkankach (ng g⁻¹) u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik chymostatyny (SHR 16+C).

Wartości średnie ± SEM, dla grupy SHR 16+CH n=5-7; SHR 16+C n=6-8.

– znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy p<0,05 lub mniej.

2. Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego RAAS i tkankowych układów lokalnych u szczurów SHR w ustalonej fazie nadciśnienia (kaptopryl na tle chymostatyny) – grupa dodatkowa.

W celu sprawdzenie udziału chymazy w tworzeniu Ang II w porównaniu z enzymem konwertującym (ACE) stworzono dodatkową grupę eksperymentalną, w której u szczurów SHR 16 jednocześnie blokowano ogólnoustrojowy i tkankowe RAAS.

2.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

U szczurów SHR w fazie ustalonego nadciśnienia doszło do 12% obniżenia ciśnienia krwi w odpowiedzi na jednoczesne blokowanie chymazy i ACE (bolus kaptoprylu na tle chymostatyny). W tej grupie obniżenie MABP obserwowano w 30 minucie po odstawieniu chymostatyny (149 ± 5 vs 165 ± 4 mmHg; $p < 0,05$), a efekt pogłębił się w ciągu kolejnych 30 minut (143 ± 4 vs 165 ± 4 mmHg; $p < 0,001$). Rozpuszczalnik chymostatyny i kaptoprylu nie wpłynął na MABP (2% obniżenie: 149 ± 4 vs 152 ± 5 mmHg; NS; Tab. 3).

Spadek ciśnienia krwi nie zależał od zmian HR.

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) i osmolalność osocza (P_{osm})

Jednoczesne blokowanie chymazy i ACE nie wpłynęło na stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) w modelu SHR 16. Osmolalność osocza wzrosła już pod koniec infuzji chymostatyny (304 ± 1 vs 301 ± 1 mOsm/kg; $p < 0,0001$), a efekt ten utrzymał się do zakończenia obserwacji (306 ± 1 vs 301 ± 1 mOsm/kg; $p < 0,001$; Tab. 3).

2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową (IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

W modelu nadciśnienia SHR 16+Ch+K doszło do istotnego obniżenia przepływu przez tętnicę biodrową (14% spadek: $2,8 \pm 0,2$ vs $3,3 \pm 0,3$ ml min⁻¹; $p < 0,05$), a efekt pogłębił się i pod koniec prowadzonego doświadczenia obserwowano 27% obniżenie ($2,4 \pm 0,3$ vs $3,3 \pm 0,3$ ml min⁻¹; $p < 0,001$; Tab. 3).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

Nie zaobserwowano istotnych zmian w całkowitym przepływie krwi przez nerkę po jednoczesnej blokadzie chymazy i ACE: 12% tendencja do wzrostu ($9,0 \pm 1,6$ vs $7,8 \pm 1,0$ ml min⁻¹

g^{-1} ; NS), ale zmiana była nieistotna statystycznie, natomiast doszło do istotnego obniżenia RVR (Tab. 3).

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Przepływ przez korę oraz przez obie warstwy rdzenia nerki nie zmienił się pod wpływem jednoczesnego blokowania chymazy i ACE (Tab. 3).

2.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

Doszło do 27% obniżenia GFR w odpowiedzi na jednoczesne blokowanie tkankowych enzymów i ogólnoustrojowego RAAS w 60 min od startu infuzji chymostatyny ($0,7 \pm 0,1$ vs $1,0 \pm 0,1$ ml min^{-1} ; $p < 0,01$), a efekt obniżenia pogłębił się w ciągu kolejnej godziny (43% spadek: $0,6 \pm 0,1$ vs $1,0 \pm 0,1$ ml min^{-1} ; $p < 0,001$). Rozpuszczalnik nie wpłynął na poziom filtracji kłębuszkowej ($0,6 \pm 0,2$ vs $0,8 \pm 0,2$ ml min^{-1} ; NS; Tab. 3).

Wydalenie: moczu ($V \text{ g}^{-1}$), sodu ($U_{\text{Na}}V \text{ g}^{-1}$), potasu ($U_{\text{K}}V \text{ g}^{-1}$) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{\text{osm}}V \text{ g}^{-1}$)

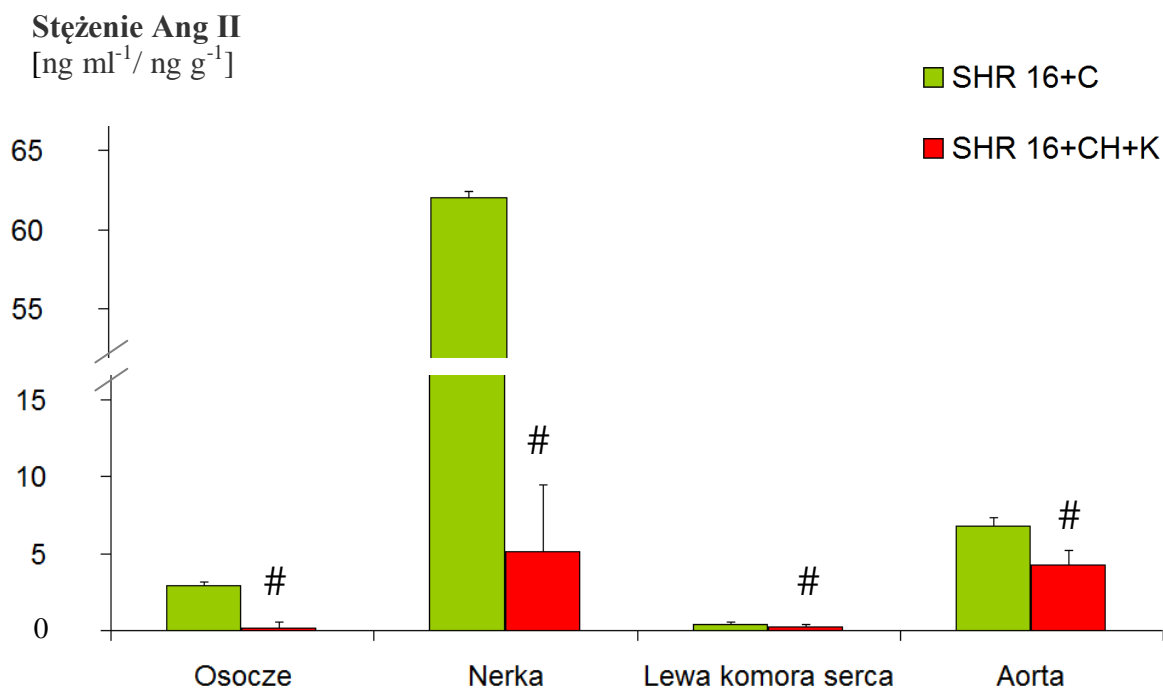
Blokowanie chymazy i ACE spowodowało obniżenie diurezy oraz wydalania sodu w modelu SHR16. Zaobserwowano istotne statystycznie 10% obniżenie $V \text{ g}^{-1}$ ($2,3 \pm 0,2$ vs $2,9 \pm 0,2$ $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$; $p < 0,05$). W tej grupie podanie obu typów inhibitorów spowodowało także istotne 27% obniżenie $U_{\text{Na}}V \text{ g}^{-1}$ ($0,16 \pm 0,02$ vs $0,24 \pm 0,03$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$; $p < 0,05$), ale efekt pojawił się dopiero w 60 min od odstawienia inhibitorów RAAS. Chymostatyna i kaptopryl nie wpłynęły na wydalanie potasu ani substancji osmotycznie czynnych, podobnie jak ich rozpuszczalnik (Tab. 3).

2.4. Poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

Biorąc pod uwagę zmiany poziomu Ang II w osoczu i tkankach u SHR w fazie ustalonego nadciśnienia jednoczesne blokowanie chymazy i ACE (SHR 16+CH+K) spowodowało największe obniżenie stężenia Ang II (Ryc. 23). Efektem takiego równoczesnego blokowania ogólnoustrojowego RAAS i lokalnych szlaków syntezy Ang II były piętnastokrotnie niższe wartości stężenia Ang II w osoczu w grupie eksperymentalnej (SHR 16+CH+K) w porównaniu z grupą kontrolną ($0,20 \pm 0,01$ vs $2,94 \pm 0,35$ ng ml^{-1} ; $p < 0,0001$). Obserwowane w grupie SHR 16+CH+K obniżenie poziomu Ang II w osoczu ($0,20 \pm 0,01$ ng ml^{-1}) było dużo większe niż po zablokowaniu samej chymazy (SHR 16+CH; $0,83 \pm 0,14$ ng ml^{-1}).

W każdej z tkanek obserwowano istotne różnice w poziomie Ang II po całkowitym zablokowaniu RAAS w porównaniu z grupą kontrolną (SHR16+C): w nerce poziom Ang II osiągnął dwunastokrotnie niższy poziom niż w grupie kontrolnej ($5,16 \pm 0,40$ vs $61,99 \pm 4,33$ ng g^{-1} ;

$p < 0,0001$), a w sercu ($0,23 \pm 0,03$ vs $0,38 \pm 0,06$ ng g⁻¹; $p < 0,05$) oraz w aorcie ($4,28 \pm 0,50$ vs $6,81 \pm 0,96$ ng g⁻¹; $p < 0,05$) było to półtorakrotnie niższy poziom. Infuzja kaptoprylu na tle chymostatyny istotnie pogłębiła obniżenie poziomu Ang II w nerce w porównaniu z samą blokadą chymazy, natomiast blokowanie syntezy Ang II w sercu i aorcie dało podobne efekty w obu grupach (Ryc. 24).

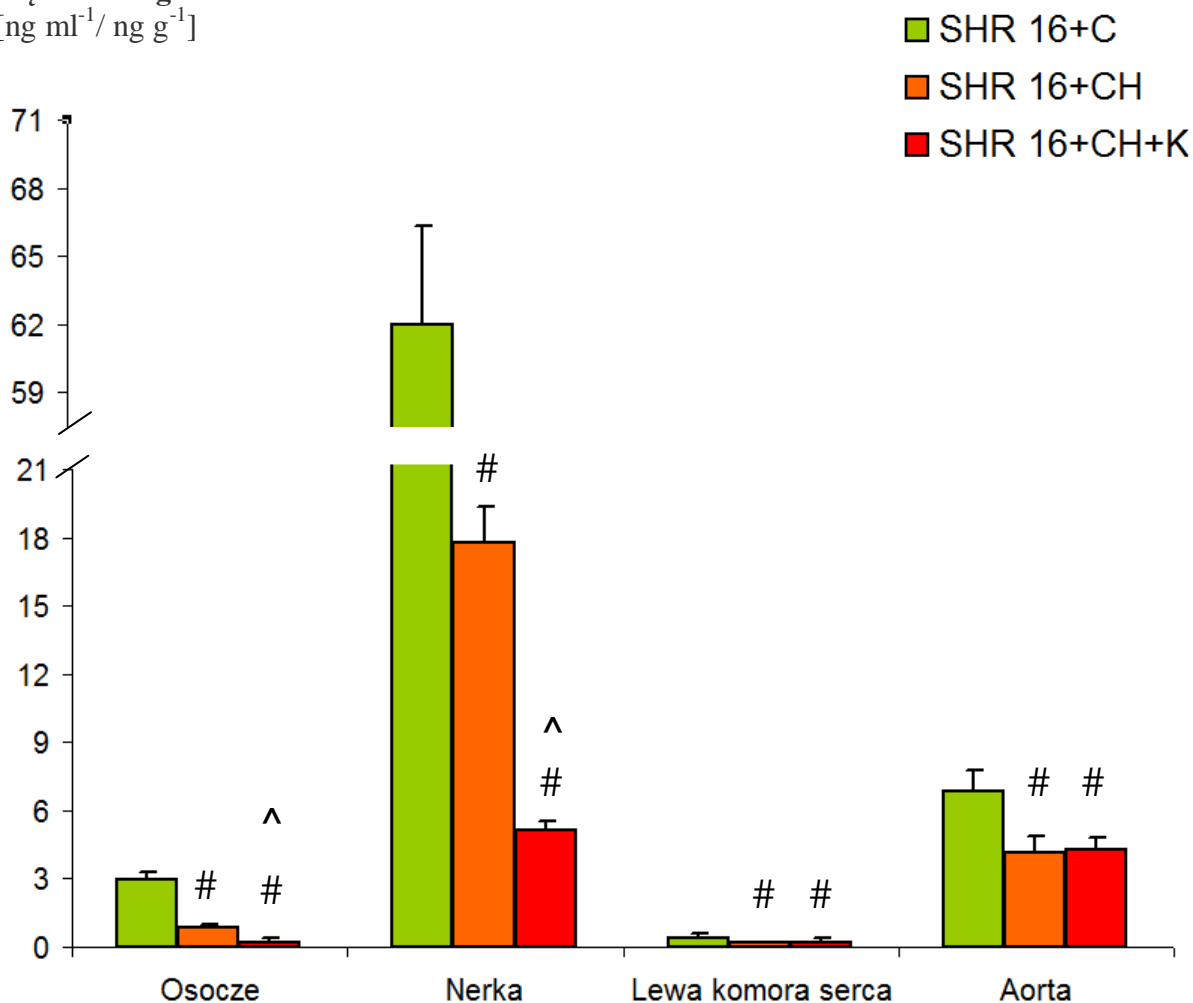


Ryc. 23. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml⁻¹) i w tkankach (ng g⁻¹) u szczurów otrzymujących chymostatynę po jednoczesnym blokowaniu ogólnoustrojowego i tkankowych układów RAAS (infuzja kaptoprylu na tle chymostatyny, SHR 16+CH+K) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik (SHR 16+C).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+CH+K n=5; SHR 16+C n=6-8.

– znamienne różnie od wartości dla grupy kontrolnej przy $p < 0,05$ lub mniej.

Stężenie Ang II
[ng ml⁻¹/ ng g⁻¹]



Ryc. 24. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml⁻¹) i w tkankach (ng g⁻¹) w genetycznym modelu nadciśnienia u szczurów otrzymujących chymostatynę (SHR 16+CH), po jednoczesnym blokowaniu ogólnoustrojowego i tkankowych układów RAAS (infuzja kaptoprylu na tle chymostatyny, SHR 16+CH+K) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik (SHR 16+C).

Wartości średnie ± SEM, dla grupy SHR 16+CH n=5-7, SHR 16+CH+K n=5; SHR 16+C n=6-8.

– znamienne różnie od wartości dla grupy kontrolnej przy p<0,05 lub mniej.

^ – znamienne różnie od wartości dla grupy SHR 16+CH przy p<0,05 lub mniej.

3. Wpływ peptydów z nasion rzepaku o potencjalnym działaniu hipotensyjnym w modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym (szczury SHR)

W doświadczeniach ostrych na szczurach SHR w dwóch fazach rozwoju nadciśnienia przebadano cztery peptydy izolowane z nasion rzepaku o potencjalnym hipotensyjnym działaniu:

- VW (Walina-Tryptofan) – doświadczenia na SHR 7 i SHR 16
- IY (Izoleucyna-Tyrozyna) – doświadczenia na SHR 7 i SHR 16
- VWIS (Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna) – doświadczenia na SHR 16
- RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna) – doświadczenia na SHR 16

Peptydy rozpuszczone w soli fizjologicznej podawano w infuzji dożylniej. Kontrolą były szczury SHR 7 lub 16, którym podawano infuzję soli fizjologicznej (SHR 7+S, SHR 16+S).

3.1. Szczury SHR w fazie rozwoju nadciśnienia

3.1.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) i częstość skurczów serca (HR)

U szczurów SHR w początkowej fazie rozwoju nadciśnienia nie doszło do zmian ciśnienia tętniczego krwi pod wpływem żadnego z podawanych peptydów, zarówno VW (Tab. 4) jak i IY (Tab. 5). Rozpuszczalnik, jakim była sól fizjologiczna także nie wpłynął na zmianę ciśnienia tętniczego krwi u badanych szczurów (Tab. 4-5).

Peptyd VW (Tab. 4) nie wpłynął na częstość skurczów serca, natomiast peptyd IY spowodował wzrost HR w pierwszym okresie podawania (326 ± 42 vs 311 ± 19 skurcze serca min^{-1} ; $p < 0,05$), ale efekt był przemijający i ustąpił pod koniec infuzji IY (Tab. 5). Rozpuszczalnik nie wpłynął na HR w żadnej z badanych grup.

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_{K}) i osmolalność osocza (P_{osm})

Nie było zmian w poziomie sodu w osoczu (P_{Na}) w żadnej z badanych grup. W grupie SHR 7 wzrósł poziom potasu w osoczu (P_{K}) w odpowiedzi na VW ($5,0 \pm 0,1$ vs $4,7 \pm 0,3$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,01$; Ryc. 25, Tab. 4), natomiast peptyd IY nie wpłynął na P_{K} (Tab. 5) w żadnej z badanych grup. Nie było zmian w osmolalności osocza w żadnej z badanych grup. Rozpuszczalnik nie wpłynął na parametry osocza u SHR 7 i 16 (Tab. 4).

3.1.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową

(IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

Peptyd VW nie wpłynął na IBF, podobnie jak rozpuszczalnik, natomiast infuzja IY spowodowała niewielkie, ale istotne obniżenie tego przepływu ($2,0 \pm 0,4$ vs $2,3 \pm 0,4$ ml min⁻¹; $p < 0,05$; Ryc. 26). Infuzja peptydu VW podwyższyła IVR (silna tendencja) w grupie SHR 7 (80 ± 11 vs 70 ± 12 mmHg ml⁻¹ min⁻¹; $p = 0,06$), natomiast rozpuszczalnik nie wpłynął na IVR. Infuzja peptydu IY nie wpłynęła na IVR (Tab 4 i 5).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

Zarówno VW jak i IY nie wpłynęły na drugi z badanych przepływów, czyli RBF. Pod wpływem IY zaobserwowano jedynie tendencję do wzrostu RBF ($5,3 \pm 0,5$ vs $4,7 \pm 0,5$ ml min⁻¹ g⁻¹; NS), podobnie jak pod wpływem rozpuszczalnika ($4,6 \pm 0,5$ vs $4,2 \pm 0,3$ ml min⁻¹ g⁻¹; NS). W grupie kontrolnej (SHR 7+S) istotnie obniżył się RVR (28 ± 3 vs 30 ± 3 mmHg ml⁻¹ min⁻¹ g⁻¹; $p < 0,05$), natomiast peptydy VW i IY nie wpłynęły na nerkowy opór naczyniowy.

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Nie było zmian w żadnym z przepływów wewnątrznerkowych w odpowiedzi na infuzję VW, IY oraz ich rozpuszczalnika (Tab. 4 i 5).

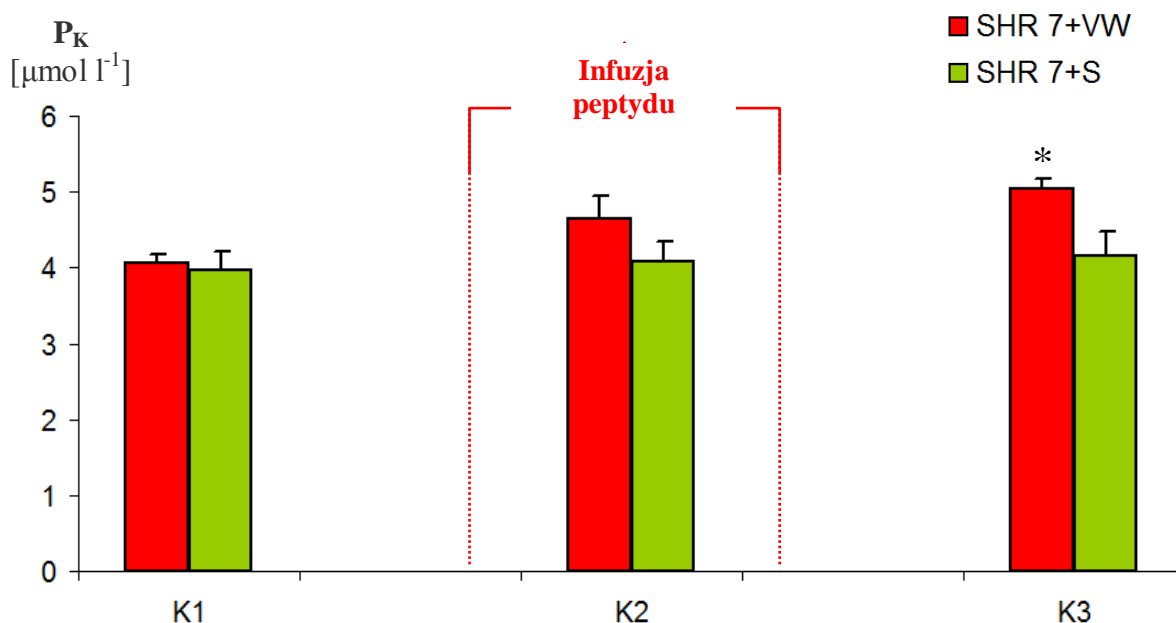
3.1.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

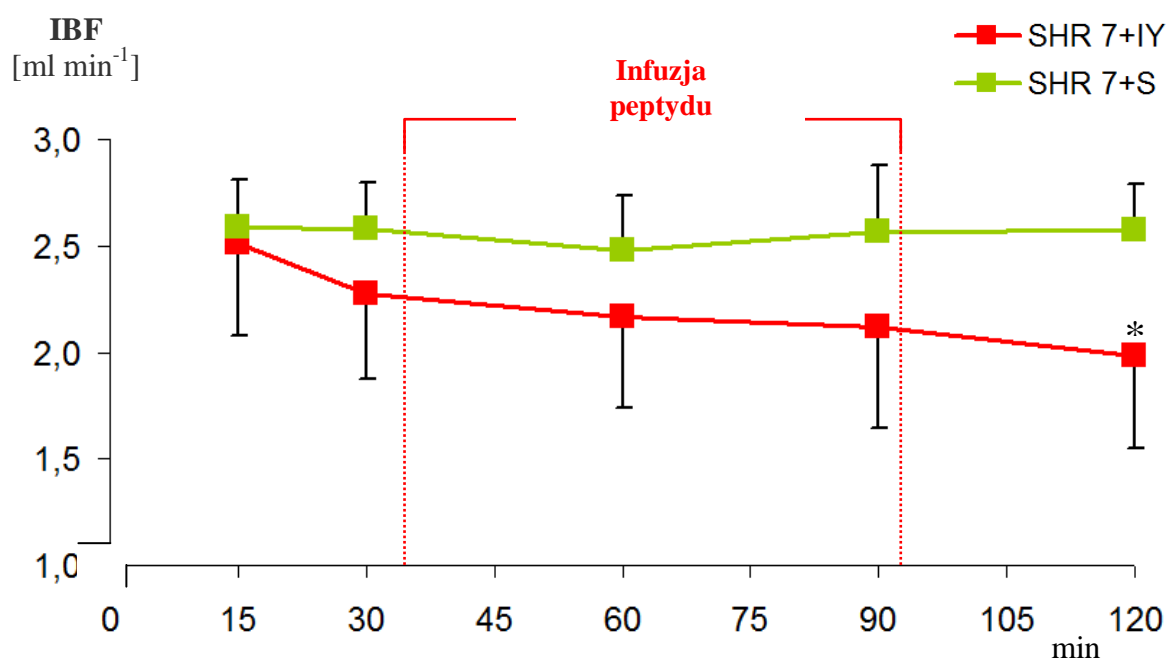
Żaden z badanych peptydów nie wpłynął na GFR, podobnie jak ich rozpuszczalnik (Tab. 4 i 5).

Wydalanie: moczu (V g⁻¹), sodu ($U_{Na}V$ g⁻¹), potasu (U_KV g⁻¹) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$ g⁻¹)

W odpowiedzi na podanie VW zaobserwowano tendencję do wzrostu wydalania moczu ($3,6 \pm 0,8$ vs $2,6 \pm 0,4$ μl min⁻¹ g⁻¹; NS), natomiast IY oraz rozpuszczalnik obu peptydów nie wpłynęły na V g⁻¹. Peptydy oraz rozpuszczalnik nie wpłynęły na $U_{Na}V$ g⁻¹. VW spowodował jedynie tendencję do wzrostu wydalania potasu w moczu ($0,6 \pm 0,2$ vs $0,3 \pm 0,1$ μmol min⁻¹ g⁻¹; NS), podobnie jak jego rozpuszczalnik ($0,30 \pm 0,04$ vs $0,25 \pm 0,04$ μmol min⁻¹ g⁻¹; NS), natomiast infuzja IY nie miała wpływu na ten parametr. Nie obserwowano zmian pod wpływem peptydów ani ich rozpuszczalnika w wydalaniu substancji osmotycznie czynnych (Tab. 4 i 5).



Ryc. 25. Zmiany stężenia potasu (P_K) w osoczu u szczurów otrzymujących peptyd Walina-Tryptofan (SHR 7+VW) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 7+S). Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+VW $n=4$; SHR 7+S $n=4$.
* – znamienne różne od wartości w okresie kontrolnym (K1) przy $p<0,05$ lub mniej.



Ryc. 26. Zmiany w przepływie krwi przez tętnicę biodrową (IBF) u szczurów otrzymujących peptyd Izoleucyna-Tyrozyna (SHR 7+IY) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 7+S). Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+IY $n=4$; SHR 7+S $n=4$.
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej.

3.2. Szczury SHR w fazie ustalonego nadciśnienia

3.2.1. Ciśnienie krwi i parametry osocza

Średnie ciśnienie tętnicze krwi (MABP) i częstość skurczów serca (HR)

U szczurów SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia zaobserwowano tendencję do podwyższenia MABP pod wpływem dwóch peptydów: VW (160 ± 5 vs 151 ± 3 mmHg; NS) oraz IY (180 ± 5 vs 169 ± 5 mmHg; NS), ale zmiana była nieistotna statystycznie i ustąpiła po odstawieniu peptydów. Jedynie pod wpływem infuzji VWIS (162 ± 5 vs 146 ± 3 mmHg; $p < 0,05$) oraz RIY (168 ± 12 vs 138 ± 8 mmHg; $p < 0,01$) doszło do istotnego podwyższenia MABP, ale efekty również były przemijające i ustąpiły pod koniec godzinnej infuzji peptydów (Ryc. 27). Rozpuszczalnik peptydów nie wpłynął na zmiany ciśnienia tętniczego krwi w grupie SHR 16 (Ryc. 27, Tab. 6).

Wzrost ciśnienia krwi nie zależał od zmian HR, nie było także różnic w częstości skurczów serca między grupami w tym modelu nadciśnienia (Tab. 6).

Stężenie elektrolitów w osoczu (P_{Na} i P_K) i osmolalność osocza (P_{osm})

Nie było zmian w poziomie sodu w osoczu (P_{Na}) w żadnej z badanych grup SHR 16 (VW, IY, RIY) z wyjątkiem wzrostu w grupie, która otrzymywała VWIS (141 ± 1 vs 134 ± 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,01$; Ryc. 28). W tej grupie (SHR 16+VWIS) wzrósł także P_K ($4,9 \pm 0,2$ vs $4,3 \pm 0,2$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; $p < 0,01$; Ryc. 28), a w odpowiedzi na RIY zaobserwowano jedynie tendencję do wzrostu stężenia potasu w osoczu ($4,2 \pm 0,2$ vs $3,9 \pm 0,2$ $\mu\text{mol l}^{-1}$; NS). W pozostałych grupach nie było zmian w P_K . Osmolalność osocza wzrosła jedynie pod wpływem VWIS (287 ± 3 vs 284 ± 3 mOsm/kg; $p < 0,05$), natomiast pozostałe peptydy nie wpłynęły na ten parametr (Tab. 6).

Nie zaobserwowano zmian w parametrach osocza pod wpływem rozpuszczalnika (Ryc. 28, Tab. 6).

3.2.2. Parametry hemodynamiczne: obszar krążenia zaopatrywany przez tętnicę biodrową

(IBF) i krążenie nerkowe (RBF)

Przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) i opór naczyniowy (IVR)

Infuzja każdego z badanych peptydów spowodowała istotne obniżenie IBF (VW: $1,9 \pm 0,2$ vs $2,7 \pm 0,2$ ml min^{-1} ; $p < 0,05$; VWIS: $2,2 \pm 0,3$ vs $3,0 \pm 0,3$ ml min^{-1} ; $p < 0,01$; RIY: $1,8 \pm 0,3$ vs $2,8 \pm 0,5$ ml min^{-1} ; $p < 0,05$; Ryc. 29) z wyjątkiem IY, który nie zmienił przepływu krwi przez tętnicę biodrową. Infuzja rozpuszczalnika spowodowała tendencję do obniżenia IBF ($2,7 \pm 0,2$ vs $3,0 \pm 0,3$ ml min^{-1} ; NS), ale zmiana nie była istotna statystycznie ($p = 0,08$). Infuzja rozpuszczalnika nie wpłynęła na IVR, natomiast infuzja peptydu VW istotnie podwyższyła opór naczyniowy w obszarze krążenia

zaopatrywanym przez tętnicę biodrową (81 ± 5 vs 56 ± 6 mmHg ml⁻¹ min⁻¹; $p < 0,01$), ale efekt ustąpił po odstawieniu peptydu (Ryc. 30). Infuzja peptydu IY nie wpłynęła na IVR. Zaobserwowano trwały (utrzymujący się po odstawieniu peptydu) wzrost IVR po infuzji VWIS oraz RIY (Ryc. 30, Tab. 6).

Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i opór naczyniowy (RVR)

Nie było zmian w RBF pod wpływem infuzji żadnego z badanych peptydów (VW, IY, VWIS, RIY), podobnie jak pod wpływem rozpuszczalnika. Nie było również zmian w RVR pod wpływem infuzji badanych peptydów (Tab. 4-6).

Przepływy wewnątrznerkowe (CBF, OMBF i IMBF)

Nie było zmian w żadnym z przepływów wewnątrznerkowych w odpowiedzi na infuzje peptydów oraz ich rozpuszczalnika z wyjątkiem zmian w IMBF. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki już pod koniec infuzji IY (197 ± 49 vs 169 ± 50 PU; $p < 0,05$), przy czym wzrost utrzymał się także po odstawieniu peptydu (198 ± 43 ; $p < 0,05$; Ryc. 31). Natomiast pod wpływem RIY zaobserwowano przeciwną reakcję: doszło do obniżenia IMBF w trakcie infuzji peptydu (158 ± 42 vs 190 ± 45 PU; $p < 0,01$), ale zmiana zanikła po jego odstawieniu (215 ± 60 ; NS; Ryc. 31). Pozostałe peptydy i ich rozpuszczalnik nie wpłynęły na badany parametr (Tab. 4-6).

3.2.3. Wydalanie nerkowe

Filtracja kłębuszkowa (GFR)

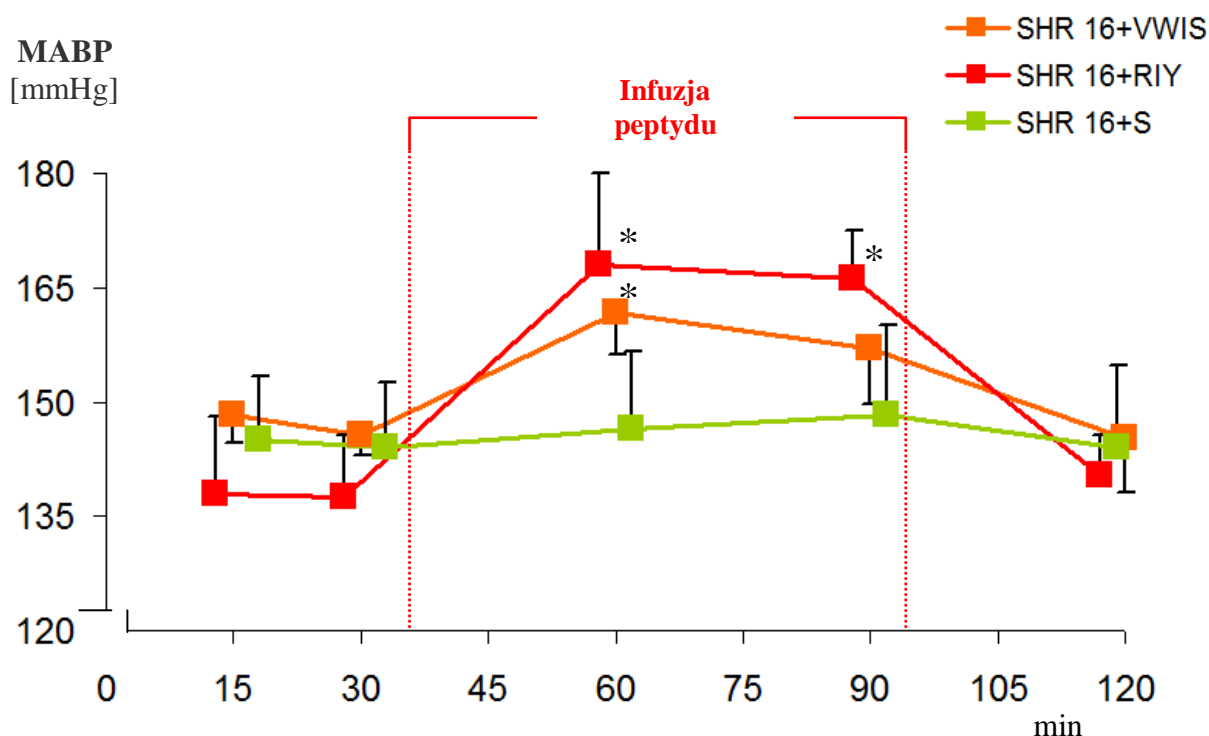
Na poziom GFR w grupie SHR 16 wpłynął jedynie VWIS oraz RIY. W odpowiedzi na infuzję VWIS doszło do obniżenia GFR ($0,7 \pm 0,1$ vs $1,1 \pm 0,2$ ml min⁻¹; $p < 0,05$), ale efekt ustąpił po odstawieniu peptydu ($0,8 \pm 0,1$; NS). Natomiast po podaniu RIY doszło do bardzo silnego obniżenia GFR już po odstawieniu peptydu ($0,4 \pm 0,1$ vs $1,7 \pm 0,1$ ml min⁻¹; $p < 0,01$; Tab. 4-6).

Wydalanie: moczu (V g⁻¹), sodu ($U_{Na}V$ g⁻¹), potasu (U_KV g⁻¹) i substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}V$ g⁻¹)

Tylko w grupach: SHR 16+IY i w kontroli nie było zmian w wydalaniu moczu. W grupie SHR 16+VW doszło do istotnego podwyższenia V g⁻¹, ale był to efekt przejściowy ($4,7 \pm 1,1$ vs $3,7 \pm 0,7$ μl min⁻¹ g⁻¹; $p < 0,05$) i zanikł po odstawieniu peptydu ($4,3 \pm 1,0$ μl min⁻¹ g⁻¹; NS). Podobną reakcję zaobserwowano po podaniu RIY: choć pod wpływem infuzji peptydu wydalanie moczu wzrosło przejściowo ($4,5 \pm 0,5$ vs $2,7 \pm 0,5$ μl min⁻¹ g⁻¹; $p = 0,058$); efekt ustąpił po odstawieniu RIY ($2,6 \pm 0,2$ μl min⁻¹ g⁻¹; NS). Zupełnie przeciwną reakcję obserwowano po infuzji VWIS, gdzie doszło do istotnego obniżenia wydalania moczu ($3,1 \pm 0,4$ vs $4,2 \pm 0,6$ μl min⁻¹ g⁻¹; $p < 0,01$; Tab. 4-6).

Tylko pod wpływem infuzji VWIS doszło do istotnego obniżenia $U_{Na}V$ g^{-1} ($0,2\pm 0,1$ vs $0,4\pm 0,1$ $\mu mol\ min^{-1}\ g^{-1}$; $p<0,05$), które utrzymywało się także po odstawieniu peptydu ($0,2\pm 0,1$ $\mu mol\ min^{-1}\ g^{-1}$; $p=0,057$; Ryc. 32). Nie było zmian w wydalaniu sodu pod wpływem infuzji pozostałych badanych peptydów; podobnie żaden z peptydów nie wpłynął na wydalanie potasu (Tab. 4-6).

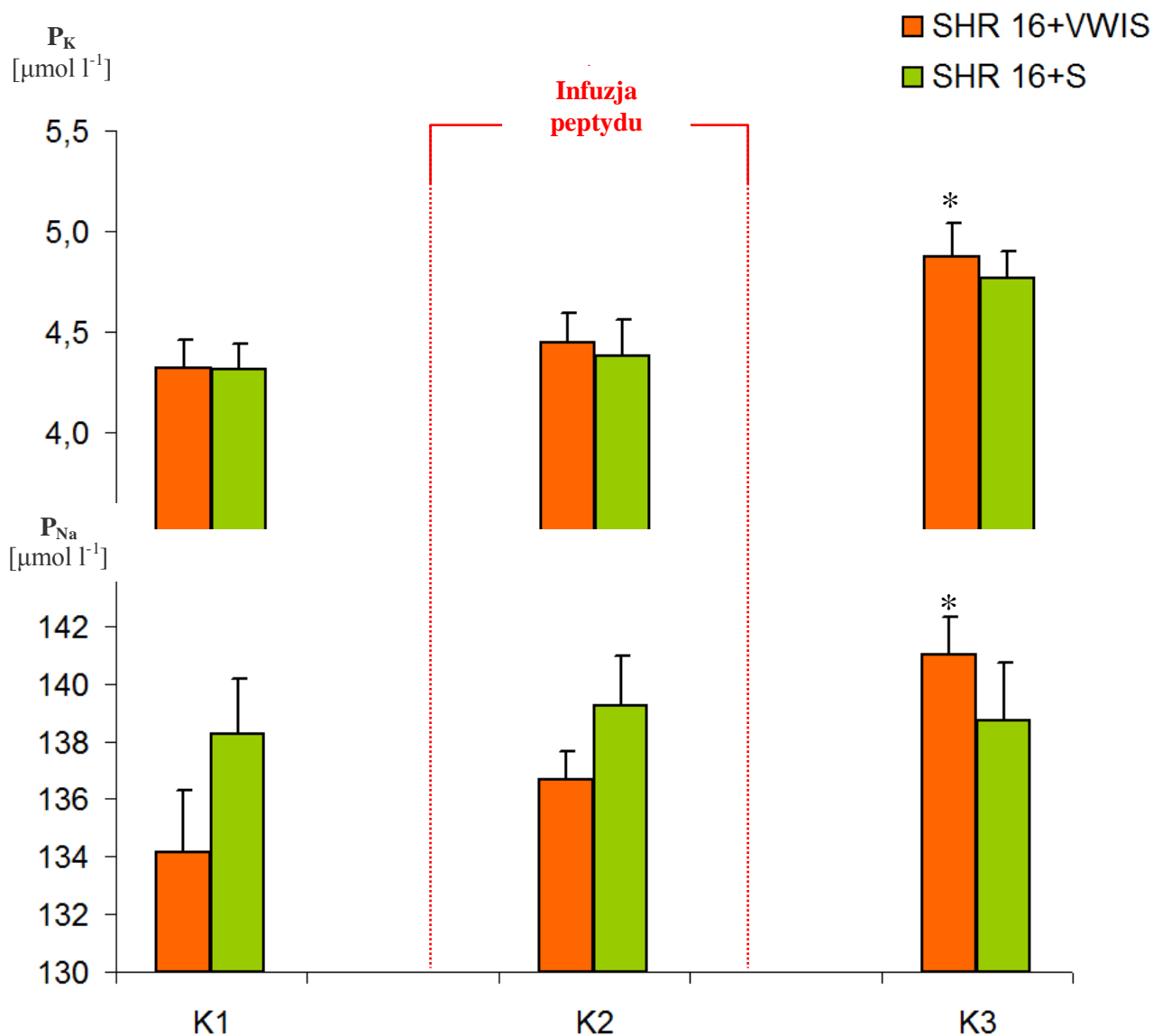
Zaobserwowano istotne podwyższenie $U_{osm}V$ g^{-1} tylko w grupie SHR 16+VW ($5,1\pm 1,0$ vs $4,6\pm 1,0$ $\mu Osm\ min^{-1}\ g^{-1}$; $p<0,05$), ale efekt zanikł po odstawieniu peptydu ($4,8\pm 0,8$ $\mu Osm\ min^{-1}\ g^{-1}$; NS). Nie obserwowano zmian pod wpływem pozostałych peptydów ani ich rozpuszczalnika w wydalaniu substancji osmotycznie czynnych w grupie SHR 16 (Tab. 4-6).



Ryc. 27. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego krwi (MABP) u szczurów otrzymujących peptyd Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna (SHR 16+VWIS), Arginina- Izoleucyna-Tyrozyna (SHR 16+RIY) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 16+S).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+VWIS $n=6$; SHR 16+RIY $n=4$; SHR 7+S $n=5$.

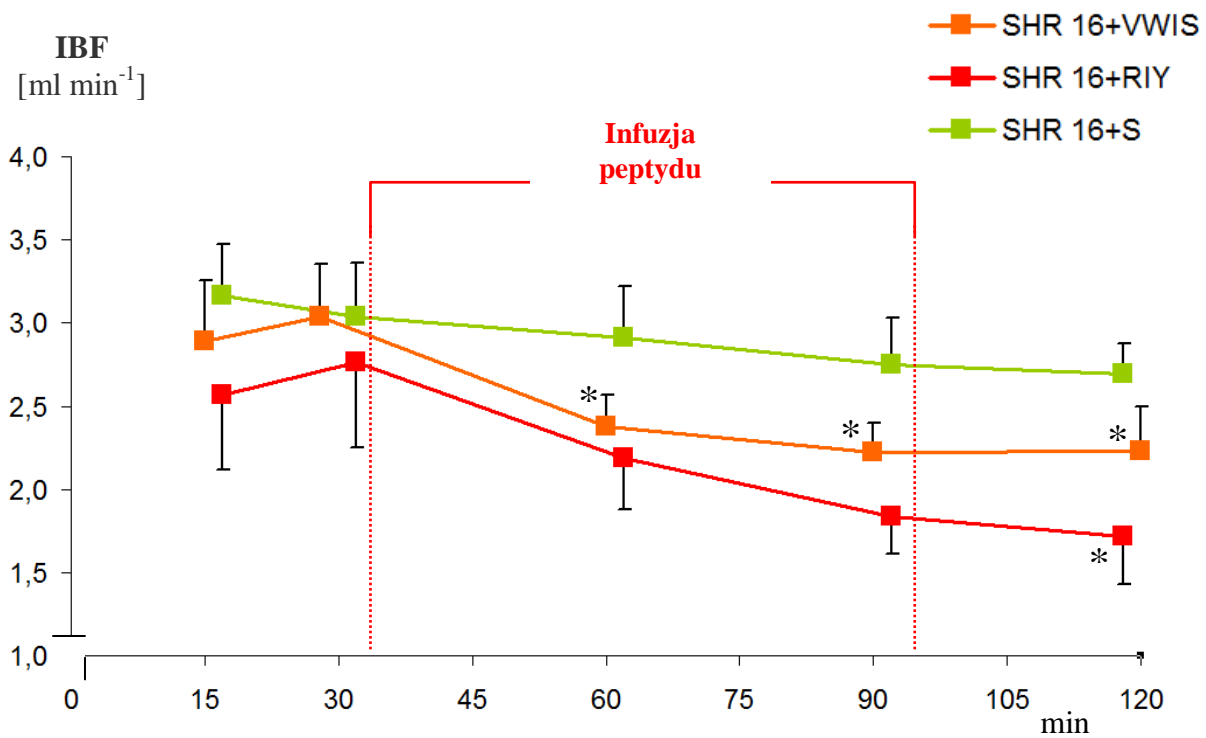
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej.



Ryc. 28. Zmiany stężenia potasu (P_K) i sodu (P_{Na}) w osoczu u szczurów otrzymujących peptyd Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna (SHR 16+VWIS) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 16+S).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 7+VWIS $n=6$; SHR 7+S $n=4$.

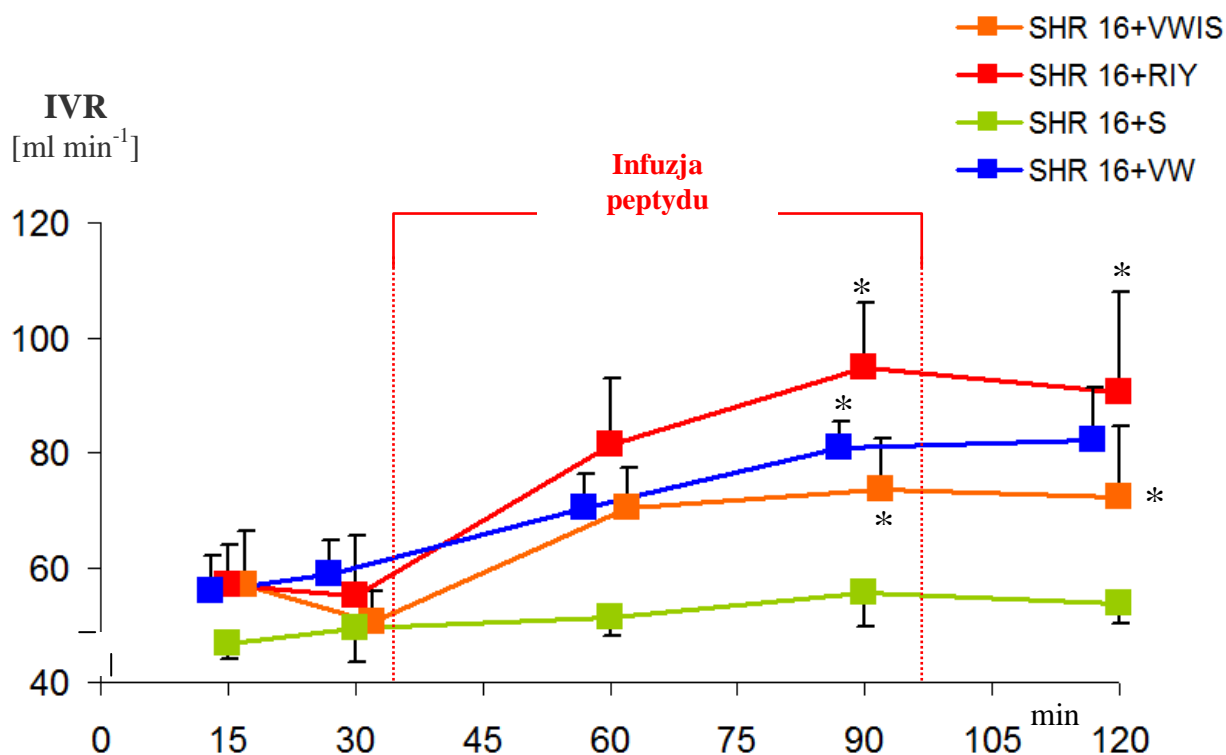
* – znamienne różne od wartości w okresie kontrolnym (K1) przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 29. Zmiany w przepływie krwi przez tętnicę biodrową (IBF) u szczurów otrzymujących peptyd Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna (SHR 16+VWIS), Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna (SHR 16+RIY) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 16+S).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+VWIS n=6; dla grupy SHR 16+RIY n=4; SHR 16+S n=5.

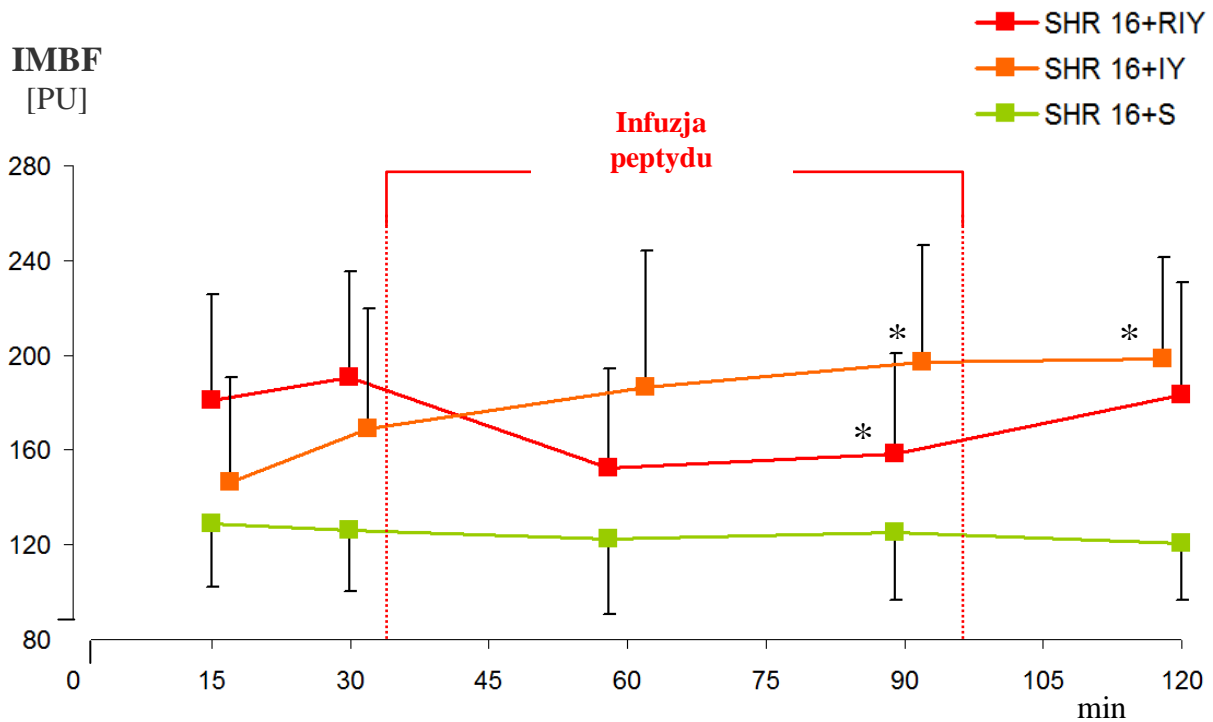
* – znamienne różnie od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 30. Zmiany oporu naczyniowego w obszarze krążenia zaopatrywanym przez tętnicę biodrową (IVR) u szczurów otrzymujących peptyd Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna (SHR 16+VWIS), Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna (SHR 16+RIY), Walina-Tryptofan (SHR 16+VW) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 16+S).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+VWIS n=6; dla grupy SHR 16+RIY n=4; SHR 16+VW n=5; SHR 16+S n=5.

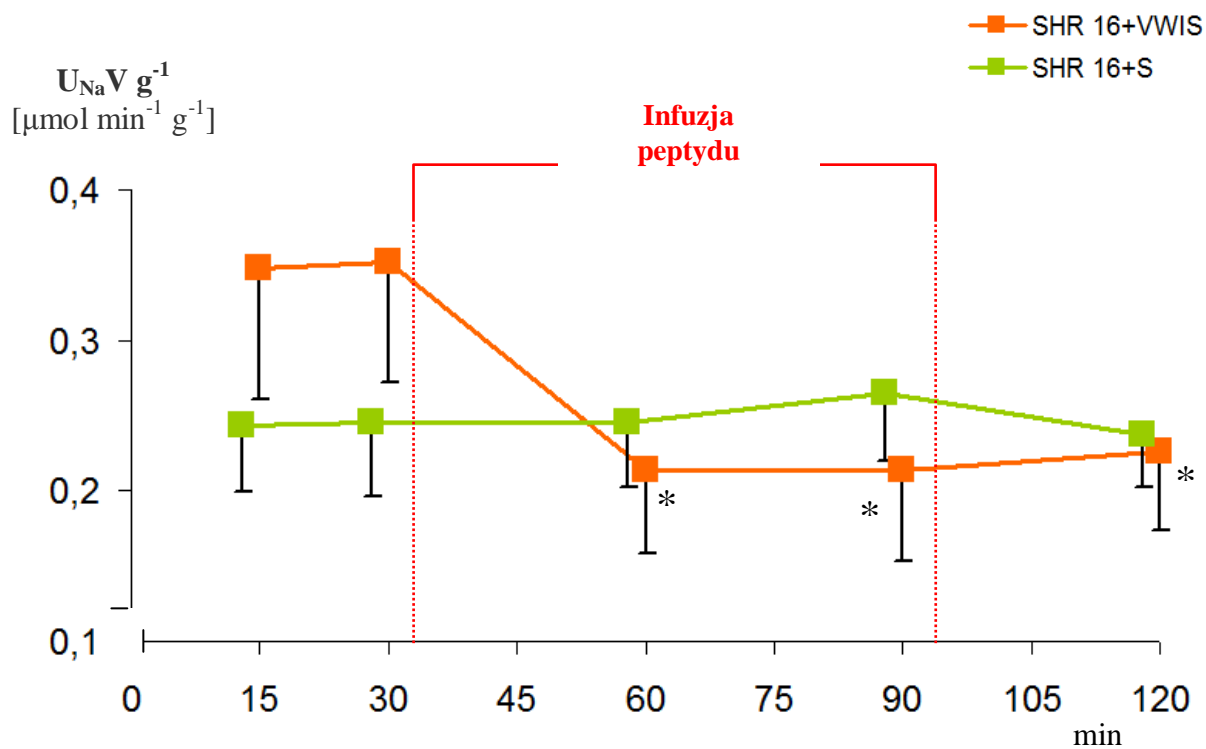
* – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 31. Zmiany w przepływie przez rdzeń wewnętrzny nerki (IMBF) u szczurów otrzymujących peptyd Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna (SHR 16+RIY), Izoleucyna-Tyrozyna (SHR 16+IY) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 16+S).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+RIY n=5; dla grupy SHR 16+IY n=4; SHR 16+S n=5.

* – znamienne różnie od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.



Ryc. 32. Zmiany wydalania sodu (U_{NaV} g^{-1}) u szczurów otrzymujących peptyd Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna (SHR 16+VWIS) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną (SHR 16+S).

Wartości średnie \pm SEM, dla grupy SHR 16+VWIS $n=6$; dla grupy SHR 16+S $n=4$.

* – znamienne różnie od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej.

4. Całościowe zestawienie zgromadzonych wyników

Tabela. 1. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup: UNX HS+C, UNX HS+CH, 2K1C+C, 2K1C+CH.

Grupy doświadczalne: UNX HS+C - model nadciśnienia zależny od ekspozycji na wysoką podaż sodu + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (n=6-8); UNX HS+CH – model nadciśnienia zależny od ekspozycji na wysoką podaż sodu + infuzja chymostatyny (n=5-6); 2K1C+C – model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego (tzw. model Goldblatta) + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (n=7-8); 2K1C+CH – model nadciśnienia naczyniowo-nerkowego (tzw. model Goldblatta) + infuzja chymostatyny (n=7-9); **Parametry:** MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; HR – częstość skurczów serca; P_{Na} – stężenie sodu w osoczu; P_K – stężenie potasu w osoczu; P_{osm} - osmolalność osocza; IBF - przepływ krwi przez tętnicę biodrową; IVR - opór naczyniowy w obrębie krążenia kończyny dolnej; RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę; RVR – nerkowy opór naczyniowy; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki; GFR - filtracja kłębuszkowa; $V g^{-1}$ - wydalanie moczu; $U_{Na}V g^{-1}$ – wydalanie sodu z moczem; $U_KV g^{-1}$ - wydalanie potasu z moczem; $U_{osm}V g^{-1}$ - wydalanie substancji osmotycznie czynnych z moczem; Ang II – poziom angiotensyny II w przeliczeniu na ml (osocze)/ gram nerki (tkanki). **Wartości i poziom istotności:** Wartości średnie \pm SEM; * – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej; # – znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy $p < 0,05$ lub mniej (test t Studenta).

Parametr	Okres [min]	UNX HS+C	UNX HS+CH	2K1C+C	2K1C+CH
MABP [mmHg]	0 - 15	131 ± 4	136 ± 4	139 ± 8	143 ± 6
	15 - 30	132 ± 5	138 ± 3	138 ± 8	142 ± 6
	30 - 60	134 ± 4	136 ± 6	138 ± 8	143 ± 9
	60 - 90	131 ± 6	134 ± 8	135 ± 8	144 ± 9
	90 - 120	132 ± 6	131 ± 8	133 ± 7	136 ± 9
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	0 - 15	314 ± 19	348 ± 36	379 ± 12	381 ± 8
	15 - 30	304 ± 20	367 ± 17	377 ± 10	382 ± 9
	30 - 60	325 ± 17	376 ± 20	373 ± 12	373 ± 9
	60 - 90	311 ± 20	329 ± 38	366 ± 13 *	354 ± 11 *
	90 - 120	300 ± 23	316 ± 35	363 ± 12*	364 ± 14
P _{Na} [μmol l ⁻¹]	30	144 ± 2,0	149 ± 1,0	143 ± 1,0	144 ± 1,0
	90	143 ± 2,0	149 ± 2,0	142 ± 1,0	144 ± 2,0
	120	144 ± 2,0	151 ± 1,0	143 ± 1,0	145 ± 1,0
P _K [μmol l ⁻¹]	30	3,5 ± 0,3	4,0 ± 0,4	3,9 ± 0,3	3,7 ± 0,2
	90	3,5 ± 0,3	4,0 ± 0,4	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,2
	120	4,0 ± 0,4*	4,9 ± 0,4*	4,3 ± 0,4*	4,4 ± 0,2*
P _{osm} [mOsm kg ⁻¹]	30	303 ± 4,0	312 ± 9,0	303 ± 4,0	298 ± 2,0
	90	305 ± 4,0	309 ± 4,0	303 ± 4,0	299 ± 2,0
	120	305 ± 4,0	309 ± 7,0	302 ± 4,0	298 ± 3,0
IBF [ml min ⁻¹]	0 - 15	4,7 ± 0,5	5,1 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,8 ± 0,7
	15 - 30	4,7 ± 0,5	4,6 ± 0,4	4 ± 0,4	4,5 ± 0,6
	30 - 60	4,2 ± 0,5	3,9 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,9 ± 0,5
	60 - 90	4,0 ± 0,5 *	3,5 ± 0,2 *	3,4 ± 0,2 *	3,3 ± 0,3 *
	90 - 120	3,7 ± 0,5*	3,1 ± 0,2*	3,4 ± 0,3*	3,1 ± 0,3*

Parametr	Okres [min]	UNX HS+C	UNX HS+CH	2K1C+C	2K1C+CH
IVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹]	0 - 15	31 ± 5	28 ± 3	34 ± 5	40 ± 7
	15 - 30	32 ± 5	31 ± 3	37 ± 5	40 ± 6
	30 - 60	37 ± 7	35 ± 3	39 ± 5	46 ± 6
	60 - 90	38 ± 8*	39 ± 4	41 ± 5	52 ± 6*
	90 - 120	42 ± 8*	43 ± 5*	42 ± 6	53 ± 6*
RBF [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	6,9 ± 1,1	6 ± 0,9	9,3 ± 1,1	8,9 ± 0,8
	15 - 30	6,8 ± 1,1	5,8 ± 0,8	9,5 ± 1,3	8,2 ± 0,8
	30 - 60	6,5 ± 1,2	5,2 ± 0,8	9,5 ± 1,4	8 ± 0,8
	60 - 90	6,4 ± 1,4	5,1 ± 0,7	9,4 ± 1,4	7,4 ± 0,9
	90 - 120	6,3 ± 1,5	5 ± 0,7	8,8 ± 1,4*	6,8 ± 0,9*
RVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	23 ± 4	24 ± 2	27 ± 7	31 ± 2 [#]
	15 - 30	24 ± 4	25 ± 3	27 ± 7	35 ± 2 [#]
	30 - 60	27 ± 6	29 ± 5	27 ± 7	37 ± 3
	60 - 90	27 ± 6	29 ± 5	28 ± 7	44 ± 5*
	90 - 120	28 ± 7	29 ± 6	30 ± 8	53 ± 9*
CBF [PU]	0 - 15	769 ± 63	689 ± 83	643 ± 54	552 ± 30
	15 - 30	768 ± 72	686 ± 72	658 ± 57	516 ± 30
	30 - 60	752 ± 59	660 ± 64	647 ± 56	520 ± 32
	60 - 90	731 ± 89	659 ± 61	642 ± 55	482 ± 51
	90 - 120	738 ± 99	646 ± 67	633 ± 52	431 ± 58
OMBF [PU]	0 - 15	258 ± 32	316 ± 25	243 ± 27	271 ± 17
	15 - 30	255 ± 31	332 ± 28	234 ± 28	252 ± 12
	30 - 60	249 ± 30	334 ± 61	216 ± 26	235 ± 13
	60 - 90	233 ± 34	330 ± 60	214 ± 27*	220 ± 9*
	90 - 120	211 ± 31	335 ± 84	218 ± 27*	203 ± 14*

Parametr	Okres [min]	UNX HS+C	UNX HS+CH	2K1C+C	2K1C+CH
IMBF [PU]	0 - 15	185 ± 42	201 ± 41	206 ± 43	193 ± 25
	15 - 30	177 ± 29	197 ± 36	197 ± 36	190 ± 25
	30 - 60	174 ± 29	150 ± 30*	199 ± 40	179 ± 21
	60 - 90	162 ± 26	133 ± 24*	199 ± 38	174 ± 19
	90 - 120	156 ± 29	139 ± 31*	190 ± 33	169 ± 19*
GFR [ml min ⁻¹]	0 - 15	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,3
	15 - 30	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,3
	30 - 60	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,4
	60 - 90	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,4
	90 - 120	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,4
V g ⁻¹ [μl min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	11 ± 2,2	8,5 ± 2,3	10,7 ± 1,3	4,7 ± 1,4
	15 - 30	13 ± 3,4	8,6 ± 2,4	11,1 ± 1,4	3,4 ± 0,7
	30 - 60	13 ± 2,7	6,7 ± 1,7	11,7 ± 1,9	3,0 ± 0,6
	60 - 90	12 ± 2,6	7,7 ± 1,6	11,1 ± 2,7	2,5 ± 0,5
	90 - 120	11 ± 2,7	6,5 ± 0,7	8,8 ± 3,2	3,1 ± 0,6
U _{Na} V g ⁻¹ [μmol min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	2,2 ± 0,5	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,4	0,3 ± 0,1
	15 - 30	2,5 ± 0,7	1,8 ± 0,6	1,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1
	30 - 60	2,7 ± 0,6	1,3 ± 0,4	1,8 ± 0,4	0,3 ± 0,1
	60 - 90	2,6 ± 0,7	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1
	90 - 120	2,5 ± 0,8	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,4	0,3 ± 0,1
U _K V g ⁻¹ [μmol min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2
	15 - 30	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,3
	30 - 60	1,1 ± 0,1*	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,3
	60 - 90	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,4
	90 - 120	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2*	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,3

Parametr	Okres [min]	UNX HS+C	UNX HS+CH	2K1C+C	2K1C+CH
	0 - 15	8,9 ± 1,1	7,8 ± 1,9	9,3 ± 1,3	4,5 ± 1,2
	15 - 30	10,2 ± 1,4	8,1 ± 2,1	9,5 ± 1,1	3,4 ± 0,7
$U_{osm} V g^{-1}$ [$\mu Osm min^{-1} g^{-1}$]	30 - 60	11,5 ± 1,9	6,2 ± 1,5	9,8 ± 1,2	3,1 ± 0,7
	60 - 90	8,9 ± 1,7*	7,1 ± 1,1	9,2 ± 1,2	2,5 ± 0,8
	90 - 120	7,5 ± 1,7*	6,2 ± 0,4	7,6 ± 1,6*	3,2 ± 1
Ang II(osocze) [ng ml ⁻¹]	> 120	1,36 ± 0,39	0,13 ± 0,01 [#]	2,28 ± 0,40	0,75 ± 0,13 [#]
Ang II (nerka) [ng g ⁻¹]	> 120	6,45 ± 0,83	3,39 ± 0,55 [#]	38,52 ± 1,79 [#]	6,77 ± 4,91 [#]
Ang II (serce) [ng g ⁻¹]	> 120	0,26 ± 0,07	0,38 ± 0,06	3,86 ± 0,95	0,40 ± 0,06 [#]
Ang II (aorta) [ng g ⁻¹]	> 120	4,88 ± 0,85	5,28 ± 1,27	6,28 ± 1,18	8,50 ± 2,23

Tabela. 2. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup: SHR 7+C, SHR 7+CH, SHR 16+C, SHR 16+CH.

Grupy doświadczalne: SHR 7+C - 7-tygodniowe SHR + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (n=6-7); SHR 7+CH - 7-tygodniowe SHR + infuzja chymostatyny (n=7-8); SHR 16+C - 16-tygodniowe SHR + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (n=7-8); SHR 16+CH - 16-tygodniowe SHR + infuzja chymostatyny (n=6-7); **Parametry:** MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; HR – częstość skurczów serca; P_{Na} – stężenie sodu w osoczu; P_K – stężenie potasu w osoczu; P_{osm} - osmolalność osocza; IBF - przepływ krwi przez tętnicę biodrową; IVR - opór naczyniowy w obrębie krążenia kończyny dolnej; RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę; RVR - nerkowy opór naczyniowy; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki; GFR - filtracja kłębuszkowa; $V g^{-1}$ - wydalanie moczu; $U_{Na}V g^{-1}$ – wydalanie sodu z moczem; $U_KV g^{-1}$ - wydalanie potasu z moczem; $U_{osm}V g^{-1}$ - wydalanie substancji osmotycznie czynnych z moczem; Ang II – poziom angiotensyny II w przeliczeniu na ml (osocze)/ gram nerki (tkanki). **Wartości i poziom istotności:** Wartości średnie \pm SEM; * – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej; # – znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy $p<0,05$ lub mniej (test t Studenta).

Parametr	Okres [min]	SHR 7+C	SHR 7+CH	SHR 16+C	SHR 16+CH
MABP [mmHg]	0 - 15	127 ± 4	129 ± 6	154 ± 5	152 ± 4
	15 - 30	128 ± 5	129 ± 7	152 ± 5	154 ± 5
	30 - 60	127 ± 4	129 ± 7	152 ± 5	153 ± 4
	60 - 90	129 ± 4	129 ± 6	151 ± 5	151 ± 5
	90 - 120	129 ± 4	127 ± 6	149 ± 4	145 ± 5 *
	0 - 15	277 ± 29	307 ± 19	333 ± 16	339 ± 11
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	15 - 30	285 ± 26	312 ± 18	332 ± 16	342 ± 8
	30 - 60	301 ± 22	325 ± 13	335 ± 14	324 ± 11
	60 - 90	270 ± 39	326 ± 12	349 ± 7	341 ± 11
	90 - 120	278 ± 36	327 ± 10	342 ± 7	334 ± 8
P_{Na} [μmol l ⁻¹]	30	137 ± 2	139 ± 2	138 ± 3	140 ± 2
	90	138 ± 2	141 ± 3	137 ± 3	141 ± 2
	120	137 ± 1	144 ± 3 *	137 ± 3	140 ± 2
P_K [μmol l ⁻¹]	30	3,4 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,2	3,7 ± 0,2
	90	4,1 ± 0,3 *	4,5 ± 0,4	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,3
	120	4,7 ± 0,4 *	4,6 ± 0,4	4,2 ± 0,2 *	4,4 ± 0,1 *
P_{osm} [mOsm kg ⁻¹]	30	303 ± 9	301 ± 1	310 ± 2	312 ± 4
	90	303 ± 9	299 ± 4	310 ± 1	313 ± 3
	120	308 ± 12	306 ± 3	309 ± 2	317 ± 4
IBF [ml min ⁻¹]	0 - 15	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	3,7 ± 0,4	2,5 ± 0,2
	15 - 30	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,4	3,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3
	30 - 60	2,0 ± 0,3	2,2 ± 0,4	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3
	60 - 90	1,9 ± 0,2 *	1,9 ± 0,3 *	3,2 ± 0,2	2,5 ± 0,3
	90 - 120	1,8 ± 0,3 *	1,7 ± 0,3 *	3,0 ± 0,2	2,4 ± 0,3

Parametr	Okres [min]	SHR 7+C	SHR 7+CH	SHR 16+C	SHR 16+CH
IVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹]	0 - 15	60 ± 7	60 ± 6	48 ± 3	57 ± 3
	15 - 30	62 ± 7	60 ± 8	50 ± 4	60 ± 5
	30 - 60	68 ± 7	67 ± 11	50 ± 4	61 ± 7
	60 - 90	75 ± 9 *	77 ± 11 *	50 ± 4	61 ± 7
	90 - 120	76 ± 9 *	83 ± 12 *	51 ± 4	59 ± 7
RBF [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	2,8 ± 0,4	3,6 ± 0,5	8,4 ± 0,7	5,6 ± 0,9
	15 - 30	2,9 ± 0,4	3,6 ± 0,5	8,4 ± 0,8	5,6 ± 0,9
	30 - 60	2,6 ± 0,5	3,6 ± 0,5	8,6 ± 0,9	5,8 ± 1,0
	60 - 90	2,3 ± 0,6	3,4 ± 0,4	8,2 ± 0,7	5,4 ± 1,0
	90 - 120	2 ± 0,4 *	3,6 ± 0,5	7,7 ± 0,6	4,8 ± 0,9 *
RVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	38 ± 6	29 ± 5	26 ± 2	36 ± 4
	15 - 30	38 ± 7	29 ± 4	26 ± 3	38 ± 5
	30 - 60	42 ± 7	29 ± 4	25 ± 3	36 ± 4
	60 - 90	53 ± 10	30 ± 4	25 ± 2	38 ± 4
	90 - 120	58 ± 11	29 ± 4	27 ± 2	42 ± 5
CBF [PU]	0 - 15	456 ± 34	435 ± 32	494 ± 39	440 ± 50
	15 - 30	467 ± 26	436 ± 34	504 ± 45	443 ± 52
	30 - 60	451 ± 43	426 ± 44	537 ± 60	462 ± 52
	60 - 90	424 ± 38	401 ± 36	495 ± 51	472 ± 46
	90 - 120	406 ± 28	392 ± 32	447 ± 45	438 ± 40
OMBF [PU]	0 - 15	250 ± 33	321 ± 41	250 ± 17	205 ± 25
	15 - 30	246 ± 34	311 ± 35	252 ± 17	207 ± 24
	30 - 60	253 ± 34	286 ± 22	257 ± 20	206 ± 22
	60 - 90	226 ± 39	280 ± 28	265 ± 19 *	208 ± 22
	90 - 120	226 ± 38	275 ± 32 *	253 ± 18	172 ± 19 *

Parametr	Okres [min]	SHR 7+C	SHR 7+CH	SHR 16+C	SHR 16+CH
IMBF [PU]	0 - 15	309 ± 37	238 ± 43	206 ± 16	151 ± 33
	15 - 30	299 ± 33	264 ± 58	209 ± 17	156 ± 31
	30 - 60	311 ± 36	229 ± 42	223 ± 23	153 ± 31
	60 - 90	305 ± 41	223 ± 39	218 ± 18	155 ± 36
	90 - 120	272 ± 41	215 ± 32	234 ± 20	148 ± 27
GFR [ml min ⁻¹]	0 - 15	0,39 ± 0,05	0,40 ± 0,08	0,89 ± 0,18	0,57 ± 0,09
	15 - 30	0,46 ± 0,10	0,34 ± 0,04	0,82 ± 0,20	0,60 ± 0,09
	30 - 60	0,36 ± 0,13	0,31 ± 0,03	0,84 ± 0,14	0,47 ± 0,07
	60 - 90	0,26 ± 0,10 *	0,24 ± 0,03 *	0,81 ± 0,15	0,43 ± 0,10
	90 - 120	0,26 ± 0,09 *	0,25 ± 0,03 *	0,62 ± 0,15	0,41 ± 0,06 *
V g ⁻¹ [μl min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	3,9 ± 1,1	2,9 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,1 ± 0,6
	15 - 30	3,8 ± 0,9	3,9 ± 0,8	3,1 ± 0,5	3,4 ± 0,6
	30 - 60	3,5 ± 0,9	4,1 ± 0,8	3,3 ± 0,5	2,9 ± 0,4
	60 - 90	3,1 ± 1,0	3,8 ± 1,3	3,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3
	90 - 120	2,7 ± 0,8	3,0 ± 0,9	2,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3 *
UNaV g ⁻¹ [μmol min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,30 ± 0,09	0,40 ± 0,05
	15 - 30	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,25 ± 0,08	0,42 ± 0,04
	30 - 60	0,14 ± 0,01	0,41 ± 0,22	0,27 ± 0,07	0,26 ± 0,04
	60 - 90	0,13 ± 0,02	0,58 ± 0,41	0,26 ± 0,07	0,14 ± 0,04 *
	90 - 120	0,12 ± 0,04	0,46 ± 0,32	0,17 ± 0,05	0,10 ± 0,03 *
U _K V g ⁻¹ [μmol min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	0,42 ± 0,14	0,44 ± 0,12	0,50 ± 0,22	0,40 ± 0,04
	15 - 30	0,45 ± 0,01	0,57 ± 0,15	0,49 ± 0,26	0,37 ± 0,02
	30 - 60	0,51 ± 0,13	1,49 ± 0,81	0,48 ± 0,23	0,32 ± 0,06
	60 - 90	0,51 ± 0,12	1,17 ± 0,49	0,54 ± 0,24	0,29 ± 0,10
	90 - 120	0,48 ± 0,16	0,86 ± 0,38	0,51 ± 0,29	0,20 ± 0,09

Parametr	Okres [min]	SHR 7+C	SHR 7+CH	SHR 16+C	SHR 16+CH
	0 - 15	2,6 ± 0,4	2,8 ± 0,4	4,5 ± 0,6	2,8 ± 0,6
	15 - 30	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,5	4,2 ± 0,7	3,3 ± 0,8
$U_{osm} V g^{-1}$ [$\mu Osm min^{-1} g^{-1}$]	30 - 60	2,7 ± 0,7	3,5 ± 0,4	4,1 ± 0,6	3,0 ± 0,7
	60 - 90	2,0 ± 0,6	2,6 ± 0,5	4,0 ± 0,6	2,5 ± 0,7
	90 - 120	1,7 ± 0,5	2,1 ± 0,2	3,4 ± 0,6	2,0 ± 0,6
Ang II(osocze) [ng ml ⁻¹]	> 120	1,30 ± 0,34	1,85 ± 0,78	2,95 ± 0,35	0,83 ± 0,14 #
Ang II (nerka) [ng g ⁻¹]	> 120	25,96 ± 5,59	19,90 ± 2,72	61,99 ± 4,33	17,78 ± 1,60 #
Ang II (serce) [ng g ⁻¹]	> 120	0,35 ± 0,03	0,19 ± 0,01 #	0,38 ± 0,06	0,18 ± 0,02 #
Ang II (aorta) [ng g ⁻¹]	> 120	13,36 ± 3,74	8,14 ± 0,55	6,81 ± 0,96	4,14 ± 0,70 #

Tabela. 3. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup: SHR 16+CH+K, SHR 16+C, SHR+CH.

Grupy doświadczalne: SHR 16+CH+K – 16-tygodniowe SHR + infuzja kaptoprylu na tle chymostatyny (n=8); SHR 16+C – 16-tygodniowe SHR + infuzja rozpuszczalnika chymostatyny (n=7-8); SHR 16+CH – 16-tygodniowe SHR + infuzja chymostatyny (n=7-8); **Parametry:** MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; HR – częstość skurczów serca; P_{Na} – stężenie sodu w osoczu; P_K – stężenie potasu w osoczu; P_{osm} - osmolalność osocza; IBF - przepływ krwi przez tętnicę biodrową; IVR - opór naczyniowy w obrębie krążenia kończyny dolnej; RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę; RVR – nerkowy opór naczyniowy; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki; GFR - filtracja kłębuszkowa; $V\ g^{-1}$ - wydalanie moczu; $U_{Na}V\ g^{-1}$ – wydalanie sodu z moczem; $U_KV\ g^{-1}$ - wydalanie potasu z moczem; $U_{osm}V\ g^{-1}$ - wydalanie substancji osmotycznie czynnych z moczem; Ang II – poziom angiotensyny II w przeliczeniu na ml (osocze)/ gram nerki (tkanki). **Wartości i poziom istotności:** Wartości średnie \pm SEM; * – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej (test t Studenta); # – znamienne różne od wartości dla grupy kontrolnej przy $p < 0,05$ lub mniej (test *post-hoc* Tukey'a); ^ – znamienne różne od wartości dla grupy SHR 16+CH przy $p < 0,05$ lub mniej (test *post-hoc* Tukey'a).

Parametr	Okres [min]	SHR 16+CH+K	SHR 16+C	SHR 16+CH
MABP [mmHg]	0 - 15	163 ± 3	154 ± 5	152 ± 4
	15 - 30	165 ± 4	152 ± 5	154 ± 5
	30 - 60	167 ± 3	152 ± 5	153 ± 4
	60 - 90	163 ± 7	151 ± 5	151 ± 5
	90 - 120	149 ± 5 *	149 ± 4	145 ± 5 *
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	0 - 15	324 ± 11	333 ± 16	339 ± 11
	15 - 30	316 ± 15	332 ± 16	342 ± 8
	30 - 60	312 ± 15	335 ± 14	324 ± 11
	60 - 90	307 ± 16	349 ± 7	341 ± 11
	90 - 120	306 ± 15	342 ± 7	334 ± 8
P _{Na} [μmol l ⁻¹]	30	152 ± 1	138 ± 3	140 ± 2
	90	152 ± 1	137 ± 3	141 ± 2
	120	152 ± 1	137 ± 3	140 ± 2
P _K [μmol l ⁻¹]	30	4,1 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,7 ± 0,2
	90	4,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,3
	120	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,2 *	4,4 ± 0,1 *
P _{osm} [mOsm kg ⁻¹]	30	301 ± 1	310 ± 2	312 ± 4
	90	304 ± 1 *	310 ± 1	313 ± 3
	120	306 ± 1 *	309 ± 2	317 ± 4
IBF [ml min ⁻¹]	0 - 15	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,4	2,5 ± 0,2
	15 - 30	3,3 ± 0,3	3,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3
	30 - 60	3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3
	60 - 90	2,8 ± 0,2 *	3,2 ± 0,2	2,5 ± 0,3
	90 - 120	2,5 ± 0,2 *	3,0 ± 0,2	2,4 ± 0,3

Parametr	Okres [min]	SHR 16+CH+K	SHR 16+C	SHR 16+CH
IVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹]	0 - 15	50 ± 4	48 ± 3	57 ± 3
	15 - 30	52 ± 4	50 ± 4	60 ± 5
	30 - 60	57 ± 5	50 ± 4	61 ± 7
	60 - 90	61 ± 6	50 ± 4	61 ± 7
	90 - 120	63 ± 5	51 ± 4	59 ± 7
RBF [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	7,7 ± 1,0	8,4 ± 0,7	5,6 ± 0,9
	15 - 30	7,8 ± 1,0	8,4 ± 0,8	5,6 ± 0,9
	30 - 60	7,8 ± 0,9	8,6 ± 0,9	5,8 ± 1,0
	60 - 90	8,9 ± 1,8	8,2 ± 0,7	5,4 ± 1,0
	90 - 120	9,0 ± 1,6	7,7 ± 0,6	4,8 ± 0,9 *
RVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	41 ± 6	26 ± 2	36 ± 4
	15 - 30	41 ± 6	26 ± 3	38 ± 5
	30 - 60	44 ± 8	25 ± 3	36 ± 4
	60 - 90	45 ± 11	25 ± 2	38 ± 4
	90 - 120	36 ± 6 *	27 ± 2	42 ± 5
CBF [PU]	0 - 15	485 ± 40	494 ± 39	440 ± 50
	15 - 30	476 ± 42	504 ± 45	443 ± 52
	30 - 60	451 ± 43	537 ± 60	462 ± 52
	60 - 90	462 ± 39	495 ± 51	472 ± 46
	90 - 120	490 ± 39	447 ± 45	438 ± 40
OMBF [PU]	0 - 15	263 ± 21	250 ± 17	205 ± 25
	15 - 30	267 ± 23	252 ± 17	207 ± 24
	30 - 60	254 ± 21	257 ± 20	206 ± 22
	60 - 90	261 ± 25	265 ± 19 *	208 ± 22
	90 - 120	267 ± 24	253 ± 18	172 ± 19 *

Parametr	Okres [min]	SHR 16+CH+K	SHR 16+C	SHR 16+CH
IMBF [PU]	0 - 15	204 ± 39	206 ± 16	151 ± 33
	15 - 30	204 ± 40	209 ± 17	156 ± 31
	30 - 60	207 ± 50	223 ± 23	153 ± 31
	60 - 90	210 ± 49	218 ± 18	155 ± 36
	90 - 120	205 ± 47	234 ± 20	148 ± 27
GFR [ml min ⁻¹]	0 - 15	0,99 ± 0,05	0,89 ± 0,18	0,57 ± 0,09
	15 - 30	0,96 ± 0,05	0,82 ± 0,20	0,60 ± 0,09
	30 - 60	0,70 ± 0,07 *	0,84 ± 0,14	0,47 ± 0,07
	60 - 90	0,66 ± 0,04 *	0,81 ± 0,15	0,43 ± 0,10
	90 - 120	0,56 ± 0,05 *	0,62 ± 0,15	0,41 ± 0,06 *
V g ⁻¹ [μl min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	3,0 ± 0,2	3,5 ± 0,5	3,1 ± 0,6
	15 - 30	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,5	3,4 ± 0,6
	30 - 60	2,8 ± 0,3	3,3 ± 0,5	2,9 ± 0,4
	60 - 90	2,9 ± 0,3	3,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3
	90 - 120	2,3 ± 0,2 *	2,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3 *
U _{Na} V g ⁻¹ [μmol min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,09	0,40 ± 0,05
	15 - 30	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,08	0,42 ± 0,04
	30 - 60	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,07	0,26 ± 0,04
	60 - 90	0,29 ± 0,04	0,26 ± 0,07	0,14 ± 0,04 *
	90 - 120	0,16 ± 0,02 *	0,17 ± 0,05	0,10 ± 0,03 *
U _K V g ⁻¹ [μmol min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	0,25 ± 0,04	0,501 ± 0,22	0,40 ± 0,04
	15 - 30	0,26 ± 0,06	0,49 ± 0,26	0,37 ± 0,02
	30 - 60	0,27 ± 0,07	0,48 ± 0,23	0,32 ± 0,06
	60 - 90	0,34 ± 0,08	0,54 ± 0,24	0,29 ± 0,10
	90 - 120	0,29 ± 0,07	0,51 ± 0,29	0,20 ± 0,09

Parametr	Okres [min]	SHR 16+CH+K	SHR 16+C	SHR 16+CH
$U_{osm} V g^{-1}$ [$\mu Osm min^{-1} g^{-1}$]	0 - 15	2,8 ± 0,3	4,5 ± 0,6	2,8 ± 0,6
	15 - 30	2,7 ± 0,3	4,2 ± 0,7	3,3 ± 0,8
	30 - 60	2,6 ± 0,2	4,1 ± 0,6	3,0 ± 0,7
	60 - 90	3,0 ± 0,3	4,0 ± 0,6	2,5 ± 0,7
	90 - 120	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,6	2,0 ± 0,6
Ang II (osocze) [ng ml ⁻¹]	> 120	0,20 ± 0,01 #^	2,95 ± 0,35	0,83 ± 0,14 #
Ang II (nerka) [ng g ⁻¹]	> 120	5,16 ± 0,40 #^	61,99 ± 4,33	17,78 ± 1,60 #
Ang II (serce) [ng g ⁻¹]	> 120	0,23 ± 0,03 #	0,38 ± 0,06	0,18 ± 0,02 #
Ang II (aorta) [ng g ⁻¹]	> 120	4,28 ± 0,50 #	6,81 ± 0,96	4,14 ± 0,70 #

Tabela. 4. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup: SHR 7+S, SHR 7+VW, SHR 16+S, SHR 16+VW.

Grupy doświadczalne: SHR 7+S - 7-tygodniowe SHR + infuzja soli fizjologicznej (n=4); SHR 7+VW - 7-tygodniowe SHR + infuzja peptydu VW (Walina-Tryptofan; n=4); SHR 16+S - 16-tygodniowe SHR + infuzja soli fizjologicznej (n=5); SHR 16+VW - 16-tygodniowe SHR + infuzja peptydu VW (Walina-Tryptofan; n=5); **Parametry:** MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; HR – częstość skurczów serca; P_{Na} – stężenie sodu w osoczu; P_K – stężenie potasu w osoczu; P_{osm} – osmolalność osocza; IBF - przepływ krwi przez tętnicę biodrową; IVR - opór naczyniowy w obrębie krążenia kończyny dolnej; RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę; RVR - nerkowy opór naczyniowy; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki; GFR - filtracja kłębuszkowa; $V g^{-1}$ - wydalanie moczu; $U_{Na}V g^{-1}$ – wydalanie sodu z moczem; $U_KV g^{-1}$ - wydalanie potasu z moczem; $U_{osm}V g^{-1}$ - wydalanie substancji osmotycznie czynnych z moczem; **Wartości i poziom istotności:** Wartości średnie \pm SEM; * – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej (test t Studenta).

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+VW	SHR 16+S	SHR 16+VW
MABP [mmHg]	0 - 15	129 ± 10	135 ± 6	145 ± 8	149 ± 3
	15 - 30	128 ± 9	136 ± 5	144 ± 8	151 ± 3
MABP [mmHg]	30 - 60	126 ± 10	139 ± 6	146 ± 10	161 ± 2
	60 - 90	126 ± 10	143 ± 6	148 ± 12	160 ± 5
MABP [mmHg]	90 - 120	129 ± 10	136 ± 6	144 ± 11	149 ± 3
	0 - 15	361 ± 11	308 ± 23	302 ± 6	328 ± 13
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	15 - 30	351 ± 12	299 ± 19	274 ± 10	329 ± 13
	30 - 60	346 ± 16	288 ± 11	303 ± 11	324 ± 21
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	60 - 90	342 ± 14	300 ± 10	306 ± 4	305 ± 24
	90 - 120	357 ± 10	300 ± 4	292 ± 4	308 ± 22
P _{Na} [μmol l ⁻¹]	30	140 ± 3	143 ± 1	138 ± 2	144 ± 3
	90	142 ± 5	145 ± 1	139 ± 2	143 ± 4
	120	141 ± 3	144 ± 1	139 ± 3	146 ± 2
P _K [μmol l ⁻¹]	30	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,1
	90	4,1 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,2
	120	4,2 ± 0,2	5,0 ± 0,1*	4,8 ± 0,1	4,2 ± 0,3
P _{osm} [mOsm kg ⁻¹]	30	295 ± 6	306 ± 3	291 ± 5	298 ± 2
	90	295 ± 6	305 ± 3	292 ± 6	301 ± 3
	120	296 ± 6	305 ± 2	291 ± 6	305 ± 5

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+VW	SHR 16+S	SHR 16+VW
IBF [ml min ⁻¹]	0 - 15	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,6	3,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3
	15 - 30	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,5	3,0 ± 0,3	2,7 ± 0,2
	30 - 60	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,2
	60 - 90	2,6 ± 0,3	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,3	2,0 ± 0,2*
	90 - 120	2,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2*
IVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹]	0 - 15	51 ± 7	62 ± 13	47 ± 3	56 ± 6
	15 - 30	51 ± 8	70 ± 12	49 ± 6	59 ± 6
	30 - 60	55 ± 12	72 ± 12	51 ± 3	70 ± 6
	60 - 90	53 ± 12	80 ± 11	55 ± 6	81 ± 5*
	90 - 120	52 ± 8	86 ± 11	54 ± 3	82 ± 9
RBF [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	4,4 ± 0,2	5,2 ± 0,4	4,8 ± 0,3	5,9 ± 0,7
	15 - 30	4,2 ± 0,3	5,3 ± 0,5	4,8 ± 0,4	5,8 ± 0,8
	30 - 60	4,1 ± 0,3	5,0 ± 0,3	4,8 ± 0,4	5,3 ± 0,7
	60 - 90	4,4 ± 0,5	5,2 ± 0,4	4,8 ± 0,6	5,3 ± 0,7
	90 - 120	4,6 ± 0,5	5,2 ± 0,4	4,5 ± 0,5	6,1 ± 0,6
RVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	28 ± 3	28 ± 3	39 ± 5	34 ± 6
	15 - 30	30 ± 3	28 ± 2	39 ± 7	36 ± 8
	30 - 60	30 ± 3	30 ± 3	40 ± 6	40 ± 7
	60 - 90	29 ± 3	30 ± 5	40 ± 5	39 ± 6
	90 - 120	28 ± 3*	28 ± 2	42 ± 6	31 ± 5

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+VW	SHR 16+S	SHR 16+VW
CBF [PU]	0 - 15	490 ± 43	589 ± 41	452 ± 27	627 ± 68
	15 - 30	474 ± 38	578 ± 8	473 ± 36	616 ± 80
	30 - 60	445 ± 34	520 ± 53	490 ± 50	568 ± 55
	60 - 90	453 ± 45	537 ± 55	474 ± 66	565 ± 47
OMBf [PU]	90 - 120	468 ± 45	560 ± 51	456 ± 67	633 ± 82
	0 - 15	230 ± 16	258 ± 39	208 ± 34	268 ± 61
	15 - 30	226 ± 10	207 ± 35	230 ± 51	277 ± 66
	30 - 60	239 ± 19	198 ± 31	220 ± 43	252 ± 54
IMBF [PU]	60 - 90	223 ± 3	219 ± 22	235 ± 58	260 ± 48
	90 - 120	231 ± 10	221 ± 13	215 ± 54	298 ± 58
	0 - 15	222 ± 46	241 ± 42	129 ± 27	208 ± 45
	15 - 30	213 ± 42	217 ± 19	126 ± 26	199 ± 37
GFR [ml min ⁻¹]	30 - 60	221 ± 45	192 ± 22	122 ± 32	187 ± 29
	60 - 90	218 ± 41	189 ± 29	125 ± 28	192 ± 29
	90 - 120	223 ± 45	197 ± 30	120 ± 24	207 ± 32
	0 - 15	0,53 ± 0,06	0,4 ± 0,10	0,6 ± 0,10	0,8 ± 0,11
GFR [ml min ⁻¹]	15 - 30	0,52 ± 0,06	0,4 ± 0,10	0,6 ± 0,10	0,7 ± 0,13
	30 - 60	0,51 ± 0,03	0,7 ± 0,18	0,7 ± 0,17	0,8 ± 0,10
	60 - 90	0,53 ± 0,04	0,5 ± 0,19	0,6 ± 0,16	0,7 ± 0,09
	90 - 120	0,48 ± 0,02	0,4 ± 0,11	0,5 ± 0,21	0,7 ± 0,21

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+VW	SHR 16+S	SHR 16+VW
$V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{l min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	2,7 ± 0,6	2,8 ± 0,7	2,6 ± 0,3	3,7 ± 0,5
	15 - 30	2,6 ± 0,6	2,6 ± 0,4	2,7 ± 0,3	3,7 ± 0,7
	30 - 60	2,5 ± 0,4	4,1 ± 1,4	2,7 ± 0,3	4,2 ± 1,0
	60 - 90	2,8 ± 0,4	4,7 ± 1,8	2,9 ± 0,4	4,7 ± 1,1*
	90 - 120	2,4 ± 0,4	3,6 ± 0,8	2,5 ± 0,3	4,2 ± 1,0
$U_{\text{Na}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	0,3 ± 0,10	0,3 ± 0,10	0,24 ± 0,04	0,3 ± 0,10
	15 - 30	0,3 ± 0,10	0,3 ± 0,10	0,25 ± 0,05	0,4 ± 0,11
	30 - 60	0,3 ± 0,11	0,5 ± 0,30	0,25 ± 0,04	0,5 ± 0,22
	60 - 90	0,3 ± 0,10	0,7 ± 0,50	0,27 ± 0,05	0,5 ± 0,20
	90 - 120	0,3 ± 0,09	0,4 ± 0,10	0,24 ± 0,03	0,4 ± 0,18
$U_{\text{K}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	0,25 ± 0,05	0,3 ± 0,11	0,28 ± 0,02	0,5 ± 0,10
	15 - 30	0,25 ± 0,04	0,3 ± 0,13	0,27 ± 0,02	0,5 ± 0,20
	30 - 60	0,25 ± 0,01	0,5 ± 0,26	0,30 ± 0,03	0,6 ± 0,09
	60 - 90	0,31 ± 0,04	0,5 ± 0,28	0,32 ± 0,06	0,7 ± 0,07
	90 - 120	0,30 ± 0,05	0,6 ± 0,19	0,29 ± 0,04	0,7 ± 0,21
$U_{\text{osm}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{Osm min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	2,1 ± 0,3	2,9 ± 0,8	2,1 ± 0,4	4,2 ± 0,8
	15 - 30	2,1 ± 0,4	2,9 ± 0,8	2,2 ± 0,4	4,5 ± 1,0
	30 - 60	2,2 ± 0,2	4,0 ± 1,4	2,5 ± 0,4	5,1 ± 1,0*
	60 - 90	2,5 ± 0,2	4,3 ± 1,9	3,1 ± 0,7	5,5 ± 0,8
	90 - 120	2,3 ± 0,3	3,3 ± 1,1	2,4 ± 0,4	4,8 ± 0,8

Tabela. 5. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup: SHR 7+S, SHR 7+IY, SHR 16+S, SHR 16+IY.

Grupy doświadczalne: SHR 7+S - 7-tygodniowe SHR + infuzja soli fizjologicznej (n=4); SHR 7+IY - 7-tygodniowe SHR + infuzja peptydu IY (Izoleucyna-Tyrozyna; n=4); SHR 16+S - 16-tygodniowe SHR + infuzja soli fizjologicznej (n=5); SHR 16+IY - 16-tygodniowe SHR + infuzja peptydu IY (Izoleucyna-Tyrozyna; n=4); **Parametry:** MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; HR – częstość skurczów serca; P_{Na} – stężenie sodu w osoczu; P_K – stężenie potasu w osoczu; P_{osm} - osmolalność osocza; IBF - przepływ krwi przez tętnicę biodrową; IVR - opór naczyniowy w obrębie krążenia kończyny dolnej; RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę; RVR - nerkowy opór naczyniowy; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki; GFR - filtracja kłębuszkowa; $V\ g^{-1}$ - wydalanie moczu; $U_{Na}V\ g^{-1}$ – wydalanie sodu z moczem; $U_KV\ g^{-1}$ - wydalanie potasu z moczem; $U_{osm}V\ g^{-1}$ - wydalanie substancji osmotycznie czynnych z moczem; **Wartości i poziom istotności:** Wartości średnie \pm SEM; * – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p < 0,05$ lub mniej (test t Studenta).

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+IY	SHR 16+S	SHR 16+IY
MABP [mmHg]	0 - 15	129 ± 10	129 ± 3	145 ± 8	166 ± 8
	15 - 30	128 ± 9	134 ± 3	144 ± 8	169 ± 5
	30 - 60	126 ± 10	135 ± 2	146 ± 10	180 ± 5
	60 - 90	126 ± 10	134 ± 5	148 ± 12	180 ± 5
	90 - 120	129 ± 10	130 ± 2	144 ± 11	178 ± 5
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	0 - 15	361 ± 11	319 ± 15	302 ± 6	323 ± 15
	15 - 30	351 ± 12	311 ± 19	274 ± 10	326 ± 9
	30 - 60	346 ± 16	326 ± 24 *	303 ± 11	338 ± 8
	60 - 90	342 ± 14	324 ± 26	306 ± 4	336 ± 8
	90 - 120	357 ± 10	334 ± 9	292 ± 4	322 ± 8
P _{Na} [μmol l ⁻¹]	30	140 ± 3	143 ± 2	138 ± 2	139 ± 4
	90	142 ± 5	143 ± 1	139 ± 2	141 ± 3
	120	141 ± 3	141 ± 1	139 ± 3	140 ± 4
P _K [μmol l ⁻¹]	30	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1	3,9 ± 0,2
	90	4,1 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,7 ± 0,4
	120	4,2 ± 0,2	3,9 ± 0,2	4,8 ± 0,1	3,8 ± 0,4
P _{osm} [mOsm kg ⁻¹]	30	295 ± 6	294 ± 7	291 ± 5	292 ± 11
	90	295 ± 6	290 ± 8	292 ± 6	294 ± 5
	120	296 ± 6	294 ± 6	291 ± 6	293 ± 5

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+IY	SHR 16+S	SHR 16+IY
IBF [ml min ⁻¹]	0 - 15	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,3	2,7 ± 0,1
	15 - 30	2,6 ± 0,2	2,3 ± 0,4	3,0 ± 0,3	2,5 ± 0,1
	30 - 60	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,9 ± 0,3	2,3 ± 0,1
	60 - 90	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,5	2,8 ± 0,3	2,3 ± 0,1
	90 - 120	2,6 ± 0,2	2,0 ± 0,4*	2,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2
IVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹]	0 - 15	51 ± 7	58 ± 13	47 ± 3	62 ± 5
	15 - 30	51 ± 8	66 ± 15	49 ± 6	69 ± 6
	30 - 60	55 ± 12	73 ± 18	51 ± 3	80 ± 5
	60 - 90	53 ± 12	76 ± 21	55 ± 6	78 ± 4
	90 - 120	52 ± 8	81 ± 25	54 ± 3	83 ± 5
RBF [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	4,4 ± 0,2	4,9 ± 0,5	4,8 ± 0,3	6,8 ± 1,2
	15 - 30	4,2 ± 0,3	4,7 ± 0,5	4,8 ± 0,4	6,6 ± 1,0
	30 - 60	4,1 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,8 ± 0,4	6,8 ± 1,6
	60 - 90	4,4 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,8 ± 0,6	6,6 ± 1,9
	90 - 120	4,6 ± 0,5	5,3 ± 0,5	4,5 ± 0,5	6,3 ± 1,8
RVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	28 ± 3	26 ± 4	39 ± 5	35 ± 8
	15 - 30	30 ± 3	27 ± 4	39 ± 7	37 ± 8
	30 - 60	30 ± 3	28 ± 1	40 ± 6	43 ± 15
	60 - 90	29 ± 3	28 ± 2	40 ± 5	48 ± 20
	90 - 120	28 ± 3*	23 ± 2	42 ± 6	52 ± 23

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+IY	SHR 16+S	SHR 16+IY
CBF [PU]	0 - 15	490 ± 43	586 ± 39	452 ± 27	532 ± 15
	15 - 30	474 ± 38	576 ± 22	473 ± 36	542 ± 27
	30 - 60	445 ± 34	551 ± 52	490 ± 50	579 ± 22
	60 - 90	453 ± 45	547 ± 67	474 ± 66	540 ± 60
OMBF [PU]	90 - 120	468 ± 45	622 ± 45	456 ± 67	558 ± 83
	0 - 15	230 ± 16	249 ± 69	208 ± 34	168 ± 67
	15 - 30	226 ± 10	220 ± 43	230 ± 51	156 ± 70
	30 - 60	239 ± 19	221 ± 46	220 ± 43	159 ± 86
IMBF [PU]	60 - 90	223 ± 3	228 ± 55	235 ± 58	163 ± 84
	90 - 120	231 ± 10	236 ± 51	215 ± 54	176 ± 79
	0 - 15	222 ± 46	209 ± 28	129 ± 27	147 ± 44
	15 - 30	213 ± 42	191 ± 37	126 ± 26	169 ± 50
GFR [ml min ⁻¹]	30 - 60	221 ± 45	184 ± 34	122 ± 32	186 ± 58
	60 - 90	218 ± 41	186 ± 33	125 ± 28	197 ± 49 *
	90 - 120	223 ± 45	189 ± 34	120 ± 24	198 ± 43 *
	0 - 15	0,53 ± 0,06	0,6 ± 0,10	0,6 ± 0,10	0,84 ± 0,09
GFR [ml min ⁻¹]	15 - 30	0,52 ± 0,06	0,6 ± 0,09	0,6 ± 0,10	0,83 ± 0,05
	30 - 60	0,51 ± 0,03	0,6 ± 0,11	0,7 ± 0,17	0,75 ± 0,06
	60 - 90	0,53 ± 0,04	0,6 ± 0,08	0,6 ± 0,16	0,72 ± 0,04
	90 - 120	0,48 ± 0,02	0,6 ± 0,06	0,5 ± 0,21	0,67 ± 0,04

Parametr	Okres [min]	SHR 7+S	SHR 7+IY	SHR 16+S	SHR 16+IY
$V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{l min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	2,7 ± 0,6	2,9 ± 0,6	2,6 ± 0,3	4,7 ± 0,9
	15 - 30	2,6 ± 0,6	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,3	4,6 ± 0,8
	30 - 60	2,5 ± 0,4	3,0 ± 0,7	2,7 ± 0,3	4,3 ± 0,6
	60 - 90	2,8 ± 0,4	2,4 ± 0,3	2,9 ± 0,4	4,4 ± 0,5
	90 - 120	2,4 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,5 ± 0,3	4,2 ± 1,0
$U_{\text{Na}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	0,3 ± 0,10	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,04	0,4 ± 0,07
	15 - 30	0,3 ± 0,10	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,4 ± 0,07
	30 - 60	0,3 ± 0,11	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,4 ± 0,07
	60 - 90	0,3 ± 0,10	0,20 ± 0,01	0,27 ± 0,05	0,4 ± 0,06
	90 - 120	0,3 ± 0,09	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,3 ± 0,01
$U_{\text{K}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	0,25 ± 0,05	0,31 ± 0,07	0,28 ± 0,02	0,6 ± 0,17
	15 - 30	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,07	0,27 ± 0,02	0,6 ± 0,19
	30 - 60	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,07	0,30 ± 0,03	0,6 ± 0,20
	60 - 90	0,31 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,32 ± 0,06	0,7 ± 0,10
	90 - 120	0,30 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,6 ± 0,21
$U_{\text{osm}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{Osm min}^{-1} \text{ g}^{-1}$]	0 - 15	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,5	2,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3
	15 - 30	2,1 ± 0,4	2,4 ± 0,4	2,2 ± 0,4	3,2 ± 0,1
	30 - 60	2,2 ± 0,2	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,4
	60 - 90	2,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2	3,1 ± 0,7	3,0 ± 0,3
	90 - 120	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,6 ± 0,2

Tabela. 6. Zestawienie wyników pomiarów badanych parametrów dla grup: SHR 16+VWIS, SHR 16+RIY, SHR 16+S.

Grupy doświadczalne: SHR 16+VWIS - 16-tygodniowe SHR + infuzja peptydu VWIS (Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna; n=6); SHR 16+RIY - 16-tygodniowe SHR + infuzja peptydu RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; n=4); SHR 16+S - 16-tygodniowe SHR + infuzja soli fizjologicznej (n=5); **Parametry:** MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi; HR – częstość skurczów serca; P_{Na} – stężenie sodu w osoczu; P_K – stężenie potasu w osoczu; P_{osm} - osmolalność osocza; IBF - przepływ krwi przez tętnicę biodrową; IVR - opór naczyniowy w obrębie krążenia kończyny dolnej; RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę; RVR – nerkowy opór naczyniowy; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki; GFR - filtracja kłębuszkowa; $V\ g^{-1}$ - wydalanie moczu; $U_{Na}V\ g^{-1}$ – wydalanie sodu z moczem; $U_KV\ g^{-1}$ - wydalanie potasu z moczem; $U_{osm}V\ g^{-1}$ - wydalanie substancji osmotycznie czynnych z moczem; **Wartości i poziom istotności:** Wartości średnie \pm SEM; * – znamienne różne od wartości w drugim okresie kontrolnym przy $p<0,05$ lub mniej (test t Studenta).

Parametr	Okres [min]	SHR 16+VWIS	SHR 16+RIY	SHR 16+S
MABP [mmHg]	0 - 15	148 ± 4	138 ± 10	145 ± 8
	15 - 30	146 ± 3	138 ± 8	144 ± 8
	30 - 60	162 ± 5 *	168 ± 12 *	146 ± 10
	60 - 90	152 ± 7	166 ± 6 *	148 ± 12
	90 - 120	145 ± 7	140 ± 5	144 ± 11
	0 - 15	315 ± 24	328 ± 15	302 ± 6
HR [częstość skurczów serca min ⁻¹]	15 - 30	323 ± 19	341 ± 19	274 ± 10
	30 - 60	295 ± 18	356 ± 8	303 ± 11
	60 - 90	294 ± 18	314 ± 44	306 ± 4
	90 - 120	267 ± 9	299 ± 36	292 ± 4
P _{Na} [μmol l ⁻¹]	30	134 ± 2	134 ± 1	138 ± 2
	90	137 ± 1	133 ± 2	139 ± 2
	120	141 ± 1 *	136 ± 1	139 ± 3
P _K [μmol l ⁻¹]	30	4,3 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,3 ± 0,1
	90	4,4 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,2
	120	4,9 ± 0,2 *	4,1 ± 0,2	4,8 ± 0,1
P _{osm} [mOsm kg ⁻¹]	30	284 ± 3	285 ± 4	291 ± 5
	90	286 ± 2	286 ± 6	292 ± 6
	120	287 ± 3 *	289 ± 7	291 ± 6

Parametr	Okres [min]	SHR 16+VWIS	SHR 16+RIY	SHR 16+S
IBF [ml min ⁻¹]	0 - 15	2,9 ± 0,4	2,6 ± 0,5	3,2 ± 0,3
	15 - 30	3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,5	3,0 ± 0,3
	30 - 60	2,4 ± 0,2 *	2,2 ± 0,3	2,9 ± 0,3
	60 - 90	2,2 ± 0,2 *	1,8 ± 0,2	2,8 ± 0,3
	90 - 120	2,2 ± 0,3 *	1,7 ± 0,3 *	2,7 ± 0,2
	0 - 15	57 ± 9	57 ± 7	47 ± 3
IVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹]	15 - 30	50 ± 5	55 ± 10	49 ± 6
	30 - 60	70 ± 7	81 ± 12	51 ± 3
	60 - 90	74 ± 9 *	95 ± 11 *	55 ± 6
	90 - 120	72 ± 12 *	91 ± 17 *	54 ± 3
RBF [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	0 - 15	5,5 ± 0,7	6,0 ± 1,2	4,8 ± 0,3
	15 - 30	5,8 ± 0,7	6,8 ± 1,4	4,8 ± 0,4
	30 - 60	5,8 ± 0,7	5,4 ± 1,1	4,8 ± 0,4
	60 - 90	6,1 ± 0,6	5,3 ± 1,1	4,8 ± 0,6
	90 - 120	6,1 ± 0,7	7,3 ± 2,4	4,5 ± 0,5
	0 - 15	44 ± 6	39 ± 12	39 ± 5
RVR [mmHg ml ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹]	15 - 30	40 ± 5	34 ± 11	39 ± 7
	30 - 60	47 ± 6	49 ± 10	40 ± 6
	60 - 90	41 ± 4	50 ± 10	40 ± 5
	90 - 120	40 ± 5	34 ± 8	42 ± 6

Parametr	Okres [min]	SHR 16+VWIS	SHR 16+RIY	SHR 16+S
CBF [PU]	0 - 15	421 ± 34	469 ± 23	452 ± 27
	15 - 30	446 ± 33	516 ± 47	473 ± 36
	30 - 60	426 ± 40	435 ± 77	490 ± 50
	60 - 90	448 ± 37	419 ± 84	474 ± 66
	90 - 120	447 ± 43	455 ± 62	456 ± 67
	0 - 15	237 ± 34	294 ± 18	208 ± 34
OMBF [PU]	15 - 30	234 ± 38	287 ± 11	230 ± 51
	30 - 60	208 ± 34	235 ± 31	220 ± 43
	60 - 90	237 ± 42	241 ± 32	235 ± 58
	90 - 120	249 ± 32	273 ± 30	215 ± 54
	0 - 15	119 ± 17	181 ± 44	129 ± 27
	15 - 30	130 ± 29	190 ± 45	126 ± 26
IMBF [PU]	30 - 60	133 ± 27	152 ± 42	122 ± 32
	60 - 90	144 ± 28	158 ± 42 *	125 ± 28
	90 - 120	147 ± 31	183 ± 48	120 ± 24
	0 - 15	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	15 - 30	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
GFR [ml min ⁻¹]	30 - 60	0,7 ± 0,1 *	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2
	60 - 90	0,6 ± 0,1 *	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2
	90 - 120	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1 *	0,5 ± 0,2

Parametr	Okres [min]	SHR 16+VWIS	SHR 16+RIY	SHR 16+S
$V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$]	0 - 15	4,2 ± 0,7	2,3 ± 0,4	2,6 ± 0,3
	15 - 30	4,2 ± 0,6	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,3
	30 - 60	2,9 ± 0,3 *	4,3 ± 0,6	2,7 ± 0,3
	60 - 90	2,6 ± 0,4	4,5 ± 0,5 *	2,9 ± 0,4
	90 - 120	3,1 ± 0,4 *	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,3
$U_{\text{Na}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$]	0 - 15	0,3 ± 0,09	0,22 ± 0,05	0,24 ± 0,04
	15 - 30	0,4 ± 0,07	0,26 ± 0,07	0,25 ± 0,05
	30 - 60	0,2 ± 0,10 *	0,45 ± 0,07	0,25 ± 0,04
	60 - 90	0,2 ± 0,08 *	0,47 ± 0,07	0,27 ± 0,05
	90 - 120	0,2 ± 0,06 *	0,27 ± 0,04	0,24 ± 0,03
$U_{\text{K}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$]	0 - 15	0,4 ± 0,09	0,23 ± 0,03	0,28 ± 0,02
	15 - 30	0,4 ± 0,10	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,02
	30 - 60	0,3 ± 0,11	0,52 ± 0,09	0,30 ± 0,03
	60 - 90	0,3 ± 0,07	0,56 ± 0,10	0,32 ± 0,06
	90 - 120	0,4 ± 0,10	0,42 ± 0,09	0,29 ± 0,04
$U_{\text{osm}} V \text{ g}^{-1}$ [$\mu\text{Osm min}^{-1} \text{g}^{-1}$]	0 - 15	3,5 ± 0,9	3,6 ± 0,8	2,1 ± 0,4
	15 - 30	3,4 ± 0,8	4,1 ± 0,6	2,2 ± 0,4
	30 - 60	2,8 ± 0,5	4,2 ± 0,5	2,5 ± 0,4
	60 - 90	2,9 ± 0,2	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,7
	90 - 120	2,9 ± 0,4	3,2 ± 0,9	2,4 ± 0,4

5. Podsumowanie wyników

Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę istotnie wpłynęło na wartości ciśnienia tętniczego krwi jedynie w genetycznym modelu nadciśnienia u szczurów w fazie utrwalonego nadciśnienia (SHR 16+CH), gdzie doszło do 6% obniżenia MABP (Tab. 1). Jeszcze skuteczniejsza, jak można było przypuszczać, okazała się jednoczesna blokada ogólnoustrojowego (blokowanie ACE poprzez kaptopryl) i lokalnych (blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę) RAAS w modelu SHR 16, gdzie zaobserwowano dwukrotnie większe, 12% obniżenie MABP (Tab. 3).

Nie zaobserwowano istotnych zmian MABP w pozostałych przebadanych modelach nadciśnienia (UNX HS, 2K1C, SHR 7). Wydaje się, że enzymy wrażliwe na chymostatynę nie mają znaczenia w kontroli ciśnienia tętniczego krwi w tych modelach nadciśnienia, przynajmniej w tak krótkim czasie obserwacji (Tab. 1 i 2).

Przebadane peptydy z nasion rzepaku nie wykazały hipotensyjnego działania u szczurów SHR w dwóch fazach rozwoju nadciśnienia (7- i 16-tygodniowe), a wręcz zaobserwowano przejściową tendencję lub nawet istotny wzrost (VWIS i RIY) MABP na skutek ich dożylniej infuzji (Tab. 4-6); zmiany ustępowały po odstawieniu peptydów.

Efekty blokowania enzymów wrażliwych na chymostatynę na parametry osocza okazały się niespecyficzne bowiem nie różniły się od efektów rozpuszczalnika chymostatyny (UNX HS, 2K1C, SHR 16; Tab. 1-2). Natomiast w grupie szczurów SHR 7 wpływ chymostatyny na parametry osocza jest niejednoznaczny i zależy od rodzaju badanych jonów: na skutek infuzji chymostatyny doszło do istotnego wzrostu stężenia sodu w osoczu (SHR 7+CH), natomiast blokowanie lokalnych RAAS nie wpłynęło na stężenie potasu (Tab. 2).

Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS nie wpłynęło na stężenie elektrolitów w osoczu, spowodowało jednak wzrost osmolalności osocza (Tab. 3).

Żaden z badanych peptydów nie wpłynął na stężenie sodu w osoczu z wyjątkiem szczurów SHR 16+VWIS; w tej grupie obserwowano istotne podwyższenie nie tylko P_{Na} , ale także P_K i Posm. Podwyższenie stężenia potasu w osoczu obserwowano także w grupie SHR 7+VW (Tab. 4). Spośród wszystkich przebadanych peptydów najwięcej zmian w parametrach osocza zaobserwowano pod wpływem peptydu VWIS u starszych szczurów SHR (Tab. 6).

Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę w sposób zróżnicowany, zależnie od badanego modelu nadciśnienia, wpływa na całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) i na przepływ krwi przez tętnicę biodrową (IBF) oraz na opory naczyniowe w tych obszarach: w modelu

UNX HS wszystkie obserwowane efekty po chymostatynie nie różniły się od efektów rozpuszczalnika, w modelu 2K1C różne od rozpuszczalnika efekty zaobserwowano dla obu oporów naczyniowych (IVR, RVR; istotny wzrost po chymostatynie). W modelach SHR 7 i 16 nie było różnic w oporach naczyniowych. W genetycznym modelu nadciśnienia po zablokowaniu lokalnych RAAS zaobserwowano zmianę RBF: u młodszych 7-tygodniowych szczurów SHR blokowanie chymazy poprawia perfuzję nerki (utrzymanie RBF na stałym poziomie w przeciwieństwie do rozpuszczalnika chymostatyny), natomiast u starszych 16-tygodniowych szczurów SHR zaobserwowano przeciwną reakcję (nastąpiło obniżenie RBF w odpowiedzi na infuzję chymostatyny, podczas gdy rozpuszczalnik nie wpłynął na RBF; Tab. 2).

Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS spowodowało istotne obniżenie IBF bez wpływu na opór naczyniowy w obrębie kończyny dolnej (IVR), z kolei doszło do istotnego obniżenia nerkowego oporu naczyniowego (RVR) bez wpływu na perfuzję nerki (RBF).

Peptydy VWIS i RIY w grupie SHR 16 wpłynęły na obniżenie przepływu krwi przez tętnicę biodrową (IBF) oraz spowodowały podwyższenie oporu naczyniowego w tym obszarze (IVR). Pozostałe peptydy wydają się nie mieć wpływu na badane przepływy krwi (IBF, RBF) i opory naczyniowe (IVR, RVR).

Nie było zmian w całkowitym przepływie krwi przez nerkę w żadnej z badanych grup eksperymentalnych. Obserwowane zmiany pod wpływem chymostatyny dotyczyły głębszych warstw nerki (rdzeń nerki): w modelach UNX HS, 2K1C, SHR 7 obserwowano obniżenie przepływu w rdzeniu nerki (OMBF i/lub IMBF), natomiast w grupie SHR 16+CH chymostatyna utrzymała na stałym poziomie IMBF, ale spowodowała obniżenie OMBF.

Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS nie wpłynęło istotnie na przepływy wewnątrznerkowe.

Infuzja peptydów u szczurów SHR także nie wpłynęła na przepływy wewnątrznerkowe z dwoma wyjątkami: obserwowano przejściowe obniżenie IMBF w grupie SHR 16+RIY, ale efekt zanikł po odstawieniu peptydu oraz doszło do podwyższenia IMBF w grupie SHR 16+IY, także tym razem efekt utrzymał się po odstawieniu peptydu.

Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę obniżyło filtrację kłębuszkową tylko u szczurów SHR, zarówno w fazie rozwoju (efekt nie był różny od efektu rozpuszczalnika) jak i po utrwaleniu nadciśnienia (specyficzny efekt, 28% obniżenie GFR w grupie SHR 16+CH). Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS także wpłynęło na istotne 27% obniżenie GFR, efekt był specyficzny, różny od efektu rozpuszczalnika.

Żaden z badanych peptydów nie wpłynął na wartości GFR z wyjątkiem dwóch grup: u szczurów SHR 16+VWIS doszło do przejściowego obniżenia GFR, ale efekt zanikł po odstawieniu peptydu oraz w grupie SHR 16+RIY, tym razem obniżenie GFR obserwowano dopiero po odstawieniu peptydu.

Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę nie wydaje się mieć wpływu na wartości parametrów wydalniczych w modelach UNX HS, 2K1C oraz SHR 7. Chymostatyna jedynie obniżyła wydalanie moczu i sodu w grupie SHR 16; podobny efekt obserwowano po jednoczesnym blokowaniu ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS.

Peptydy VW i IY nie wydają się mieć wpływu na wartość parametrów wydalniczych zarówno u szczurów SHR 7 oraz SHR 16. Zmiany w wydalaniu obserwowane były natomiast po podaniu VWIS (obniżenie diurezy i wydalania sodu z moczem) w grupie SHR 16. W odpowiedzi na RIY w grupie SHR 16 obserwowano jedynie przemijające obniżenie diurezy.

Zarówno blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę jak i jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS spowodowało istotne zmiany w stężeniu Ang II w osoczu i tkankach w każdym z badanych modeli nadciśnienia. Najwięcej zmian obserwowano w grupie SHR 16, gdzie blokowanie chymazy spowodowało istotne obniżenie Ang II we wszystkich badanych tkankach jak i w osoczu, natomiast jednoczesne blokowanie ACE i chymazy wzmocniło ten efekt, zwłaszcza w osoczu i nerce.

Ponieważ nie uzyskano spodziewanych hipotensyjnych efektów u szczurów SHR w odpowiedzi na infuzję peptydów z nasion rzepaku, nie mierzono stężenia Ang II w osoczu i tkankach w tych grupach badawczych, w których blokowanie tkankowych RAAS okazało się mało skuteczne.

V. Dyskusja

1. Rola lokalnych szlaków powstawania Ang II w kształtowaniu tętniczego ciśnienia krwi, hemodynamiki ustrojowej i wydalania nerkowego w różnych zwierzęcych modelach nadciśnienia

1.1. Wpływ na ciśnienie krwi tętniczej

Kwestia roli chymazy i innych enzymów wrażliwych na chymostatynę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi u szczura jest bardzo dyskusyjna. Niektóre doniesienia literaturowe poddają w wątpliwość występowanie chymazy u szczura [Miyazaki i wsp., 2006], natomiast inne wskazują na występowanie różnych jej podtypów w zależności od gatunku [Takai i wsp., 1996; Caughey i wsp., 2000]. Początkowo w literaturze opisano dwa podtypy szczurzej chymazy: RMCP I (ang. rat mast cell protease) oraz podtyp RMCP II. Oba enzymy zidentyfikowano w komórkach tucznych i wskazano na ich niewielki udział w konwersji Ang I w II [Wintroub i wsp., 1984]. Natomiast w badaniach Guo i wsp. (2001) potwierdzono występowanie szczurzej chymazy w ścianie naczyń krwionośnych (RVCH, ang. rat vascular chymase), ekstrahowanej z komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMCs, ang. rat vascular smooth muscle cells). Jej cDNA wykazuje odpowiednio w 74% i 80% homologię do dwóch wyżej opisanych podtypów chymazy (RMCP I oraz II) a jednocześnie w największym stopniu spośród wszystkich opisanych chymaz wykazuje homologię z ludzką chymazą. Chymaza ta, podobnie jak jej ludzki odpowiednik, przekształca Ang I w II. Jak wykazano, jej nadekspresja prowadzi do wytworzenia nadciśnienia tętniczego oraz do przebudowy naczyń krwionośnych u szczurów i transgenicznych myszy [Ju i wsp., 2001]. Kirimura i wsp. (2005) wskazują na rolę szczurzej chymazy w przebudowie ściany naczyń krwionośnych, natomiast wykluczają udział enzymu w kontroli ciśnienia tętniczego krwi. Z kolei inne doniesienia literaturowe wskazują, że u szczurów całość produkowanej Ang II zależy tylko od aktywności ACE, nie od chymazy [Takai i wsp., 2001]. Doniesieniom tym przeczą nasze wyniki sugerujące nie tylko istotny udział chymazy w kontroli ciśnienia tętniczego krwi u szczurów SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia, ale także pokazujące kluczowy udział enzymu w produkcji Ang II w tkankach i osoczu w badanych modelach nadciśnienia. Natomiast Becari i wsp. (2010) wskazuje na istnienie enzymu wrażliwego na chymostatynę, który nazwano elastazą-2, w przeciwieństwie do wyżej opisanej szczurzej chymazy enzym odpowiada jedynie za konwersję Ang I w II a nie prowadzi do rozkładu Ang II jak w przypadku szczurzej chymazy, która w pewnych stanach patologicznych może wykazywać taką proteolityczną aktywność [Santos i wsp., 2002b]. Choć

u szczurów wykazano udział chymazy w przebudowie ścian naczyń krwionośnych, to jednak dyskusyjną kwestią pozostaje udział enzymu w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi.

Ponieważ w literaturze dyskutowany jest udział obu enzymów w lokalnych szlakach syntezy Ang II, zarówno chymazy jak i elastazy-2, a także oba enzymy są blokowane przez chymostatynę, uzasadnione jest mówienie w dalszej części dyskusji o roli enzymów wrażliwych na chymostatynę bez wyróżniania żadnego z nich.

W celu sprawdzenia wpływu enzymów wrażliwych na chymostatynę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi w nadciśnieniu, którego przyczyny są – jak wiadomo – niejednorodne, badania przeprowadzono z wykorzystaniem różnych modeli nadciśnienia tętniczego, jak nadciśnienie sodozależne, nadciśnienie pochodzenia nerkowego w modelu 2K1C (ang. two-kidney, one-clip) oraz nadciśnienie o podłożu genetycznym z wykorzystaniem szczurów SHR w dwóch fazach rozwoju nadciśnienia.

Blokowanie u szczura *in vivo* enzymów wrażliwych na chymostatynę nie wpłynęło na ciśnienie tętnicze krwi w modelu nadciśnienia sodozależnego oraz w nadciśnieniu pochodzenia nerkowego, co sugeruje niewielki wpływ tych enzymów w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi w tych dwóch modelach nadciśnienia. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi wydaje się, że w szczurzyc modelach nadciśnienia nadrzędną rolę w regulacji ciśnienia tętniczego krwi odgrywa ACE. Choć w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem homogenatów serca i naczyń tętnicznych potwierdzono zdolność szczurzej chymazy do przekształcania Ang I w II [Kishi i wsp., 2006], jednak wydaje się, że udział zależnej od aktywności chymazy angiotensyny II nie ma istotnej roli w regulacji ciśnienia krwi *in vivo* [Takai i wsp., 2004], co w przypadku dwóch pierwszych opisanych modeli potwierdzają także nasze badania.

Według danych literaturowych w nadciśnieniu zależnym od wysokiej podaży sodu w diecie poziom krążącej Ang II jest niższy niż w naczyniowo-nerkowym modelu nadciśnienia (2K1C) (widać to także w moich badaniach). Sugeruje to, że przynajmniej w drugim typie nadciśnienia tkankowa pula Ang II mogłaby mieć wyraźny udział w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi u tych zwierząt. W moich badaniach blokowanie chymazy spowodowało jedynie tendencję do obniżenia MABP w obu modelach nadciśnienia, prawdopodobnie bez istotnego znaczenia fizjologicznego, co jednak nie neguje postawionej hipotezy. Prawdopodobnie pula Ang II syntetyzowanej w tkankach na drodze zależnej od chymazy nie jest zaangażowana w krótkotrwałą regulację ciśnienia tętniczego krwi, a pełni rolę w przebudowie strukturalnej tkanek i narządów, która jest równocześnie przyczyną i konsekwencją nadciśnienia [Doggrell i wsp., 2004]. W takiej sytuacji efekty blokowania chymazy mogłyby się ujawnić w trakcie chronicznych obserwacji, nie zaś w przypadku blokowania enzymu w krótkotrwałym doświadczeniu (60 min infuzji inhibitora chymazy).

Podobnie jak w przypadku nadciśnienia sodozależnego oraz nadciśnienia zależnego od zwężenia jednej tętnicy nerkowej u szczura, blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę nie wpłynęło na ciśnienie tętnicze krwi u szczurów SHR znajdujących się w początkowej fazie rozwoju nadciśnienia. Na wczesnym etapie choroby u 7-tygodniowych zwierząt wpływ enzymów odpowiedzialnych za lokalną produkcję Ang II jest znikomy [Takai i wsp., 2014], stąd brak efektu blokowania enzymów wrażliwych na chymostatynę na wartości ciśnienia tętniczego krwi w tej grupie. Potwierdzeniem tego faktu są niskie stężenia Ang II (Ryc. 14) odnotowane w osoczu u młodych szczurów SHR, u których nie doszło jeszcze do rozwoju nadciśnienia i które nie zareagowały obniżeniem poziomu Ang II na blokowanie chymazy. Szczury te, początkowo normotensyjne, rozwijają nadciśnienie stopniowo, osiągając do 10 tygodnia życia wartości ciśnienia znacznie wyższe od typowych dla normotensyjnej kontroli [Okamoto K i Aoki K, 1963].

Począwszy od 16 tygodnia życia skurczowe ciśnienie krwi u szczurów SHR ustala się na poziomie 187 mmHg (http://www.criver.com/files/pdfs/rms/shr/rm_rm_r_08_bp_characterization_of_hypertensive_and.aspx; dane z 27.03.2015) i można od tego momentu mówić o ustalonym nadciśnieniu tętniczym krwi. Jako kolejną grupę wykorzystano właśnie 16-tygodniowe SHR, aby uzyskane wyniki skonfrontować z wynikami uzyskanymi od młodszych, 7-tygodniowych szczurów SHR, które nie rozwinęły nadciśnienia. Takie podejście miało istotne zalety dla ostatecznej interpretacji uzyskanych wyników, ponieważ miało wskazać czy rzeczywiście udział enzymów wrażliwych na chymostatynę zwiększa się u szczurów wraz z rozwojem nadciśnienia.

Biorąc pod uwagę wszystkie przebadane przeze mnie modele nadciśnienia tylko w grupie SHR z utrwalonym nadciśnieniem blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę spowodowało istotne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. W grupie SHR 16 efekt obniżenia ciśnienia krwi *in vivo* widoczny był co prawda dopiero po 30 min od odstawienia chymostatyny, ale obserwacja wskazuje na zależność zmian ciśnienia tętniczego krwi od enzymów wchodzących w skład lokalnych szlaków RAAS u szczurów z rozwiniętym nadciśnieniem. Wyniki te są zaskakujące, gdyż według danych literaturowych blokowanie szczurzej chymazy nie wpływa na wartości ciśnienia tętniczego krwi w tym modelu nadciśnienia pomimo wykazanej *in vitro* wysokiej aktywności ACE i chymazy w homogenatach z aorty tych szczurów [Kirimura i wsp., 2005]. Badacze wykazali, że produkcja Ang II w tkankach u szczurów SHR jest istotnie wyższa niż u szczurów WKY, jednocześnie wykazali oni, że podwyższona synteza Ang II u SHR jest całkowicie hamowana przez inhibitory ACE, nie zaś inhibitory chymazy [Kirimura i wsp., 2005].

Różnice w wynikach uzyskanych w niniejszej pracy (obserwowany spadek ciśnienia u szczurów SHR po blokowaniu lokalnych szlaków RAAS) w porównaniu do badań Kirimury i wsp. (2005) pomimo zastosowania tego samego modelu nadciśnienia, można tłumaczyć różnym podejściem badawczym oraz różnymi metodami pomiaru ciśnienia krwi w badanych grupach.

Podczas gdy w niniejszej pracy wykorzystano pomiar ciśnienia w tętnicy udowej u szczura w narkozie, w pracy Kirimury zastosowano pomiar ciśnienia krwi u szczurów czuwających, z zastosowaniem mankietów okluzyjnych. Pomiar ciśnienia krwi techniką mankietów zakładanych na ogonie u szczura jest metodą wysoce nieprecyzyjną. Zaletami metody jest nieinwazyjność i prostota pomiaru, wadą jest stres zwierzęcia wynikający z unieruchomienia podczas pomiaru. Powszechnie uznaje się, że technika mankietów okluzyjnych jest mniej czuła niż inwazyjne techniki pomiarowe i niewielkie zmiany ciśnienia są niezauważalne. Co więcej, u szczurów SHR komponenta neurogenna, która wiąże się z wrażliwością na stres, jest istotną składową przyczyną nadciśnienia u tych szczurów. Należy także zaznaczyć, że pomiar ciśnienia tętniczego krwi w narkozie jest również obciążony błędem, gdyż głęboka narkoza zaburza aktywność układu nerwowego, niektórych hormonów i czynników parakrynych. Drugim powodem różnic może być zastosowany inhibitor i droga jego podawania. W badaniach Kirimury i wsp. (2005) zastosowano komercyjny inhibitor chymazy, NK3201 (Nippon Kayaku Co. Ltd., Tokyo, Japan), który podawano szczurom dożyłkowo jednorazowo („a single oral dose of NK3201”) w dawce 10 mg/kg. Efekty jego działania obserwowano mierząc skurczowe ciśnienie krwi po 2, 4, 8 i 24 godzinach od podania substancji. Natomiast zastosowany przez nas inhibitor chymazy – chymostatyna – podawana była przez godzinę w infuzji dożyłnej.

Uzyskane przeze mnie wyniki są jak dotąd pierwszymi badaniami wskazującymi na udział enzymów wrażliwych na chymostatynę w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi w ustalonej fazie nadciśnienia u szczurów SHR. Większość danych literaturowych skupia się na roli chymazy *in vitro* i wskazuje na jej istotny udział w przebudowie naczyń w nadciśnieniu [Doggrell i wsp., 2003], natomiast doniesień odnoszących się do roli chymazy *in vivo* jest stosunkowo niewiele i jest to nowy obszar badań dotyczący lokalnych RAAS.

1.2. Wpływ na stężenia elektrolitów w osoczu i osmolalności osocza

Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę w modelu nadciśnienia sodozależnego i w modelu 2K1C nie wpłynęło na stężenie elektrolitów osocza a obserwowana w obu modelach tendencja do wzrostu stężenia potasu była prawdopodobnie następstwem podawania rozpuszczalnika chymostatyny, nie zaś samego inhibitora.

Choć u młodszych, 7-tygodniowych szczurów SHR infuzja chymostatyny nie wpłynęła na stężenie potasu w osoczu, to infuzja inhibitora istotnie podwyższyła stężenie sodu w osoczu. Zaburzenie stężenia jednego z najważniejszych kationów osocza może wskazywać na początek zaburzeń wodno-elektrolitowych. Przeciwną reakcję obserwowano u starszych szczurów SHR w utrwalonej fazie nadciśnienia; chymostatyna nie wpłynęła tu na stężenie sodu w osoczu, jednak

przyczyniła się do niespecyficznego wzrostu stężenia potasu. Tym razem jednak chymostatyna spowodowała 19% wzrost P_K a jej rozpuszczalnik jedynie 8% wzrost, co może wskazywać na zahamowanie uwalniania aldosteronu. Hipotezę tę potwierdza fakt, że w tej grupie szczurów SHR doszło do obniżenia stężenia Ang II w osoczu, ważnego stymulatora syntezy i uwalniania aldosteronu z kory nadnerczy.

1.3. Wpływ na ukrwienie i opór naczyniowy w krążeniu nerkowym i krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową

Choć blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę nie miało wpływu na wartości ciśnienia krwi w modelu 2K1C, inhibitor spowodował wzrost oporów naczyniowych (IVR oraz RVR) przy braku wpływu na przepływy krwi przez tętnicę biodrową i przez nerkę. Otrzymane wyniki wskazują na istotną rolę chymazy w regulacji napięcia ściany naczyń oporowych w tym typie nadciśnienia. Nieoczekiwanie, enzymy wrażliwe na chymostatynę zdają się osłabiać, a nie wzmacniać stan napięcia naczyń; można spekulować, że mogłoby to wskazywać na przewagę aktywności enzymów zależnych od chymostatyny rozkładających Ang II. Hipotezy tej nie potwierdzają jednak dane pokazujące obniżenie poziomu Ang II w tkankach i osoczu po zablokowaniu chymazy.

W grupie szczurów SHR 7 blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę spowodowało utrzymanie całkowitego przepływu krwi przez nerkę na stałym poziomie, choć w grupie kontrolnej, otrzymującej rozpuszczalnik, obserwowano obniżenie RBF. Blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę przeciwdziałała temu obniżeniu, co wskazuje na oczekiwany naczyniorozszerzający efekt zablokowania chymazy .

Sprawdzono, że reakcja na chymostatynę u 7-tygodniowych szczurów SHR różni się od obserwowanej u SHR 16. Nieoczekiwanie hamowanie chymazy powoduje upośledzenie całkowitego przepływu krwi przez nerkę w grupie starszych SHR, co sugeruje istotną rolę chymazy w utrzymaniu RBF na stałym poziomie. Z drugiej strony efekt ten może być spowodowany obniżeniem tętniczego ciśnienia krwi w tej grupie. U szczurów SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia blokowanie chymazy wpływa najwyraźniej, zarówno na ciśnienie tętnicze krwi jak i przepływy nerkowe, co może świadczyć o zaburzeniach mechanizmu autoregulacji przepływu krwi w tej grupie szczurów; w takiej sytuacji już niewielkie obniżenie ciśnienia krwi może skutkować obniżeniem przepływu nerkowego. Rzeczywiście, istotne zaburzenie autoregulacji u SHR potwierdza szereg doniesień [Navar i wsp., 2011].

1.4. Wpływ na przepływy wewnątrznerkowe

W kręgu naszych zainteresowań było sprawdzenie czy chymaza jest zaangażowana w kontrolę perfuzji poszczególnych stref nerki. Jak wykazały badania rozpuszczalnik chymostatyny (DMSO), choć podany w bardzo dużym rozcieńczeniu (stężenie DMSO w infundowanym płynie 0,05%), istotnie wpłynął na OMBF zarówno w modelu nadciśnienia zależnego od wysokiej podaży sodu (UNX HS) jak i w nadciśnieniu naczyniowo-nerkowym (2K1C). Co istotne, chymostatyna podobnie wpłynęła na wartości OMBF w modelu 2K1C, podczas gdy w modelu UNX HS blokowanie chymazy zapobiegło obniżeniu OMBF zależnym od rozpuszczalnika. Wyniki te sugerują, że w modelu UNX HS blokowanie szlaku syntezy Ang II w drodze niezależnej od ACE mogło wpłynąć protekcyjnie na przepływ krwi przez tę strefę nerki (rdzeń zewnętrzny), obszar zaangażowany w intensywny kanalikowy transport elektrolitów, szczególnie wrażliwy na lokalne niedotlenienie a jednocześnie - jak się przypuszcza - pełniący rolę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi [Cowley, 1992]. Wiadomo, że chymaza ma zdolność rozkładania naczyniorozszerzającej bradykininy [Ju i wsp., 2001; Navar i wsp., 2011], a jej blokada (podobnie jak blokowanie ACE) i tym samym zablokowanie tego procesu może przyczynić się do wzrostu przepływu krwi przez korę i rdzeń nerki.

Wewnątrznerkowa dystrybucja Ang II jest zróżnicowana; wskazywano, że poziom Ang II w rdzeniu i korze nerki jest różny [Navar i wsp., 1997; Navar i wsp., 1998]. Sugeruje się, że Ang II w większym stopniu wpływa na przepływ rdzeniowy niż korowy nerki [Pallone i wsp., 1990].

W modelu UNX HS blokowanie chymazy utrzymywało przepływ przez rdzeń zewnętrzny nerki co można wiązać z obserwowanym obniżeniem poziomu Ang II w nerce. Dla bardziej precyzyjnego wnioskowania wskazane by było oznaczenie stężenia Ang II osobno w korze i rdzeniu nerki, co mogłoby uściślić poglądy na rolę hormonu w zależności od strefy nerki.

Wydaje się, że chymaza nie ma wpływu na regulację przepływu przez korę nerki w żadnym z badanych modeli nadciśnienia, natomiast zależnie od podłoża nadciśnienia blokowanie chymazy wpływało odmiennie na krążenie rdzeniowe. Zarówno w modelu UNX HS jak i 2K1C po podaniu chymostatyny obserwowano istotne obniżenie przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki, a w grupie SHR 7 zaobserwowano jedynie tendencję do obniżenia IMBF, był to jednak ten sam kierunek zmian. Co istotne, nie było jednoczesnych zmian w ciśnieniu krwi i całkowitym przepływie krwi przez nerkę, co może świadczyć o specyficznym wpływie chymazy na krążenie w rdzeniu nerki. Tylko grupa SHR 16 zareagowała odmiennie, tu chymostatyna przeciwdziałała spadkowi IMBF, który obserwowano po podaniu jej rozpuszczalnika, co ponownie może być zależne od obniżenia poziomu Ang II w nerce lub/i wrażliwości tego obszaru na zablokowanie zależnego od chymazy rozkładu naczyniorozszerzającej bradykininy.

Tylko u szczurów SHR, zarówno w fazie rozwoju jak i w fazie ustalonego nadciśnienia, doszło do obniżenia OMBF, co wydaje się być wyraźnie związane z blokowaniem chymazy. W grupie SHR 7 doszło także do istotnego podwyższenia stężenia sodu w osoczu, co może być związane ze spadkiem przepływu przez rdzeń zewnętrzny nerki w odpowiedzi na chymostatynę. Ponieważ rdzeń zewnętrzny nerki jest obszarem, gdzie zachodzi intensywny transport elektrolitów, zaburzenia w jego przepływie mogą skutkować retencją sodu i podwyższeniem jego stężenia w osoczu; może też być efektem pewnego podwyższenia poziomu Ang II, która stymuluje reabsorpcję Na w kanaliku proksymalnym.

Obniżenie przepływu przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF) oraz spadek całkowitego ukrwienia nerki (RBF) wydają się być następstwem obniżenia MABP i słabej autoregulacji w grupie SHR 16. Jednak taka hipoteza nie tłumaczy obniżenia OMBF w grupie SHR 7, w której nie doszło do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, a obniżeni przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki zachodzi w obu tych grupach.

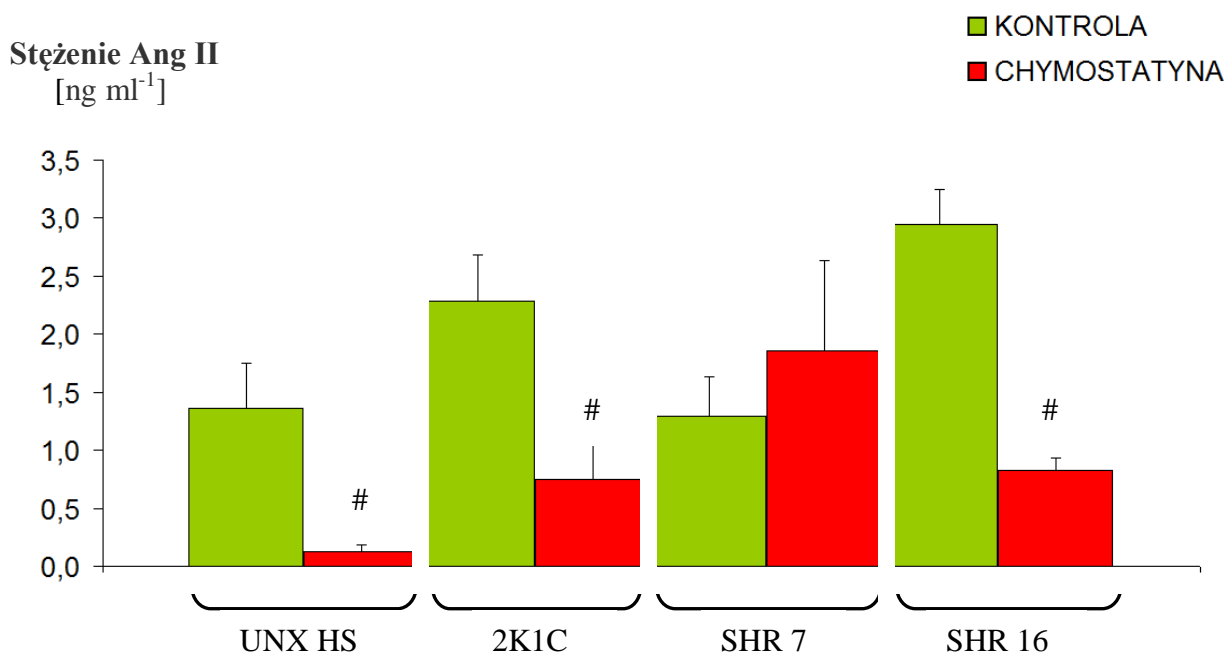
1.5. Wpływ na wydalanie

Zwiększona produkcja Ang II w tkankach może prowadzić do zmniejszenia wydalania wody i sodu z moczem i może przyczyniać się do postępującego rozwoju nadciśnienia tętniczego [Dzau and Pratt, 1986]. W dwóch pierwszych przebadanych modelach nadciśnienia (UNX HS oraz 2K1C) nie zaobserwowano zmian w wydalaniu po zablokowaniu enzymów wrażliwych na chymostatynę. Natomiast wzrost wydalania potasu w grupie UNX HS mógłby wskazywać na zwiększenie aktywności aldosteronu w tym modelu nadciśnienia. Zgodnie z tą interpretacją w grupie UNX HS+CH wydalanie sodu także uległo obniżeniu (z $1,8 \pm 0,5$ do $1,1 \pm 0,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Być może wskutek blokowania chymazy dochodzi do aktywacji ogólnoustrojowego RAAS (szlaku syntezy Ang II zależnego od ACE) i do zwiększenia aktywności aldosteronu, jednak pomiar poziomu Ang II w osoczu i tkankach po zablokowaniu chymazy przeczy tej hipotezie.

Wyniki przedstawionych badań potwierdzają dużą zależność wydalania nerkowego od ciśnienia krwi, szczególnie w grupie SHR 16. W grupie SHR 16 blokowanie chymazy obniżyło nie tylko diurezę, ale także wpłynęło na wydalanie sodu i filtrację kłębuszkową (GFR) a także na hemodynamikę nerek. Wyraźna zależność ukrwienia i wydalania nerkowego od wielkości ciśnienia krwi u SHR 16 sugeruje wcześniej wspomniane zaburzenia w autoregulacji oraz spłaszczenie i przesunięcie krzywej "pressure natiuresis" w stronę wyższych ciśnień. Obniżenie wydalania wody i sodu oraz GFR mogą być także następstwem morfologicznych zmian rozwijających się w nerkach pod wpływem wysokiego ciśnienia [Gawrys i wsp., 2014]. Szczury z tej grupy charakteryzują się

niskimi wartościami filtracji kłębuszkowej co wskazuje na postępującą niewydolność nerek w tym modelu nadciśnienia.

Blokowanie chymazy we wczesnej fazie spontanicznego nadciśnienia (SHR 7) nie wpłynęło na wydalanie nerkowe, jednak istotnie zwiększyło poziom sodu w osoczu, co może być następstwem obniżonej filtracji kłębuszkowej w tej grupie. Można również spekulować, że w wyniku zablokowania lokalnej konwersji Ang I doszło do wzrostu stężenia substratu dla klasycznego szlaku syntezy Ang II (ACE), wzrostu stężenia Ang II w osoczu (obserwowana tendencja) i zwiększonej reabsorpcji w nerkach. W zaskakujący sposób wyniki te mogą sugerować istotną protekcyjną rolę chymazy w genetycznym modelu nadciśnienia, przynajmniej na początkowym etapie jego rozwoju.



Ryc. 33. Poziom angiotensyny II (Ang II) w osoczu (ng ml⁻¹) w różnych typach nadciśnienia: w modelu sodozależnym (UNX HS), naczyniowo-nerkowym (2K1C) oraz w genetycznym modelu nadciśnienia w dwóch fazach rozwoju (SHR 7 i SHR 16) u szczurów otrzymujących chymostatynę (+CH) oraz w grupie kontrolnej otrzymującej rozpuszczalnik (+C).

Wartości średnie ± SEM, dla grupy UNX HS+CH n=6; UNX HS+C n=5; 2K1C+CH n=7; 2K1C+C n=6; SHR 7+CH n=6; SHR 7+C n=5; SHR 16+CH n=7, SHR 16+C n=6.

– znamienne różnie od wartości dla grupy kontrolnej przy p<0,05 lub mniej.

1.6. Wpływ na poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

Chymaza wydaje się mieć największy udział poza ACE w lokalnej produkcji Ang II, a ponadto jej blokowanie *in vivo* okazało się skuteczne w obniżeniu puli tkankowej Ang II [Kokkonen i wsp., 2003]. Nasze badania przeprowadzone z użyciem różnych modeli nadciśnienia pozostają w zgodzie z powyższymi doniesieniami.

Okazało się, że w każdym z przebadanych szczurzych modeli nadciśnienia chymaza jest istotnie zaangażowana w lokalną produkcję Ang II; w nerkach (wszystkie grupy poza SHR 7), w sercu (poza UNX HS), w aorcie (tylko w grupie SHR 16) oraz, co szczególnie zaskakujące, w osoczu (poza SHR 7). Wyniki te stawiają pod znakiem zapytania dotychczas utrwalone poglądy, że w ogólnoustrojowym RAAS główną rolę w syntezie krążącej Ang II pełni ACE, a w tkankowych szlakach konwersji Ang I w Ang II współdziałają enzymy obu szlaków. Jednak niejasny pozostaje ilościowy udział każdego z tych enzymów (enzymu konwertującego i enzymów wrażliwych na chymostatynę) w produkcji naczyniokurczącej Ang II.

Jak wynika z danych literaturowych [Li i wsp., 2004] u transgenicznych myszy chroniczny brak tkankowej chymazy (ang. *vascular chymase*) nie prowadzi do kompensacyjnego wzrostu aktywności tkankowego ACE. Wobec tego zwierzęta te nie są w stanie skompensować niższego poziomu Ang II w tkankach. Moje badania również pokazują istotnie niższy poziom Ang II w wielu badanych tkankach, po zablokowaniu chymazy.

Szczególnie należy podkreślić, że nasze wyniki po raz pierwszy pokazują, obok udziału ACE w kształtowaniu poziomu Ang II w osoczu, istotną rolę pełni tu także chymaza. Jej udział wzrasta szczególnie w stanach patologicznych, takich jak nadciśnienie. Jednak mechanizm poprzez który chymaza wpływa na poziom krążącej Ang II nie jest jasny.

Uzyskane wyniki są szczególnie interesujące zważywszy na fakt, że w utrwalonej fazie nadciśnienia o podłożu genetycznym, u SHR 16, więcej powstającej w osoczu Ang II zależy od aktywności enzymów wrażliwych na chymostatynę niż od ACE (ponad trzykrotnie niższe wartości Ang II w osoczu po zablokowaniu chymazy), ale właściwie wszędzie obniżenie jest bardzo duże (poza SHR 7). Być może obserwowana u pacjentów mała skuteczność klasycznych inhibitorów ACE jest wynikiem braku eliminacji dużej frakcji Ang II, ponieważ jak wiadomo leki te nie wpływają na chymazę i tym samym nie hamują tkankowych szlaków syntezy Ang II, ale także w niewystarczającym stopniu blokują klasyczny szlak powstawania Ang II. Co więcej, leki te prowadzą do większej aktywności reninowej osocza i przyczyniają się do zwiększenia syntezy Ang I, peptydu będącego substratem dla chymazy i innych niezależnych od ACE enzymów konwertujących Ang I. Co istotne, chymaza pozostaje całkowicie niewrażliwa na blokowanie przez inhibitory ACE [Lorenz, 2010; Doggrell i wsp., 2004].

W kontekście ujawnionego w badaniach wpływu enzymów uznanych za lokalne na poziom krążącej Ang II nasuwa się pytanie, czy produkowana lokalnie Ang II może być uwalniana z tkanek do krwiobiegu i odwrotnie, czy możliwe jest przemieszczenie krążącego peptydu do tkanek? W danych literaturowych brak jest doniesień odnośnie tej kwestii. Nasze badania wskazują na dużą skuteczność chymostatyny w obniżeniu poziomu krążącej Ang II, przy czym wiadomo, że inhibitor ten nie wykazuje powinowactwa do ACE. Ta obserwacja, niezwykle zaskakująca, nie podlega prostej interpretacji. W rzeczywistości enzymy wrażliwe na chymostatynę najprawdopodobniej przyczyniają się do zwiększenia puli Ang II nie tylko lokalnie, ale w jakiś sposób także ogólnoustrojowo. Jest prawdopodobne, że chymaza degradująca Ang 1-12 [Ahmad i wsp., 2013] prowadzi do zwiększenia puli Ang I a ta jako substrat dla ACE, szczególnie przy jego podwyższonej aktywności - co ma miejsce w niektórych formach nadciśnienia (np. w przypadku nadciśnienia złośliwego, pierwotnego czy zwężenia tętnicy nerkowej) - może prowadzić do zwiększenia syntezy i akumulacji Ang II w osoczu. Natomiast zablokowanie tego procesu na samym początku poprzez użycie inhibitora chymazy może przyczynić się do obserwowanego w naszych badaniach obniżenia stężenia tego peptydu we krwi.

Z drugiej strony w pracy Moniwy i wsp. (2013) z wykorzystaniem normotensyjnych szczurów Wistar-Kyoto (WKY) oraz szczurów SHR dowiedziono, że ACE jest głównym enzymem ogólnoustrojowo zaangażowanym w konwersję Ang 1-12 do mniejszych peptydów, a chymaza w większym stopniu odpowiada za degradację Ang 1-7 lokalnie. Co więcej, autorzy podkreślili udział chymazy w konwersji Ang 1-7 u normotensyjnych WKY. Badacze zaobserwowali, że dożylna infuzja Ang 1-12 zwiększyła nie tylko ciśnienie tętnicze krwi, ale też poziom krążącej Ang I i Ang II zarówno u szczurów WKY jak SHR. Infuzja lizynoprylu, leku z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEi) spowodowała u tych szczurów wzrost stężenia Ang 1-12 i Ang I przy dużym obniżeniu stężenia krążącej Ang II. Natomiast dootrzewnowe podanie chymostatyny nie miało wpływu na stężenie Ang 1-12, Ang I ani Ang II, jednak zwiększyło istotnie poziom Ang 1-7 tylko u szczurów WKY [Moniwa i wsp., 2013]. Odmienne wyniki uzyskano we wcześniejszych badaniach *in vitro* [Ahmad i wsp., 2011] prowadzonych na izolowanych kardiomiocytach, gdzie wykazano udział chymazy w konwersji Ang 1-12.

W prezentowanych badaniach nie zaobserwowano wpływu blokowania chymazy na wartości ciśnienia krwi ani w modelu nadciśnienia zależnym od wysokiej podaży sodu, ani w modelu zależnym od zwężenia jednej tętnicy nerkowej, ani nawet u młodych szczurów SHR 7, u których nie doszło jeszcze do rozwoju nadciśnienia. Niemniej jednak, w każdym z modeli doszło do obniżenia poziomu Ang II w wybranych obszarach. Może to sugerować pewne opóźnienie w reakcji ciśnienia tętniczego krwi na obniżenie poziomu Ang II lub że stężenie Ang II wciąż było wystarczająco wysokie do wywołania efektu presyjnego. Można przypuszczać, że zmniejszenie

wytwarzania Ang II w tkankach może w dłuższym czasie złagodzić objawy choroby nadciśnieniowej powodując poprawę funkcji naczyń, nerek czy serca. Oczywiście, w celu sprawdzenia tej hipotezy konieczne są badania przewlekłe.

Nasze badania porównujące poziom Ang II w osoczu z jej stężeniem w tkankach, szczególnie w nerce, są w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi. Badania innych badaczy [Campbell i wsp., 1991; Guan i wsp., 1992; Von Thun i wsp., 1994] wykazały, że wewnątrznerkowy poziom Ang II pozostaje pod kontrolą złożonych mechanizmów, w tym wychwytu Ang II spoza nerki jak również jej miejscowej produkcji, ale także podlega wpływom fizjologicznej degradacji tej puli Ang II, która pochodzi z naczyń krwionośnych [Rosivall i wsp., 1987]. Nasze badania pozostają w zgodzie z ogólnie panującym poglądem, że nerka jest jednym z tych narządów, które są w pełni wyposażone we wszystkie komponenty lokalnie działającego RAAS, a poziom wewnątrznerkowej Ang II znacznie przewyższa nie tylko poziom w osoczu, ale także w innych tkankach [Rosivall i wsp., 1987; Kobori i wsp., 2007].

Dieta wysokosodowa powoduje zmniejszenie puli zarówno krążącej Ang II jak i aldosteronu, podczas gdy poziom Ang II w sercu i w nerce ulega zwiększeniu [Bayorh i wsp., 2005]. Jak twierdzą autorzy cytowanej pracy, sód pochodzący z diety aktywuje lokalne RAAS i wnioskuje, że tkankowy poziom Ang II i aldosteronu w większym stopniu odzwierciedla zaburzenia w reaktywności naczyń (i uposledzenie funkcji narządów) niż pula Ang II w osoczu. Jednocześnie to te zmiany wywołane przez nadmierną aktywację tkankowych RAAS mogą w większym stopniu przyczynia się do rozwoju i utrwalenia nadciśnienia [Bayorh i wsp., 2005].

Z danych literaturowych wynika, że mechanizm rozwoju nadciśnienia naczyniowo-nerkowego zależy od rodzaju zmian w tętnicach nerkowych. W przypadku jednostronnego zwężenia tętnicy nerkowej (model zastosowany w naszych badaniach) główną przyczyną rozwoju nadciśnienia jest wzmożona aktywność układu RAAS, a poziom tkankowej Ang II jest podwyższony w obu nerkach. Podczas gdy wewnątrznerkowe stężenie Ang II w nerce prawidłowej (nieischemicznej) jest głównie zależne od działania ACE, rola szlaku niezależnego od ACE w produkcji Ang II w obu nerkach wciąż pozostaje niewyjaśniona. Nasze badania wykazały, że wewnątrznerkowy szlak syntezy Ang II zależny od chymazy także pełni istotną rolę w zdrowej/nieischemicznej nerce w modelu 2K1C. Z drugiej strony, w badaniach Sadjadi i wsp. (2005) potwierdzono, że aktywność niezależnego od ACE szlaku syntezy Ang II była podwyższona w niedokrwionej nerce, ale pozostała bez zmian w nerce nieischemicznej. Autorzy podkreślają, że nawet jeśli aktywność chymazy jest podwyższona w niedokrwionej nerce u szczurów nadciśnieniowych, to poziom krążącej Ang II nie wydaje się wpływać na regulację wewnątrznerkowej aktywności chymazy, co sugeruje że aktywność enzymu jest podwyższona bezpośrednio wskutek rozwijającego się niedokrwienia tkanki nerkowej.

Jak wykazały moje badania, blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę *in vivo* skutecznie wpłynęło na obniżenie poziomu Ang II w osoczu w każdym z badanych modeli z wyjątkiem szczurów SHR w początkowej fazie nadciśnienia. Wyniki sugerują, że u młodych szczurów SHR 7 poziom Ang II w osoczu nie zależy od enzymów wrażliwych na chymostatynę a prawdopodobnie w całości jest wynikiem aktywności ACE. U młodych szczurów SHR stwierdzono, że następuje silna aktywacja ogólnoustrojowego RAAS, w szczególności zwiększa się aktywność reniny, angiotensynogenu i ACE, co w tym modelu nadciśnienia istotnie przyczynia się do postępu choroby [Zicha i Kunes, 1999]. W tej grupie szczurów chymostatyna wpłynęła jedynie na obniżenie poziomu Ang II w sercu, a pozostała bez wpływu na pozostałe badane tkanki. Być może u młodych szczurów SHR, u których nie doszło jeszcze do wytworzenia nadciśnienia, tkankowa chymaza jest nieaktywna lub wręcz nieobecna i nie ma jeszcze wpływu na poziom Ang II w tych obszarach. Wraz z rozwijającym się nadciśnieniem chymaza i/lub elastaza-2 może uaktywniać się w różnych tkankach w różnym czasie, ale jak się wydaje w pierwszej kolejności aktywna jest w sercu. Co ciekawe, poziom Ang II w sercu nie wzrasta już w fazie ustalonego nadciśnienia, ale dalej pozostaje w tym samym stopniu wrażliwy na chymostatynę.

Podczas gdy poziom Ang II w nerkach jest podobny zarówno w grupie UNX HS jak również w modelu 2K1C, nerkowa chymaza odpowiada w tych typach nadciśnienia za syntezę ok. połowy Ang II. Pod względem blokowania syntezy Ang II w nerkach szczególną uwagę zwraca grupa SHR 16, w której obserwowany był nie tylko najwyższy poziom Ang II w tej tkance, ale również udział enzymów wrażliwych na chymostatynę w produkcji Ang II w nerce w tej grupie jest największy (ok. 2/3 produkowanej Ang II zależy od chymazy). Rzeczywiście, największy udział chymazy w syntezie Ang II w badanych tkankach charakteryzował szczury SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia i w tym typie nadciśnienia blokowanie chymazy wpłynęło na obniżenie poziomu Ang II w każdym z badanych obszarów. Nasze badania rzucają nowe światło na rolę chymazy w rozwoju nadciśnienia o podłożu genetycznym, zwłaszcza w konfrontacji z badaniami Kirimury i wsp. (2005), w których wykazano, że Ang II w aortalnej krwi jest całkowicie blokowana przez inhibitory ACE, nie zaś przez blokowanie chymazy. Badania te nie ujawniły także wpływu chymazy w kontroli ciśnienia tętniczego krwi u szczurów SHR, potwierdziły natomiast wpływ ACE na wielkość ciśnienia krwi w tym typie nadciśnienia. Co więcej, badacze wykazali, że poziom Ang I jest istotnie wyższy u szczurów SHR niż WKY, a produkcja Ang II została całkowicie zahamowana w tkankach przez inhibitor chymazy. Badacze zwrócili także uwagę na fakt, że prawdopodobnie Ang I u szczurów SHR pod wpływem chymazy w większym stopniu ulega degradacji w tkankach niż jest dla niej substratem do produkcji Ang II [Kirimura i wsp., 2005]. Natomiast nasze badania jasno wskazują nie tylko na istotny udział chymazy w syntezie Ang II w tym typie nadciśnienia, ale także na jej rolę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi. Należy jednak

podkreślić, że w badaniach Kirimury i wsp. (2005) zastosowano inny inhibitor chymazy (NK3201, podany doustnie) niż ten użyty w naszych doświadczeniach (chymostatyna podana w infuzji dożylniej), co mogło wpłynąć na uzyskane w obu pracach wyniki. Na podstawie naszych badań wydaje się, że w spontanicznym nadciśnieniu enzymy wrażliwe na chymostatynę są szczególnie ważne dla genezy nadciśnienia tętniczego, zarówno poprzez wpływ na stężenie Ang II ale także na jej udział w kontroli ciśnienia.

1.7. Podsumowanie roli lokalnych szlaków powstawania Ang II w różnych zwierzęcych modelach nadciśnienia

Opisane różnice pojawiające się pomiędzy poszczególnymi modelami nadciśnienia pozwalają na wysunięcie wniosku, że charakter zmian hemodynamiki i wydalania nerkowego oraz mechanizmy kształtowania ciśnienia krwi tętniczej są odmienne w każdym typie badanego nadciśnienia i w każdym z opisanych modeli w odmiennym stopniu zaznacza się wpływ chymazy lub/i elastazy-2. Otrzymane wyniki sugerują nie tylko istotną rolę alternatywnego, ACE-niezależnego szlaku syntezy Ang II szczególnie w modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym, ale także wskazują na rolę chymazy w kształtowaniu ciśnienia krwi w tym modelu nadciśnienia, co w literaturze było jedną z najbardziej spornych kwestii odnośnie roli lokalnych RAAS w różnych typach nadciśnienia.

Z kolei u młodszych, 7-tygodniowych SHR nie stwierdzono zmian w ciśnieniu tętniczym krwi po zablokowaniu chymazy. Bardzo interesujące wydaje się obserwowane utrzymanie na stałym poziomie przepływu krwi przez tętnicę nerkową przy blokowaniu chymazy tj. zapobieganie upośledzenia perfuzji obserwowanej po podaniu samego rozpuszczalnika. Co więcej, po zablokowaniu chymazy zmienił się naczyniowy opór obwodowy u tych szczurów (obserwowany wzrost IVR), podczas gdy ciśnienie krwi tętniczej utrzymało się na stałym poziomie. Najwidoczniej mechanizmy regulacji ciśnienia krwi, które działały u szczurów SHR 7, zostały zaburzone u starszych szczurów SHR. Ponieważ u szczurów SHR 7 zablokowanie chymazy poprawia perfuzję nerki, chroniczne podawanie chymostatyny teoretycznie mogłoby w dłuższym procesie przyczynić się ograniczenia rozwoju nadciśnienia u tych zwierząt. Z drugiej strony, enzymy zależne od chymostatyny wydają się mieć znaczenie protekcyjne dla prawidłowego ukrwienia tego obszaru u młodych SHR, więc ostateczne rozstrzygnięcie ich roli w zapobieganiu rozwojowi nadciśnienia wymaga dalszych badań.

Chymaza czy inne wrażliwe na chymostatynę enzymy konwertujące Ang I nie wydają się mieć znaczącej roli w utrzymaniu hemodynamiki i wydalania nerkowego w pozostałych przebadanych modelach nadciśnienia (UNX HS, 2K1C), mimo iż istotnie przyczyniają się do

zwiększenia poziomu Ang II zarówno w tkankach jak i w osoczu. Należy przypuszczać, że efekty czynnościowe nie ujawniły się ponieważ czas obserwacji w doświadczeniu ostrym był zbyt krótki.

Ponieważ większość obserwowanych efektów hamowania chymazy pojawiała się z opóźnieniem i utrzymywała do godziny po odstawieniu chymostatyny, w celu wykazania fizjologicznego znaczenia chymazy w kontroli hemodynamiki i ciśnienia krwi uzasadnione wydaje się zastosowanie długotrwałego blokowania enzymów lokalnych szlaków syntezy Ang II w doświadczeniach przewlekłych (zastosowanie inhibitorów lokalnej konwersji Ang I).

2. Rola jednoczesnego blokowania ogólnoustrojowego RAAS i tkankowych układów lokalnych u szczurów SHR w ustalonej fazie nadciśnienia (kaptopryl na tle chymostatyny)

Kaptopryl jest lekiem hipotensyjnym, specyficznym inhibitorem konwertazy angiotensyny (ACE) dzięki czemu obniża produkcję Ang II, co prowadzi do obniżenia ciśnienia tętniczego. Kaptopryl wywołuje także szereg hemodynamicznych zmian w ustroju, m.in. obniżenie oporu naczyniowego i wzrost całkowitego przepływu krwi przez nerkę, natomiast pozostaje on bez wpływu na GFR [Daza i wsp., 2005].

Potencjalnym mechanizmem oddziaływania inhibitorów konwertazy angiotensyny (w tym kaptoprylu) na ciśnienie tętnicze krwi jest także ich wpływ na aktywność układu współczulnego, wyrażający się zmniejszeniem uwalniania noradrenaliny z zakończeń włókien współczulnych. Leki te mogą także zmieniać czynność śródbłonna, zwiększając uwalnianie tlenu azotu i hamując wytwarzanie endoteliny-1, ale również wpływają na układ kininazy II, odpowiedzialnej za unieczynnianie bradykininy. W konsekwencji dochodzi do zwiększenia stężenia bradykininy, która działa naczyniorozszerzająco i zwiększa wytwarzanie prostacykliny w obrębie śródbłonna. W trakcie przewlekłego stosowania leków hamujących ACE stwierdzono także zwiększenie stężenia naczyniorozszerzającej Ang 1-7 w osoczu.

2.1. Wpływ na ciśnienie krwi tętniczej

W pracy Castro-Moreno i wsp. (2012) wykazano, że choć u normotensyjnych szczurów WKY kaptopryl (podawany do picia przez 7 i 19 tygodni w dawce 30 mg/kg/dzień) nie wpłynął na wartości ciśnienia tętniczego krwi, to istotnie obniżył je u dorosłych szczurów SHR. Szczury SHR charakteryzują się niskim poziomem Ang 1-7 w osoczu przy jednoczesnym postępującym z wiekiem wzrostem stężenia Ang II w osoczu i tkankach [Castro-Moreno i wsp., 2012]. Ponieważ Ang 1-7 ma działanie przeciwstawne (wzrost syntezy prostaglandyn, wzmocnienie działania bradykininy czy produkcja tlenu azotu) do Ang II, wzrost jej stężenia wydaje się korzystny w walce z nadciśnieniem [Santos i wsp., 2002a]. Badacze wykazali, że kaptopryl wpłynął na

dwukrotny wzrost stężenia Ang 1-7 w osoczu (WKY i SHR) oraz istotnie obniżył (o 50%) poziom krążącej Ang II w obu badanych grupach [Castro-Moreno i wsp., 2012]. Wysłano wniosek, że nierówny stosunek krążącej Ang 1-7 (niski) do Ang II (wysoki) może mieć wpływ na postępujące nadciśnienie u szczurów SHR, a odwrócenie tego stosunku może zahamować chorobę. Inne doniesienia są w zgodzie z powyższymi badaniami i powszechnie uważa się, że zahamowanie nadaktywnego RAAS jest kluczowe w ograniczeniu rozwijającego się u tych zwierząt nadciśnienia [Chappell i wsp., 1998; Kobori i wsp., 2005; Yamada i wsp., 2008]. Jednak pomimo chronicznego blokowania RAAS poprzez kaptopryl nie udało się w pełni zahamować krążącej Ang II u szczurów SHR, a stężenie peptydu i tak pozostało ponad dwukrotnie wyższe niż u szczurów WKY. Choć kaptopryl poprzez hamowanie ACE zapobiega rozkładowi bradykininy i w ten sposób przyczynia się do zwiększenia jej stężenia w osoczu, to efekt ten prowadzi także do zwiększenia stężenia naczyniorozszerzających prostaglandyn i tlenku azotu, co może dodatkowo przyczyniać się do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi w tym modelu nadciśnienia. Ponadto lek zmniejsza poziom krążącej Ang II i wydzielanie aldosteronu, ale nie jest w stanie zmniejszyć puli Ang II powstającej w tkankach [Lopez-Sendon i wsp., 2004]. Istnieją też doniesienia wskazujące, że w przypadku chronicznego hamowania ACE przez kaptopryl po pewnym czasie dochodzi do powrotu stężenia Ang II i aldosteronu do wartości wyjściowych (ang. „ACE escape”), co jest kojarzone z uaktywnieniem się lokalnych szlaków RAAS i wykorzystaniem przez nie zwiększonej puli substratu t.j. Ang I [Atlas, 2007]. W pracy Castro-Moreno i wsp. (2012) nie zaobserwowano takiego powrotu, mimo to nie udało się także zmniejszyć całej puli Ang II, zarówno w osoczu jak i w tkankach.

W naszych badaniach wykazano, że jednoczesne blokowanie *in vivo* ogólnoustrojowego i lokalnych szlaków syntezy Ang II u szczurów SHR w ustalonej fazie nadciśnienia (kaptopryl na tle chymostatyny) prowadzi do istotnego obniżenia zarówno krążącej Ang II jak i tej nagromadzonej lub/i powstającej w tkankach. W odpowiedzi na krótkotrwałe blokowanie ogólnoustrojowego i tkankowych układów RAAS doszło do 12% obniżenia ciśnienia krwi, podczas gdy izolowane blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę dało 6% obniżenie wartości tego ciśnienia w grupie SHR 16. Wyniki te są zgodne z danymi innych badaczy i dają nadzieję na skuteczność skojarzonej terapii nadciśnienia z wykorzystaniem zarówno inhibitorów ACE jak i inhibitorów enzymów wrażliwych na chymostatynę, co zapewniłoby pełniejszą blokadę RAAS. W celu weryfikacji tej hipotezy wskazane byłoby przeprowadzenie obserwacji przewlekłych.

W latach 1984-1990 stwierdzono występowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę (pierwotnie nazwanych CAGE, ang. chymostatin-sensitive Ang II-generating enzyme) nie tylko u ludzi, ale także w tkankach psa, małpy czy chomika [Okunishi i wsp. 1993; Okunishi i wsp., 1987; Okamura i wsp., 1984]. Wykazano, że enzymy te są wrażliwe na chymostatynę i inne

inhibitory proteaz serynowych, ale nie na inhibitory ACE. Badania *in vitro* ujawniły, że chymostatyna i kaptopryl podawane osobno są w stanie zmniejszyć ilość Ang II w tkankach i w osoczu, ale dopiero wspólne ich podanie prowadzi do pełnej blokady syntezy Ang II w ścianie naczyń krwionośnych u psa [Okunishi i wsp., 1993]. Co ciekawe, podanie samej chymostatyny doprowadziło do znaczniejszej redukcji Ang II w tkankach i osoczu (60%) niż podanie samego kaptoprylu, który charakteryzował się 40% skutecznością [Okunishi i wsp., 1993].

Ciekawe wyniki uzyskano w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem izolowanych tętnic ludzkich [Okunishi i wsp., 1987] i króliczych [Okamura i wsp., 1984], gdzie wykazano bardzo dużą skuteczność w blokowaniu syntezy Ang II po jednoczesnym blokowaniu RAAS poprzez kaptopryl i chymostatynę. Co ciekawe, blokowanie szlaku syntezy Ang II poprzez chymostatynę okazało się dużo bardziej efektywne (ok. 80% skuteczność) u ludzi [Okunishi i wsp., 1987] niż u królika, gdzie prawie całą (ok. 90%) pulę Ang II zablokowano poprzez kaptopryl a udział chymostatyny w obniżeniu stężenia Ang II był znikomy [Okamura i wsp., 1984]. Co ciekawe, wiele badań prowadzonych w tym czasie [Campbell i wsp., 1990; Oliver i Sciacca, 1984; Saye i wsp., 1984] nie potwierdziło istnienia enzymów wrażliwych na chymostatynę w ścianie naczyń krwionośnych, co tłumaczono wyborem złego modelu doświadczalnego. W badaniach tych posłużono się naczyniami izolowanymi od królików i szczurów; w krótkim czasie uznano, że u tych zwierząt brak jest lokalnych, niezależnych od ACE szlaków syntezy Ang II [Okunishi i wsp., 1993]. Bardzo często jednak wyniki badań *in vitro* odbiegają od doniesień płynących z badań *in vivo*. Należy podkreślić, że przedstawione przeze mnie badania były prowadzone *in vivo*, natomiast większość dotychczasowych doniesień jest rezultatem badań *in vitro*. W tamtym czasie nie zwrócono także uwagi na fakt, że chymaza nabiera szczególnego znaczenia właśnie w stanach patologicznych, a jej fizjologiczna rola u zdrowych zwierząt może być znikoma lub nieuchwytna. Podobnie w naszych badaniach wyniki są zróżnicowane w zależności od zastosowanego modelu; inaczej chymaza działa u młodych szczurów SHR, u których nie doszło do rozwoju nadciśnienia (brak wpływu na wielkość ciśnienia tętniczego krwi i poziom Ang II w większości badanych obszarów) a inaczej u starszych SHR z rozwiniętym nadciśnieniem (wpływ chymazy na wartości ciśnienia tętniczego krwi i stężenie Ang II). Nasze badania wykazały, że jednoczesne użycie ACE i chymostatyny daje lepsze efekty hipotensyjne u szczurów SHR 16 niż użycie samej chymostatyny. Oba inhibitory są w stanie nie tylko obniżyć ciśnienie tętnicze krwi u starszych szczurów SHR, ale również bardziej obniżyć stężenie Ang II w osoczu i tkankach, co potwierdza istnienie lokalnych szlaków RAAS zależnych od aktywności zarówno ACE jak i chymazy.

Choć inhibitory ACE zajmują ugruntowaną pozycję w leczeniu nadciśnienia tętniczego krwi, to wyniki przeprowadzonych dotychczas badań wskazują, że efekt hipotensyjny wywierany przez leki z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny jest niewystarczający i nie dochodzi do

pełnego zahamowania aktywności tkankowych układów RAAS, które są obecne m.in. w ścianie naczyń krwionośnych, mięśniu sercowym, nerce czy mózgu. Jak wykazały badania innych badaczy, prowadzone głównie w układzie *in vitro* oraz nasze badania *in vivo*, jednoczesne blokowanie obu układów RAAS, tych zależnych od aktywności ACE i od enzymów wrażliwych na chymostatynę może dać zdecydowanie lepsze wyniki w terapii nadciśnienia tętniczego.

2.2. Wpływ na stężenia elektrolitów w osoczu i osmolalności osocza

Choć blokowanie enzymów wrażliwych na chymostatynę nie wpłynęło na stężenie sodu w osoczu, doszło do niespecyficznego wzrostu stężenia potasu w osoczu u szczurów SHR w utrwalonej fazie nadciśnienia; infuzja chymostatyny spowodowała 19% wzrost P_K a jej rozpuszczalnik 8% wzrost. Z kolei jednoczesne blokowanie ACE i enzymów wrażliwych na chymostatynę nie wpłynęło na stężenie elektrolitów w osoczu, ale niespodziewanie przyczyniło się do wzrostu stężenia substancji osmotycznie czynnych, a efekt utrzymał się po odstawieniu inhibitorów. Według danych literaturowych kaptopryl nie wpływa na stężenie elektrolitów w osoczu [Gardiner i Bennett, 1983].

Chroniczne podawanie kaptoprylu [Riegger i Kochsiek, 1986] wpływa na osmolalność osocza, podobnie nasze doświadczenia ujawniły taki wpływ inhibitora ACE w połączeniu z chymostatyną. Wzrost osmolalności, który utrzymał się po odstawieniu inhibitorów jest trudny do interpretacji, zważywszy że towarzyszyło mu obniżenie diurezy. Spodziewanym efektem byłby towarzyszący wzrostowi osmolalności wzrost stężenia sodu lub potasu, ponieważ na wartości osmolalności osocza składają się takie procesy jak ruch wody i jonów (jony sodu i chloru, azot pozabiałkowy, glukoza) przez półprzepuszczalne błony komórkowe, prowadząc do przemieszczenia elektrolitów do wnętrza komórek bądź w przeciwnym kierunku. Takiej zmiany jednak nie zaobserwowano. Obniżenie osmolalności osocza byłoby skutkiem aktywacji osmoreceptorów podwzgórzowych, zwiększenia produkcji wazopresyny i reabsorpcji wody w kanalikach zbiorczych (pobudzanie receptorów V2). Taki mechanizm byłby w zgodzie z obserwowanym przez nas spadkiem diurezy. Być może jednak obserwowany przez nas wzrost osmolalności osocza był jedynie przejściowy, a rzeczywiste zmiany zachodzące w dłuższym czasie były nieuchwytnie przy krótkiej obserwacji.

2.3. Wpływ na ukrwienie i opór naczyniowy w krążeniu nerkowym i krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową

Wydaje się, że oba inhibitory działają odmiennie na oba badane obszary krążeniowe: nerkowy (RBF) i kończyny dolnej (IBF). Podczas gdy chymostatyna nie wpłynęła na IBF, jednoczesne podanie kaptoprylu i chymostatyny spowodowało istotne 27% obniżenie przepływu w tym obszarze. Z kolei obniżenie RBF po blokowaniu chymazy przeciwstawia się 12% tendencji do wzrostu wartości RBF po jednoczesnym blokowaniu ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS. Nasze obserwacje pozostają w zgodzie z doniesieniami literaturowymi [Kumagai i wsp., 1995; Hajj-ali i Zimmerman, 1991], gdzie u nadciśnieniowych królików stwierdzono wzrost RBF po podaniu kaptoprylu. Choć w naszych badaniach nie zaobserwowano istotnego wzrostu RBF, to wydaje się, że kaptopryl przeciwstawił się efektowi chymostatyny, która sama spowodowała obniżenie przepływu krwi przez nerkę u nadciśnieniowych szczurów SHR. Być może miało to związek z wciąż wysokim stężeniem Ang II ponieważ wyższa aktywność ACE stwierdzana u SHR, powodowała wzmożone przekształcanie Ang I do naczyniokurczącej Ang II.

2.4. Wpływ na przepływy wewnątrznerkowe

Choć chymostatyna spowodowała 15% obniżenie przepływu przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF), to jednoczesne blokowanie ACE i chymazy nie wpłynęło na przepływ krwi w żadnej z badanych stref nerki.

Szereg doniesień literaturowych wskazuje, że jednym z czynników przyczyniających się do rozwoju nadciśnienia u szczurów SHR jest niższy przepływ krwi przez rdzeń nerki [Roman, 1987; Arendshorst 1979]; jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS u szczurów SHR 16 zapobiegło takiemu spadkowi. Obserwowano, że blokowanie ACE skutkuje obniżeniem przepływu krwi zarówno przez korę jak i rdzeń nerki [Pallone i wsp., 1990]. Jednak w badaniach Bądryńskiej i wsp. (2002) wykazano, że u normotensyjnych szczurów Wistar kaptopryl (bolus podany dożylnie w dawce 1 mg/kg m.c.) istotnie zwiększył przepływ krwi przez korę nerki (10% wzrost), natomiast nie wpłynął na przepływ przez rdzeń nerki. Ponieważ ACE jest kininazą, blokowanie enzymu przez kaptopryl powinno skutkować wzrostem stężenia naczyniorozszerzających kinin, co podwyższyłoby ukrwienie nerki.

W pracy Bądryńskiej i wsp. (2002) wykazano, że egzogenna Ang II powoduje obniżenie przepływu krwi przez korę nerki a także zwiększenie ukrwienia rdzenia nerki. Eliminacja peptydu poprzez zahamowanie jego syntezy powinna skutkować zmniejszeniem przepływu krwi w rdzeniu, co jednak nie miało miejsca po podaniu kaptoprylu. W moich badaniach po zablokowaniu

chymazy, alternatywnego szlaku konwersji Ang I, obserwowaliśmy 15% obniżenie OMBF (przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny). Natomiast po jednoczesnym zastosowaniu chymostatyny z kaptoprylem przepływ krwi wewnątrz nerki został utrzymany na stałym poziomie. Dlaczego nie zaobserwowano zmiany w przepływie krwi w nerce? Być może nagromadzenie naczyniorozszerzającej bradykininy (jest rozkładana zarówno przez ACE jak i chymazę) w konsekwencji dało efekt utrzymania przepływu krwi w nerce na stałym poziomie, bez podwyższania jego wartości [Bądryńska i wsp. 2002]. Jak wskazują autorzy pracy jedna z hipotez mówi o dużym nagromadzeniu receptorów AT_2 dla Ang II w rdzeniu nerki, przez które hormon działa naczyniorozszerzająco. Jednak taka interpretacja jest możliwa tylko w przypadku gdy efekt naczyniorozszerzającego działania Ang II poprzez AT_2R przewyższa efekt naczyniokurczącego działania peptydu przez drugi typ receptorów dla Ang II, czyli AT_1R , które także są obecne w nerce. Jak wynika z literatury, nagromadzenie AT_1R w nerce znacznie przewyższa AT_2R u szczurów SHR [Wu i wsp., 1994]. Stąd naczyniorozszerzające działanie Ang II poprzez AT_2R możliwe byłoby jedynie przy jednoczesnym zablokowaniu AT_1R w nerce [Arendshorst i wsp., 1999].

Ponieważ kaptopryl nie wpływa na rozmieszczenie receptorów dla Ang II, a brak jest doniesień odnośnie wpływu chymostatyny na te receptory, można przypuszczać, że egzogenna Ang II działa w nerce naczyniorozszerzająco w sposób pośredni, poprzez stymulację uwalniania prostaglandyn, kinin lub NO. Doniesienia literaturowe wskazują, że poziom syntezy i koncentracja prostaglandyn w nerce jest dużo wyższa w rdzeniu niż w korze nerki, a Ang II może stymulować ich syntezę poprzez AT_1R [Siragy i Carey, 1996]. Co więcej, egzogenna Ang II może zwiększyć stężenie NO w tkance nerkowej, zwłaszcza w rdzeniu nerki [Zou i wsp., 1997]. Wysłano wniosek, że stymulacja syntezy NO przez Ang II odbywa się poprzez AT_2R [Siragy i Carey, 1997]. Spośród najbardziej znanych efektów chymazy wymienia się konwersję tzw. dużej endoteliny do endoteliny 1, inaktywację bradykininy czy rozkład substancji P, czyli substancji które powodują rozszerzenie naczyń krwionośnych [Urata, 2000]. Gdybyśmy obserwowali podwyższenie OMBF, można by to tłumaczyć naczyniorozszerzającym działaniem bradykininy czy NO pod nieobecność chymazy. W moich badaniach zaobserwowano jednak obniżenie OMBF po zahamowaniu chymazy u starszych szczurów SHR co może świadczyć o wzmożonej aktywacji ACE i produkcji naczyniokurczącej Ang II pod nieobecność chymazy.

2.5. Wpływ na wydalanie

Według literatury inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEi), skuteczne w obniżaniu ciśnienia tętniczego krwi, nie zmieniają filtracji kłębuszkowej [Daza i wsp., 2005; Duchin i Willard,

1984]. Jednak chroniczne podawanie pacjentom nadciśnieniowym kaptoprylu spowodowało 6% obniżenie GFR [Thomsen i wsp., 1986]. W moich badaniach jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych RAAS spowodowało istotne 27% obniżenie filtracji kłębuszkowej, dokładnie takie samo obniżenie obserwowano po zablokowaniu samej chymazy (28%). Dalej nastąpiło pogłębienie obserwowanego efektu po odstawieniu obu inhibitorów (43% obniżenie GFR), co było związane w czasie z dalszym obniżeniem ciśnienia i prawdopodobnie było tego następstwem. Donoszono, że do głębszego obniżenia GFR (21%) może dochodzić przy zastosowaniu ACEi u pacjentów z niewydolnością nerek [Thomsen i wsp., 1986]. Wyniki te nasuwają przypuszczenie, że w modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym dochodzi do postępującej niewydolności nerek, także do obniżenia GFR. Rozpuszczalnik chymostatyny nie wpłynął na wartości filtracji kłębuszkowej u szczurów SHR 16. Zaobserwowano natomiast niespecyficzne obniżenie GFR (zarówno po chymostatynie jak i jej rozpuszczalniku) u młodych, 7-tygodniowych szczurów SHR, u których nie zdążyło się rozwinąć nadciśnienie tętnicze. Jednak u tych zwierząt obniżenie GFR nie jest skojarzone ze zmianami ciśnienia krwi, tak jak w przypadku SHR 16. U starszych szczurów SHR obniżenie GFR wydaje się być konsekwencją obniżenia MABP. Podobne obserwacje poczyniono w modelach 2K1C oraz 1K1C, gdzie przewlekłe leczenie kaptoprylem (obniżenie ciśnienia skurczowego krwi) skutkowało istotnym obniżeniem GFR [Lee i Blaufox, 1992].

Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i tkankowych RAAS spowodowało osłabienie zdolności wydalniczych nerki u szczurów SHR 16. Doszło nie tylko do obniżenia GFR, ale zaobserwowano także istotne obniżenie wydalania wody i sodu z moczem (odpowiednio 10% i 27% obniżenie), choć obniżenie ostatniego parametru zaobserwowano już po odstawieniu obu inhibitorów, co sugeruje oddalony w czasie efekt blokowania enzymów odpowiedzialnych za syntezę Ang II. Według danych literaturowych infuzja kaptoprylu przyczynia się do wzrostu diurezy i wydalania sodu [Suzuki i wsp., 1985; McCaa i Gillespie, 1984]. Co ciekawe, hamowanie samej chymazy u szczurów SHR 16 skutkowało dużo większym obniżeniem diurezy (42% obniżenie) i wydalania sodu (76% obniżenie) niż w przypadku jednoczesnego blokowania obu enzymów zaangażowanych w syntezę Ang II - mimo mniejszego obniżenia ciśnienia tętniczego krwi.

2.6. Wpływ na poziom angiotensyny II w osoczu i tkankach

Jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i tkankowych RAAS spowodowało istotne obniżenie poziomu Ang II zarówno w osoczu jak i w tkankach. Wydaje się, że jednoczesne podanie kaptoprylu i chymostatyny jest najskuteczniejsze w przypadku osocza i nerki. Stężenie Ang II

w osoczu obniżyło się istotnie po zablokowaniu lokalnych szlaków RAAS przez chymostatynę. Jednoczesne podanie chymostatyny z kaptoprylem również skutkowało dużym obniżeniem stężenia Ang II w osoczu. Moje wyniki są zgodne z powszechnie panującym przekonaniem, że w RAAS ogólnoustrojowym ACE odpowiada za syntezę Ang II. Ponadto wyniki te rzucają nowe światło na udział chymazy w utrzymaniu puli krążącej Ang II, ponieważ okazało się, że samo blokowanie chymazy w wyraźnym stopniu przyczynia się do zmniejszenia puli ogólnoustrojowej.

Najmniej skuteczne okazało się jednoczesne blokowanie obu układów RAAS na stężenie Ang II w lewej komorze serca i w aorcie, efekty były takie same przy użyciu chymostatyny i obu inhibitorów jednocześnie. Wyniki sugerują, że udział ACE i chymazy w syntezie Ang II lokalnie różni się zależnie od typu tkanki. Z moich badań wynika, że o ile w nerce współdziałają oba enzymy i udział chymazy i/lub elastazy-2 jest istotny, to w sercu i aorcie główną rolę w syntezie Ang II pełnią enzymy wrażliwe na chymostatynę..

Wyniki dotyczące jednoczesnego blokowania lokalnych i ogólnoustrojowego RAAS sugerują, że taka skojarzona terapia może być znacznie skuteczniejsza w walce z nadciśnieniem niż stosowanie samych inhibitorów ACE, zwłaszcza że leczenie samym kaptoprylem okazuje się mało skuteczne u starszych szczurów SHR [Zicha i wsp., 2008]. Tę hipotezę wspiera fakt, że jednoczesne blokowanie obu układów RAAS wpłynęło nie tylko na obniżenie stężenia naczyniokurczącej Ang II, ale również skutkowało istotnym obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi, co jest przecież głównym celem terapeutycznym w leczeniu nadciśnienia. Ponadto, tak skuteczne obniżenie poziomu Ang II w tkankach i osoczu w dłuższej perspektywie leczenia może przyczynić się do poprawy stanu czynnościowego tkanek i narządów.

3. Wpływ peptydów z nasion rzepaku o potencjalnym działaniu hipotensyjnym w kształtowaniu ciśnienia krwi, hemodynamiki ustroju i wydalania nerkowego u szczurów z nadciśnieniem o podłożu genetycznym (szczury SHR)

W doświadczeniach ostrych na szczurach SHR w jednej lub w dwóch fazach rozwoju nadciśnienia (zależnie od podawanego peptydu) przebadano cztery typy peptydów izolowanych z nasion rzepaku o potencjalnym hipotensyjnym działaniu (VW - Walina-Tryptofan, IY - Izoleucyna-Tyrozyna, VWIS - Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna oraz RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna). Wybór peptydów podyktowany był danymi z publikacji Marczak i wsp. (2003) i wstępnymi badaniami prof. Lipkowskiego (Zakład Neuropeptydów IMDiK PAN), w których wykazano, że opisane, izolowane z nasion rzepaku peptydy (fragmenty pochodzące z białek zapasowych nasienia: napin i krucyferyn) były skuteczne w obniżeniu ciśnienia krwi (jego obniżenie nawet o 15 mmHg) u szczurów SHR. Dodatkowo stwierdzono większą hipotensyjną skuteczność wspomnianych peptydów u szczurów starych (ok. 30-tygodniowych), u których

inhibitory ACE są zdecydowanie mniej efektywne. To z kolei nasunęło przypuszczenie, że peptydy blokują u tych zwierząt szlaki syntezy Ang II alternatywne wobec ACE (lokalne szlaki RAAS). Z tego powodu punktem zainteresowań niniejszych badań było sprawdzenie potencjalnego hipotensyjnego działania peptydów pochodzących z nasion rzepaku, a w szczególności ich roli w hamowaniu enzymów wrażliwych na chymostatynę w różnych modelach nadciśnienia u szczura, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w krążeniu nerkowym oraz w czynności wydalniczej nerek.

3.1. Wpływ na ciśnienie tętnicze krwi

W pracy Marczak i wsp. (2003) peptydy izolowano z białek zapasowych nasion rzepaku. Wszystkie cztery peptydy podawano szczurom dożołądkowo i w każdym przypadku u szczurów SHR w utrwalonej fazie nadciśnienia zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie ciśnienia krwi tętniczej. Maksymalny efekt obserwowano już w 2-giej godzinie po podaniu peptydów z wyjątkiem peptydu RIY, który swój maksymalny hipotensyjny efekt osiągnął w 4-tej godzinie od podania [Marczak i wsp., 2003].

W niniejszej pracy przebadano *in vivo* wyżej przedstawione peptydy pod kątem ich działania hipotensyjnego, z wykorzystaniem 7- oraz 16-tygodniowych szczurów SHR. Peptydy podawano dożylnie. Nie uzyskaliśmy spodziewanych efektów, a każdy z badanych peptydów spowodował nawet wzrost ciśnienia, choć w przypadku niektórych peptydów (VW, IY oraz VWIS u szczurów SHR 16) był to wzrost przemijający. Różnice w uzyskanych rezultatach mogą mieć szereg przyczyn. Po pierwsze, peptydy rozpuszczono w soli fizjologicznej i podawano w infuzji dożylniej, nie zaś dożołądkowo jak w przypadku badań Marczak i wsp. (2003). Prawdopodobne jest, że do wywołania oczekiwanego działania badanych peptydów niezbędne jest ich przekształcenie lub aktywacja przez enzymy układu pokarmowego, co jest niemożliwe w przypadku infuzji dożylniej. Infuzja dożylna miała przyspieszyć działanie peptydów, jednak rezygnacja z dożołądkowego podania mogło zmienić ich aktywność.

Poza tym badane przez nas peptydy nie były izolowane z naturalnych białek z nasion zapasowych rzepaku, ale syntetyzowane *de novo*, co mogło spowodować zmianę ich konformacji i tym samym przyczynić się do zmiany ich właściwości hamowania szlaków RAAS [Fields i wsp. 2002]. Założeniem niniejszego projektu było, że choć syntetyzowane *de novo*, peptydy te pod względem budowy są identyczne z ich naturalnymi odpowiednikami i będą poddawane takim samym przemianom metabolicznym jak ich naturalne odpowiedniki. Ponadto według niektórych autorów [Norris i FitzGerald, 2013; Calce i wsp., 2015] syntetyzowane peptydy są bezpieczniejszymi od pozyskiwanych biologicznie, bowiem charakteryzuje je doskonała czystość

chemiczna i mikrobiologiczna oraz gwarantowana stabilność; są całkowicie standaryzowane i przewidywalne w działaniu.

Nie bez znaczenia jest także fakt, że w naszych badaniach obserwacje zmian ciśnienia tętniczego krwi (pomiar w tętnicy udowej) prowadzono na zwierzętach uśpionych (o zmienionej pod wpływem narkozy aktywności hormonów, czynników parakrynnych i nerwowych), a w pracy Marczak i wsp. (2003) ciśnienie krwi mierzono na ogonie u zwierząt czuwających.

3.2. Wpływ na stężenie elektrolitów w osoczu i osmolalność osocza

Peptydy nie wpłynęły na parametry osocza 7-tygodniowych szczurów SHR z wyjątkiem peptydu VW (Walina-Tryptofan), po infuzji którego istotnie podwyższyło się stężenie potasu w osoczu. Obserwowana zmiana była opóźniona w czasie, bowiem wystąpiła po odstawieniu peptydu. Co ciekawe, takiej reakcji po infuzji VW nie obserwowano u szczurów SHR 16. W tej grupie zaobserwowano wzrost stężenia sodu, potasu oraz osmolalności osocza na skutek infuzji VWIS (Walina-Tryptofan-Seryna-Tyrozyna); każda z obserwowanych zmian wystąpiła już po odstawieniu peptydu. Być może oba badane peptydy o wspólnej komponentcie (Walina-Tryptofan) wpływają na zaburzenie gospodarki wodno-elektrolitowej lub doszło do przesunięcia wody pomiędzy różnymi przestrzeniami, ale trudno wnioskować o mechanizmach przy tak krótkiej obserwacji (godzinna infuzja peptydu) i braku dodatkowych oznaczeń. Pozostałe przebadane peptydy nie wpłynęły u szczurów SHR na żaden z badanych parametrów osocza..

3.3. Wpływ na ukrwienie i opór naczyniowy w krążeniu nerkowym i krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową

Żaden z badanych peptydów nie wpłynął na przepływ krwi przez tętnicę nerkową (RBF) ani na opór naczyniowy w krążeniu nerkowym (RVR). Obserwowane zmiany dotyczyły natomiast przepływu przez tętnicę biodrową; IBF obniżył się w grupie SHR 7 po zakończeniu infuzji peptydu IY (Izoleucyna-Tyrozyna), podczas gdy w grupie kontrolnej przepływ utrzymał się na stałym poziomie. Natomiast w grupie SHR 16 peptydy (VW, VWIS oraz RIY) obniżyły IBF a podwyższyły opór naczyniowy w krążeniu zaopatrywanym przez tętnicę biodrową. Jeśli badane peptydy rzeczywiście wpływają na aktywność lokalnych RAAS można przypuszczać, że chymaza i/lub elastaza-2 mają istotny wpływ na utrzymanie stanu napięcia ściany naczyń oporowych u szczurów SHR oraz na pozanerkowy przepływ obwodowy.

3.4. Wpływ na przepływy wewnątrznerkowe

Nie wydaje się, aby przebadane peptydy miały istotny wpływ na przepływy wewnątrznerkowe. Jedyną obserwowaną zmianą dotyczyła przepływu przez rdzeń wewnętrzny nerki (IMBF) u szczurów SHR 16; peptyd IY istotnie podwyższył IMBF, a zmiana utrzymała się po odstawieniu peptydu. Natomiast peptyd RIY istotnie obniżył IMBF, ale zmiana zanikła po jego odstawieniu. Podwyższenie IMBF w przypadku peptydu IY może świadczyć o zablokowaniu ACE i/lub chymazy i w ten sposób uaktywnieniu naczyniorozszerzającej bradykininy. Nie tylko ACE, ale również chymaza ma zdolność inaktywacji bradykininy. Z kolei przeciwna reakcja (obniżenie IMBF) w przypadku peptydu RIY może świadczyć o uruchomieniu pewnych mechanizmów wewnątrznerkowych, odpowiadających za kontrolę przepływu krwi przez tę strefę nerki, ale obserwacje były zbyt krótkie, zwłaszcza że w pracy Marczak i wsp., (2003) to właśnie ten peptyd wymagał najdłuższej obserwacji dla wykazania jego działania.

3.5. Wpływ na wydalanie

Przebadane peptydy nie wpłynęły na wydalanie nerkowe w grupie SHR 7; obserwowane zmiany były przejściowe i zanikły po odstawieniu peptydów. Zmiany w wydalaniu wystąpiły w grupie SHR 16 po infuzji dwóch peptydów: VWIS oraz RIY. W obu przypadkach doszło do obniżenia filtracji kłębuszkowej (w przypadku VWIS efekt zanikł po odstawieniu peptydu, a w przypadku RIY pojawił się dopiero po odstawieniu peptydu). Peptydy wpłynęły także na diurezę, jednak w odmienny sposób: RIY przejściowo zwiększył diurezę, ale efekt zanikł po odstawieniu tego peptydu, natomiast VWIS spowodował obniżenie nie tylko diurezy, ale również wydalania sodu.. Co ciekawe, te przeciwstawne reakcje były obserwowane przy przejściowym wzroście ciśnienia tętniczego krwi, który obserwowano w przypadku obu peptydów. Spodziewanym następstwem podwyższenia MABP byłby wzrost wydalania nerkowego (jak w przypadku RIY), a nie jego obniżenie. Być może peptydy oddziałują na różne układy regulujące czynność wydalniczą nerki, ale możliwe jest, że obserwowane zmiany są tylko etapem przejściowym i dla pełnej ich interpretacji wymagane są doświadczenia chroniczne. Należy zwrócić uwagę, że obserwowane zmiany dotyczą szczurów SHR z rozwiniętym nadciśnieniem tętniczym, u których dochodzi do zaburzeń w autoregulacji RBF i w wydalaniu a przebadane peptydy krótkotrwale ale jednak zaburzyły pracę tych układów.

W przypadku prowadzonych przeze mnie krótkich obserwacji peptydy nie dały oczekiwanego efektu obniżenia MABP ani też nie miały większego wpływu na hemodynamikę ustrojową i czynność wydalniczą nerki. Z tego też powodu w obu grupach SHR zrezygnowano z oznaczeń stężenia Ang II w osoczu i w tkankach. Dla pełniejszej interpretacji uzyskanych wyników wymagane są doświadczenia chroniczne.

4. Podsumowanie badań i wnioski

Przedstawione powyżej rozważania można zawrzeć w kilku najistotniejszych punktach:

1. Enzymy wrażliwe na chymostatynę pełnią istotną rolę w syntezie Ang II w osoczu i w tkankach w każdym z badanych typów nadciśnienia.
2. Zaobserwowane różnice pomiędzy poszczególnymi modelami nadciśnienia wskazują, że charakter zmian hemodynamiki i wydalania nerkowego oraz mechanizmy kształtowania ciśnienia krwi tętniczej są różne w każdym typie badanego nadciśnienia i w każdym z opisanych modeli w odmiennym stopniu zaznacza się wpływ enzymów wrażliwych na chymostatynę, czyli chymazy lub/i elastazy-2.
3. Otrzymane wyniki wskazują na istotną rolę alternatywnego, ACE-niezależnego szlaku syntezy Ang II szczególnie w modelu nadciśnienia o podłożu genetycznym u szczurów SHR z rozwiniętym nadciśnieniem. Szczególnie zaznacza się jej udział w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi w tym typie nadciśnienia, co w literaturze było jedną z najbardziej spornych kwestii odnośnie roli lokalnych RAAS w różnych typach nadciśnienia.
4. Choć u młodszych, 7-tygodniowych SHR nie stwierdzono zmian w ciśnieniu tętniczym krwi po zablokowaniu chymazy, to interesujące wydaje się utrzymanie perfuzji nerki na stałym poziomie. Ponadto w tej grupie po zablokowaniu chymazy wzrósł opór naczyniowy w krążeniu kończyny tylnej, podczas gdy ciśnienie krwi tętniczej utrzymało się na stałym poziomie. Te mechanizmy regulacji hemodynamiki i ciśnienia krwi, które widoczne były u szczurów SHR 7, zostały zaburzone u starszych szczurów SHR.
5. Enzymy zależne od chymostatyny wydają się mieć znaczenie protekcyjne dla prawidłowego ukrwienia nerek u młodych SHR, co teoretycznie mogłoby w dłuższym procesie przyczynić się ograniczenia rozwoju nadciśnienia u tych zwierząt w późniejszym wieku.
6. U młodych, 7-tygodniowych SHR zależny od chymazy wzrost poziomu Ang II, który obserwowano jedynie w sercu, może być jedną z przyczyn rozwijającego się później nadciśnienia.
7. Chymaza lub inne wrażliwe na chymostatynę enzymy konwertujące Ang I nie wydają się mieć znaczącej roli w utrzymaniu hemodynamiki ustrojowej i wydalania nerkowego w nadciśnieniu zależnym od wysokiej podaży sodu w diecie czy zależnym od zwężenia

- tętnicy nerkowej (UNX HS, 2K1C) mimo, że istotnie przyczyniają się do zwiększenia poziomu Ang II zarówno w tkankach, jak i w osoczu.
8. Ponieważ większość obserwowanych efektów hamowania chymazy pojawiała się z opóźnieniem, w celu wykazania fizjologicznego znaczenia chymazy w kontroli hemodynamiki i ciśnienia krwi należy zastosować długotrwałe blokowania enzymów lokalnych szlaków syntezy Ang II, w doświadczeniach przewlekłych.
 9. Bardzo skuteczne w obniżeniu ciśnienia tętniczego krwi okazało się jednoczesne blokowanie ogólnoustrojowego i lokalnych szlaków konwersji Ang I u szczurów SHR w fazie utrwalonego nadciśnienia. Jednoczesne użycie ACEi (kaptoprylu) i chymostatyny daje tutaj lepsze efekty hipotensyjne niż użycie samej chymostatyny oraz skuteczniej obniża stężenie Ang II w osoczu i tkankach.
 10. Jednoczesne blokowanie obu układów RAAS, zależnego od aktywności ACE i od enzymów wrażliwych na chymostatynę, może dać zdecydowanie lepsze wyniki w terapii nadciśnienia tętniczego.
 11. Nie stwierdzono istotnego wpływu peptydów z nasion rzepaku (po podaniu dożylnym) na kształtowanie ciśnienia krwi, hemodynamiki ustrojowej i wydalania u szczurów z nadciśnieniem o podłożu genetycznym (SHR), przynajmniej w czasie krótkotrwałych obserwacji.
 12. Wydaje się, że wskazane jest przeprowadzenie badań chronicznych z użyciem powyżej opisanych peptydów o potencjalnym hipotensyjnym działaniu, z wykorzystaniem dożołądkowej drogi ich podania.

VI. Piśmiennictwo

1. Abe K, Nakashima H, Ishida M, Miho N, Sawano M, Soe NN, Kurabayashi M, Chayama K, Yoshizumi M, Ishida T. 2008. Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens Res*, 31(5):987-98.
2. Adachi Y, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Kawakami R, Nakanishi M, Nakagawa Y, Tanimoto K, Saitoh Y, Yasuno S, Usami S, Iwai M, Horiuchi M, Nakao K. 2003. Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation*, 107(19):2406-8.
3. Adams MA, Bobik A, Korner PI. 1989. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. *Hypertension*, 14(2): 191-202.
4. Ahmad S, Wei CC, Tallaj J, Dell'Italia LJ, Moniwa N, Varagic J, Ferrario CM. 2013. Chymase mediates angiotensin-(1-12) metabolism in normal human hearts. *J Am Soc Hypertens* 7, 128–136.
5. Ahmad S, Varagic J, Westwood BM, Chappell MC, Ferrario CM. 2011. Uptake and metabolism of the novel peptide angiotensin-(1–12) by neonatal cardiac myocytes. *PLoS One*, 6: e15759.
6. Akasu M, Urata H, Kinoshita A, Sasaguri M, Ideishi M, Arakawa K. 1998. Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension*, 32, 514–520.
7. Akishita M, Nagai K, Xi H, Yu W, Sudoh N, Watanabe T, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Kozaki K, Horiuchi M, Toba K. 2005. Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Hypertension*, 45(6):1188-93.
8. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. 1999. Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol*, 11:S23-9.
9. Arendshorst WJ. 1979. Autoregulation of renal blood flow in spontaneous hypertensive rats. *Circ Res*, 44:344-349.
10. Arendshorst WJ, Brannstrom K, Ruan X. 1999. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *J Am Soc Nephrol*, 10: S149-161.
11. Atlas SA. 2007. The renin–angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*, 13:9-20.

12. Avila MD, Morgan JP, Yan X. 2011. Genetically Modified Mouse Models Used for Studying the Role of the AT2 Receptor in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *J Biomed Biotechnol*, 141039.
13. Basso N, Terragno NA. 2001. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 38: 1246-1249.
14. Bayorh MA, Ganafa AA, Emmett N, Socci RR, Eatman D, Fridie IL. 2005. Alterations in aldosterone and angiotensin II levels in salt-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 27: 355-367.
15. Bądryńska B, Grzelec-Mojzesowicz M, Dobrowolski L, Sadowski J. 2002. Differential effect of angiotensin II on blood circulation in the renal medulla and cortex of anaesthetised rats. *J Physiol*, 538 (Pt 1): 159-66.
16. Becari C, Oliveira EB, Salgado MCO. 2011. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44,914-919.
17. Bell PD, Mashburn N, Unlap MT. 2000. Renal sodium/calcium exchange; a vasodilator that in salt-sensitive hypertension. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168: 209-214.
18. Belova LA. 2000. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc)* 65, 1337-1345.
19. Berridge MJ. 1983. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J*. 212 (3):849-58.
20. Birnbaumer L, Codina J, Yatani A, Mattera R, Graf R, Olate J, Themmen AP, Liao CF, Sanford J, Okabe K. 1989. Molecular basis of regulation of ionic channels by G proteins. *Recent Prog Horm Res*, 45:121-208.
21. Brenner BM, SchorN, Ichikawa I. 1982. Role of angiotensin II in the physiologic regulation of glomerular filtration. *Am J Cardiol*, 49:1430-1433.
22. Brunner HR, Kirshman JD, Sealey JE. 1971. Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. *Science*, 174(16):1344-1346.
23. Butler MG. 2010. Genetics of hypertension. Current status. *J Med Liban*, 58(3):175-8.
24. Calce E, Vitale RM, Scaloni A, Amodeo P, De Luca S. 2015. Air oxidation method employed for the disulfide bond formation of natural and synthetic peptides. *Amino Acids*, DOI 10.1007/s 00726-015-1983-4.
25. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB. 1995. Angiotensin peptides in spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats. *Hypertension*, 25(5):928-34.
26. Campbell DJ, Lawrence AC, Towrie A, Kladis A, Valentijn AJ. 1991. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension* 18, 763-73.

27. Campbell DJ, Ziogas J, Kladis A. 1990. Metabolism of tetradecapeptide, angiotensinogen and angiotensin I and II by isolated perfused rat hindlimbs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 17:335–350.
28. Campbell DJ. 1987. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*, 79:1–6.
29. Castro-Moreno P, Pardo JP, Hernández-Muñoz R, López-Guerrero JJ, Del Valle-Mondragón L, Pastelín-Hernández G, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R. 2012. Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2(3 Pt 4):61-9.
30. Caughey GH, Raymond WW, Wolters PJ. 2000. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim Biophys Acta*, 1480(1-2): 245-57.
31. Cerqua S, Samaan A. 1939. Cure of experimental renal hypertension. *Clin Sci*, 40:113–118.
32. Chen ZY, Peng C, Jiao R, Wong YM, Yang N, Huang Y. 2009. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem*, 57(11): 4485-4499-29.
33. Chonchol M, Linas S. 2006. Diagnosis and management of ischemic nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1(2):172–81.
34. Cohen ML, Kurz KD. 1982. Angiotensin converting enzyme inhibition in tissues from spontaneously hypertensive rats after treatment with captopril or MK-421. *J Pharmacol Exp Ther*, 220(1):63-69.
35. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. 1995. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, 91 (1): 161–70.
36. Covic A, Gusbeth-Tatomir P. 2009. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in renal artery stenosis, renovascular hypertension, and ischemic nephropathy: diagnostic implications. *Prog Cardiovasc Dis*, 52(3):204-8.
37. Cowley AW. 1992. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev*, 72: 231-300.
38. Darewicz M, Dziuba B, Minkiewicz P, Dziuba J. 2011. The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments. *Food Rev Int*, 27(4): 357-388.
39. Daza L, Kornhauser C, Zamora L, Flores J. 2005. Captopril effect on prostaglandin E2, thromboxane B2 and proteinuria in lupus nephritis patients. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 78(1-4):194-201.
40. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. 2005. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*, 46(6):1347-54.

41. De Gasparo M, Catt KJ; Inagami T; Wright JW; Unger Th. 2000. International Union of Pharmacology. XIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological Reviews* 52 (3): 415–472.
42. De Mello WC. 2011. Novel aspects of angiotensin II action in the heart. Implications to myocardial ischemia and heart failure. *Regul Pept*, 166: 9–14.
43. Derkx FH, Schalekamp MA. 1994. Renal artery stenosis and hypertension. *Lancet*, 344(8917):237–239.
44. Doggrell SA, Wanstall JC. 2004. Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res*, 61: 653–662.
45. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart R.E, Acton S. 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87: E1-E9.
46. Dostal DE, Baker KM. 1993. Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends Cardiovasc Med*, 3, 67-74.
47. Dubourg L, Hadj-Aïssa A, Ferrier B. 2010. Adaptation of an enzymatic polyfructosan assay to clinical practice. *Anal Biochem*, 405(2):266-268.
48. Duchin KL, Willard DA. 1984. The effect of captopril on renal hemodynamics in hypertensive patients. *J Clin Pharmacol*, 24(8-9):351-9.
49. Edwards RM. 1983. Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *Am J Physiol*, 244(5):F526-34.
50. Ehret GB, Caulfield MJ. 2013. Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. *Eur Heart J*, 34:951.
51. Ely DL, Daneshvar H, Turner EM, Johnson ML, Salisbury RL. 1993. The hypertensive Y chromosome elevates blood pressure in F11 normotensive rats. *Hypertension*, 21:1071-1075.
52. Escobales N, Crespo MJ. 2005. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Current Vascular Pharmacology*, 3 (3): 231-246.
53. Escudero E, Sentandreu MA, Arihara K, Toldrá F. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. *J. Agric. Food Chem* 58(5): 2895-2901.
54. Faria M, da Costa EL, Gontijo J, Netto FM. 2008. Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. *J Med Food*, 11(3): 560-567.
55. Fields GB, Lauer Fields JL, Liu RQ, Barany G. 2002. Principles and practice of solid phase peptide synthesis. In *Synthetic Peptides: A User's Guide*, G. A. Grant, ed., New York, W. H. Freeman and Co., 77-183.

56. Flamant M, Placier S, Dubroca C, Esposito B, Lopes I, Chatziantoniou C, Tedgui A, Dussaule JC, Lehoux S. 2007. Matrix Metalloproteinases in Early Hypertensive Vascular Remodeling. *Journal of the American Heart Association*, 50: 212-218.
57. 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.
58. Folkow B. 1982. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*, 62:347-504.
59. Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. 2000. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci*, 65(4): 564-569.
60. Fujita H, Yoshikawa M. 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44(1-2):123-7.
61. Gardiner SM, Bennett T. 1983. The effects of captopril on blood pressure, urinary water and electrolyte excretion and drinking behaviour in Brattleboro rats. *Clin Sci (Lond)*, 65(6):589-97.
62. Gawrys O, Marta Polkowska M, Roszkowska-Chojecka M, Gawarecka K, Chojnacki T, Swieżewska E, Masnyk M, Chmielewski M, Rafałowska J, Kompanowska-Jezińska E. 2014. Effects of liposomes with polyisoprenoids, potential drug carriers, on the cardiovascular and excretory system in rats. *Pharmacol Rep*, 66(2):273-8.
63. Geleijnse JM, Kok FJ, Grobbee DE. 2003. Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: a metaregression analysis of randomised trials. *Journal of Human Hypertension*, 17: 471-480.
64. Givertz MM. 2001. Manipulation of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 104, 14-18.
65. Gobé GC, Axelsen RA, Searle JW. 1990. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest*, 63(6):770-9.
66. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. 1934. Studies on experimental hypertension : I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*, 59(3):347-379.
67. Gondo M, Maruta H, Arakawa K. 1989. Direct formation of angiotensin II without renin or converting enzyme in the ischemic dog heart. *Jpn Heart J*, 30, 219-229.
68. Gray SD. 1984. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biol Neonate*, 45(1): 25-32.
69. Grzeszczak W. 2007. Miejsce ramiprilu we współczesnej terapii chorych na cukrzycę. *Diabetokardiologia, Choroby Serca i Naczynia*, 5 (3): 134-140.
70. Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. 1992. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*, 20: 763-767.

71. Guo C, Ju H, Leung D, Massaelli H, Shi M, Rabinovitch M. 2001. A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest*, 107: 703-715.
72. Guyton AC. 1991. Blood pressure control—special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 252: 1813–1816.
73. Guyton AC, Coleman TG, Granger HJ. 1972. Circulation: overall regulation. *Annu Rev Physiol*, 34:13-46.
74. Hackam DG, Spence JD, Garg AX, Textor SC. 2007. Role of renin-angiotensin system blockade in atherosclerotic renal artery stenosis and renovascular hypertension. *Hypertension*, 50(6):998–1003.
75. Hajj-ali AF, Zimmerman BG. 1991. Kinin contribution to renal vasodilator effect of captopril in rabbit. *Hypertension*, 17(4):504-9.
76. Harrison-Bernard LM, Garavilla L, Bivona BJ. 2013. Enhanced Vascular Chymase-Dependent Conversion of Endothelin in the Diabetic Kidney. *Ochsner J*, 13(1), 49–55.
77. Hernández-Ledesma B, Quiros A, Amigo L, Recio I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int Dairy J*, 17(1): 42-49.
78. Hoit BD, Shao Y, Kinoshita A, Gabel M, Husain A, Walsh RA. 1995. Effects of angiotensin II generated by an angiotensin converting enzyme-independent pathway on left ventricular performance in the conscious baboon. *J Clin Invest* 95, 1519–1527.
79. Hollenberg NK, Fisher NDL, Price DA. 1998. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*, 32, 387-392.
80. Hollenberg NK, Williams GH. 1990. ACE inhibition, the kidney and nonmodulation. *ACE Report*, 67: 1-5.
81. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. 1999. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 33: 613–621.
82. Huang XR, Chen WY, Truong LD, Lan HY. 2003. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol*, 14, 1738–1747.
83. Hultström M. 2012. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 30(6):1087-91.
84. Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL, Ferrario CM. 2005. Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289 (3) :H1013.

85. Ingelfinger JR, Pratt RE, Ellison K, Dzau VJ. 1986. Sodium regulation of angiotensinogen mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *J Clin Invest*, 78(5):1311-5.
86. Ito N, Ohishi M, Yamamoto K, Tataru Y, Shiota A, Hayashi N, Komai N, Yanagitani Y, Rakugi H, Ogihara T. 2007. Renin-angiotensin inhibition reverses advanced cardiac remodeling in aging spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 20(7):792-9.
87. Iwaniak A. 2011. Analiza zależności między strukturą peptydów pochodzących z białek żywności a ich aktywnością inhibitorową wobec enzymu konwertującego angiotensynę. Ocena przydatności metod in silico w badaniach nad białkowymi prekursorami bioaktywnych peptydów. Wyd UWM, Olsztyn, 9-31.
88. Januszewicz A, Januszewicz W, Rużyłło W. 2005. Inhibitory konwertazy angiotensyny w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego. Medycyna Praktyczna, Kraków, wyd. I.
89. Johnston CI. 1994. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension*, 23: 258-268.
90. Ju H, Gros R, You X, Tsang S, Husain M, Rabinovitch M. 2001. Conditional and targeted overexpression of vascular chymase causes hypertension in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:7469–7474.
91. Kamari Y, Shimoni N, Koren F, Peleg E, Sharabi Y, Grossman E. 2010. High-salt diet increases plasma adiponectin levels independent of blood pressure in hypertensive rats: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Hypertens*, 28(1):95-101.
92. Kawabata A, Baoum A, Ohta N, Jacquez S, Seo GM, Berkland C, Tamura M. 2012. Intratracheal Administration of a Nanoparticle-Based Therapy with the Angiotensin II Type 2 Receptor Gene Attenuates Lung Cancer Growth *Cancer Res*, 72:2057-2067.
93. Kawabe K, Watanabe TX, Shiono K, Sokabe H. 1978. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. *Jpn Heart J*, 19 (6): 886–94.
94. Kawaguchi K, Nakamura T, Kamiie J, Takahashi T, Yamamoto N. 2012. Accumulation of ACE inhibitory tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in vascular endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76(9): 1792-1795.
95. Kirimura K, Takai S, Jin D, Muramatsu M, Kishi K, Yoshikawa K, Nakabayashi M, Mino Y, Miyazaki M. 2005. Role of chymase-dependent angiotensin II formation in regulating blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 28(5):457-64.
96. Kishi K, Jin D, Takai S, Muramatsu M, Katayama H, Tamai H, Miyazaki M. 2006. Role of chymase-dependent angiotensin II formation in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Pediatr Res Jul*, 60(1):77-82.

97. Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*, 9(16): 1309-1323.
98. Kobori H; Nangaku M; Navar LG; Nishiyama A. 2007. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacological Reviews* 59 (3): 251–287.
99. Koka V, Wang W, Huang XR, Kim-Mitsuyama S, Truong LD, Lan HY. 2006. Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin Igenerating pathway in diabetic complications. *Circulation*, 113, 1353–1360.
100. Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kovanen PT. 2003. Role for chymase in heart failure. *Circulation*, 107: 2522.
101. Koletsky S, Pavlicko KM, Rivera Velez JM. 1971. Renin angiotensin activity in hypertensive rats with a single ischemic kidney, *Lab Invest*, 24(1):41–44.
102. Konieczny G, Posadzy-Mańczyńska A, Tykarski A. 2006. Działania niepożądane inhibitorów konwertazy angiotensyny. *Choroby serca i naczyní*, 3:140-148.
103. Korhonen H, Pihlanto A. 2007. Bioactive peptides from food proteins. W: Handbook of Food Products Manufacturing: Health, Meat, Milk. New York, Hoboken, Wydawn John Wiley & Sons, 5-38.
104. Kumagai H, Suzuki H, Ichikawa M, Nishizawa M, Ryuzaki M, Kumagai K, Saruta T. 1995. Different responses of renal blood flow and sympathetic nerve activity to captopril and nicardipine in conscious renal hypertensive rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25(1):57-64.
105. Kunori Y, Koizumi M, Masegi T, Kasai H, Kawabata H, Yamazaki Y, Fukamizu A. 2002. Rodent alpha-chymases are elastase-like proteases. *Eur J Biochem*, 269 (23): 5921-30.
106. Kun T, Szpunar G. 2001. Rola komórki tucznej w patogenezie zmian miażdżycowych. *Polski Przegląd Kardiologiczny*, 3, 9-13.
107. Kurokawa K. 1996. Kidney, salt, and hypertension. How and why. *Kidney Int*, 55: S46–S51.
108. Lang CC, Rahman AR, Balfour DJ, Struthers AD. 1992. Prazosin blunts the antinatriuretic effect of circulating angiotensin II in man. *J Hypertens*, 10 (11):1387-95.
109. Lee HB, Blaufox MD. 1992. Renal functional response to captopril during diuretic therapy. *J Nucl Med*, 33(5):739-43.
110. Leife R, Estevao R, Resende AC, Salgado MC. 1997. Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and arterial bed. *Braz J Med Biol Res*, 30, 649–656.
111. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. 2005. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*, 143(3), 160-173.
112. Li Y, Liu FY, Peng YM, Li J, Chen J. 2007. Mast cell, a promising therapeutic target in tubulointerstitial fibrosis. *Med Hypotheses*, 69 (1), 99-103.

113. Li M, Liu K, Michalicek J, Angus JA, Hunt JE, Dell'Italia LJ, Feneley MP, Graham RM, Husain A. 2004. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J Clin Invest*, 114: 112–120.
114. Li GH, Le GW, Shi YH, Shrestha S. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutr Res*, 24(7): 469-486.
115. Liebau MC, Lang D, Böhm J, Endlich N, Bek MJ, Witherden I, Mathieson PW, Saleem MA, Pavenstädt H, Fischer KG. 2006. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(3): F710-9.
116. Lorenz JN. 2010. Chymase: the other ACE? *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: F35–F36.
117. Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. 2004. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. *The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. Eur Heart J*, 25:1454-70.
118. MacFadyen JR, Lees KR, Reid JL. 1991. Tissue and plasma angiotensin converting enzyme and the response to ACE inhibitor drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 31:1-13.
119. Marczak ED, Usui H, Fujita H, Yang Y, Yokoo M, Lipkowski AW, Yoshikawa M. 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 24, 791-798.
120. Marks LS, Maxwell MH. 1979. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension*, 1: 384-388.
121. Matsubara H. 1998. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*, 83: 1182–1191.
122. McCaa RE, Gillespie JB. 1984. Effects of captopril and enalapril on sodium excretion and blood pressure in sodium-deficient dogs. *Fed Proc*, 43(5):1336-41.
123. McDonald JE, Padmanabhan N, Petrie MC, Hillier C, Connell JM, McMurray JJ. 2001. Vasoconstrictor effect of the angiotensin-converting enzyme-resistant, chymase-specific substrate [Pro(11)(D)-Ala(12)] angiotensin I in human dorsal hand veins: in vivo demonstration of non-ACE production of angiotensin II in humans. *Circulation*; 104, 1805–1808.
124. McEuen AR, Sharma B, Walls AF. 1995. Regulation of the activity of human chymase during storage and release from mast cells: the contributions of inorganic cations, pH, heparin and histamine. *Biochim Biophys Acta*, 1267, 115–121.
125. McPherson EA, Luo Z, Brown RA, Lebard LS, Corles CC, Speth RC, Bagby SP. 2004. Chymase like angiotensin I-generating activity in end-stage human autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 15, 493-500.

126. Melander O, Groop L, Hulthen UL. 2000. Effect of salt on insulin sensitivity differs according to gender and degree of salt sensitivity. *Hypertension*, 35, 827–831.
127. Mento PF, Wilkes BM. 1987. Plasma angiotensins and blood pressure during converting enzyme inhibition. *Hypertension*, 9(6 Pt 2):III42-8.
128. Miyake-Ogawa C, Miyzaki M, Abe K, Harade T, Ozono Y, Sakai H, Koji T, Kohno S. 2005. Tissue specific expression of renin-angiotensin system components in IgA nephropathy. *Am J Nephrol*: 25, 1-12.
129. Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. 2006. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther*, 112(3):668-76.
130. Miyazaki M, Takai S. 2001. Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res*, 24, 189–193.
131. Miyazaki M, Takai S. 2000. Role of chymase on vascular proliferation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1, 23–26.
132. Moniwa N, Varagic J, Simington SW, Ahmad S, Nagata S, Voncannon JL, Ferrario CM. 2013. Primacy of angiotensin converting enzyme in angiotensin-(1-12) metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(5): H644-50.
133. Mooser V, Nussberger J, Juillerat L, Burnier M, Waeber B, Bidiville J, Pauly N, Brunner HR. 1990. Reactive hyperreninemia is a major determinant of plasma angiotensin II during ACE inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15(2):276-282.
134. 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.
135. Morikawa T, Imanishi M, Suzuki H, Okada N, Okamura M, Konishi Y, Yoshioka K, Takai S, Miyazaki M. 2005. Mast cell chymase in the ischemic kidney of severe unilateral renovascular hypertension. *Am J Kidney Dis*, 45 (3), 45-50.
136. Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr*, 47(4): 171-182.
137. Müller DN, Fischli W, Clozel JP, Hilgers KF, Bohlender J, Ménard J, Busjahn A, Ganten D, Luft FC. 1998. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res*, 82(1), 13-20.
138. Nakamura S, Averill DB, Chappell MC, Diz DI, Brosnihan KB, Ferrario CM. 2003. Angiotensin receptors contribute to blood pressure homeostasis in salt-depleted SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (1): R164-73.

139. Navar LG. 2005. The role of the kidneys in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 7(9): 542-9.
140. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. 2011. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Current Opinion in Pharmacology*, 11 (2): 180-186.
141. Nishizuka Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308 (5961): 693-698.
142. Noda K, Sasaguri M, Ideishi M, Ikeda M, Arakawa K. 1993. Role of locally formed angiotensin II and bradykinin in the reduction of myocardial infarct size in dogs. *Cardiovasc Res*, 27(2): 334-40.
143. Nolin TD, Colaizzi IV, Palevsky PM, Matzke GR, Frye RF. 2002. Rapid microtiter plate assay for determination of inulin in human plasma and dialysate. *J Pharm Biomed Anal*, 15;28(2): 209-215.
144. Norris R, FitzGerald RJ. 2013. Antihypertensive Peptides from Food Proteins, Bioactive Food Peptides in Health and Disease, Dr. Blanca Hernández-Ledesma (Ed.), ISBN: 978-953-51-0964-8, InTech, DOI: 10.5772/51710.
145. Oak JH, Cai H. 2007. Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice. *Diabetes*, 56 (1): 118-26.
146. Oliver JA, Sciacca RR. 1984. Local generation of angiotensin II as a mechanism of regulation of peripheral vascular tone in the rat. *J Clin Invest*, 74:1247–1251.
147. Olszynski KH. 2013. Modyfikacja czynności i struktury nerki w zależności od wysokiej podaży sodu – udział wybranych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Rozprawa doktorska pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Kompanowskiej-Jeziarskiej, Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. prof. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, str. 50.
148. Okamoto K, Yamri Y, Ooshima A, Park C, Haebara H, Matsumoto M, Tanaka T, Okuda T, Hazema F, Kyogoku M. 1972. Establishment of the inbred strain of the spontaneously hypertensive rats and genetic factors involved in hypertension, in Okamoto K (ed): *Spontaneous Hypertension: Its Pathogenesis and Complications*. Tokyo, Iqaku Shoin Ltd, 1-8.
149. Okamoto K, Aoki K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, 27: 282 - 293.
150. Okamura T, Okunishi H, Ayajiki K, Toda N. 1990. Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated artery: Role of two different angiotensin II-generating enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15: 353–359.

151. Okamura T, Okunishi H, Ayajiki K, Toda N. 1984. Conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension*, 6: 216–221.
152. Okunishi H, Oka Y, Shiota N, Kawamoto T, Song K, Miyazaki M. 1993. Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways: humans versus rodents. *Jpn J Pharmacol*, 62: 207–210.
153. Okunishi H, Miyazaki M, Okamura H, Toda N. 1987. Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun*, 149: 1186–1192.
154. Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. 1984. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens*, 2: 277–284.
155. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. 1997. Expression of the subtype-2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*, 30: 1238–1246.
156. Pallone TL, Robertson CR, Jamison L. 1990. Renal medullary microcirculation. *Physiological Reviews*, 70: 3, 885-920.
157. Park S, Bivona BJ, Kobori H, Seth DM, Chappell MC, Lazartigues E, Harrison-Bernard LM. 2010. Major role for ACE-independent intrarenal ANG II formation in type II diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: F37–F48.
158. Paula CA, Sousa MV, Salgado MC, Oliveira EB. 1998. Purification and substrate specificity of an angiotensin converting elastase-2 from the rat mesenteric arterial bed perfusate. *Biochim Biophys Acta*, 1388: 227–238.
159. Phillips MI, Schmidt-Ott KM. 1999. The discovery of renin 100 years ago. *News Physiol Sci*, 14: 271-274.
160. Pihlanto A, Mäkinen S. 2013. Antihypertensive properties of plant protein derived peptides. W: Hernandez-Ledesma B, Hsieh CC. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease. INTECH*, 145-182.
161. Ploth DW. 1983. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney one-clip renal vascular hypertension. *Am J Physiol*, 245: F131–F141.
162. Qian Y, Liu Y, Tang H, Zhou W, Jiang L, Li Y, Li N, Li M, Xiao X. 2013. Circulating and local renin-angiotensin-aldosterone system express differently in atrial fibrillation patients with different types of mitral valvular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 14 (3): 204-11.
163. Ram CV. 1997. Renovascular hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 6(6): 575–9.
164. Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J. 1982. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem*, 257: 8619–8622.

165. Rettig R. 1993. Does the kidney play a role in the aetiology of primary hypertension? Evidence from renal transplantation studies in rats and humans. *Journal of Human Hypertension*, 7 (2): 177–80.
166. Richard V, Hurel-Merle S, Scalbert E, Ferry G, Lallemand F, Bessou JP. 2001. Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. *Circulation*, 104: 750-752.
167. Riegger GA, Kochsiek K. 1986. Vasopressin, renin and norepinephrine levels before and after captopril administration in patients with congestive heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 58(3): 300-3.
168. Roba JL. 1976. The use of spontaneously hypertensive rats for the study of anti-depressive agents. *Lab Anim Sci*, 26: 305-319.
169. Roman RJ, Kaldunski ML, Scicli AG, Carretero OA. 1988. Influence of kinins and angiotensin II on the regulation of papillary blood flow. *Am J Physiol*, 255: F690-F698.
170. Roman RJ. 1987. Altered pressure-natriuresis relationship in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 9: III-131-III-136.
171. Rosivall L, Narkates AJ, Oparil S, Navar LG. 1987. De novo intrarenal formation of angiotensin II during control and enhanced renin secretion. *Am J Physiol*, 252: F1118–F1123.
172. Rosón MI, Cavallero S, Della Penna S, Cao G, Gorzalczany S, Pandolfo M, Kuprewicz A, Canessa O, Toblli JE, Fernández BE. 2006. Acute sodium overload produces renal tubulointerstitial inflammation in normal rats. *Kidney Int*, 70(8): 1439-46.
173. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J. 2006. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*, 21(1): 16-20.
174. Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9): 765-791.
175. Ryckwaert F, Colson P, Guillon G, Foëx P. 2005. Cumulative effects of AT1 and AT2 receptor blockade on ischaemia-reperfusion recovery in rat hearts. *Pharmacol Res*, 51(6): 497-502.
176. Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Burrell Welborn M 3rd, Chappell MC, Modrall GJ. 2005. Angiotensin converting enzyme-independent angiotensin ii production by chymase is up-regulated in the ischemic kidney in renovascular hypertension. *J Surg Res*, 127: 2, 65-9.
177. Sagvolden T, Johansen EB, Wøien G. 2009. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*, 57 (7-8): 619–26.

178. 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.
179. Santos CF, Caprio MA, Oliveira EB, Salgado MC, Schippers DN, Munzenmaier DH. 2003. Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285: H775–H783.
180. Santos CF, Oliveira EB, Salgado MCO. 2002a. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39: 628-635.
181. Santos CF, Paula CA, Salgado MC, Oliveira EB. 2002b. Kinetic characterization and inhibition of the rat MAB elastase-2, an angiotensin I-converting serine protease. *Can J Physiol Pharmacol*, 80: 42–47.
182. Saye JA, Singer HA, Peach MJ. 1984. Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension*, 6: 216–221.
183. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D, Hernandez-Escalante VM. 2011. Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev Int*, 27(3): 213-226.
184. Shiota N, Fukamizu A, Takai S, Okunishi H, Murakami K, Miyazaki M. 1997. Activation of angiotensin II-forming chymase in the cardiomyopathic hamster heart. *J Hypertens*, 15: 431–440.
185. Sienkiewicz-Szłapka E, Jarmołowska B, Krawczuk S, Kostyra E, Kostyra H, Bielikowicz K. 2009. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. *Int Dairy J*, 19(4): 252-257.
186. Siragy HM, Inagami T, Ichiki T, Carey RM. 1999. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (11): 6506–6510.
187. Siragy HM, Carey RM. 1997. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*, 100 (2): 264-9.
188. Siragy HM, Carey RM. 1996. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest*, 97(8): 1978-82.
189. Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ. 1994. Number and size of renal glomeruli in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Hypertens* 12: 1373-1376.
190. Smith TL, Hutchins PM. 1979. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension*, 1(5): 508-17.

191. Solivan S, Selwood T, Wang ZM, Schechter NM. 2002. Evidence for diversity of substrate specificity among members of the chymase family of serine proteases. *FEBS Letters* 512 (1–3): 133–138.
192. Suzuki T, Yamamoto K, Morita N, Ohta Y, Okamoto K. 1987. Recent studies on M-SHRSP and their crossbred offspring with WKY. *Prog Clin Biol Res*, 229: 41-52.
193. Suzuki H, Fujimaki M, Nakane H, Saito I, Takeshita E, Saruta T. 1985. Effect of the angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril (SQ14,225), on orthostatic sodium and water retention in patients with idiopathic edema. *Nephron*, 39(3): 244-9.
194. Swislocki A and Tsuzuki A. 1993. Insulin-resistance and hypertension – glucose-intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty-acids in the lean Spontaneously Hypertensive Rat. *Am J Med Sci*, 306: 282-286.
195. Tanase H, Yamori Y, Hansen CT and 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.
196. Tanase H and Suzuki Y. 1971. Strain difference and genetic determination of blood pressure in rats. *Exp Animals Japan*, 20: 1-5.
197. Takai S, Jin D, Chen H, Li W, Yamamoto H, Yamanishi K, Miyazaki M, Higashino H, Yamanishi H, Okamura H. 2014. Chymase inhibition improves vascular dysfunction and survival in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 32(8): 1637-48.
198. Takai S, Jin D, Muramatsu M, Miyazaki M. 2004. Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 518–522.
199. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Miyazaki M. 1999. Chymase-dependent angiotensin II formation in human vascular tissue. *Circulation*, 100: 654–658.
200. Thomsen O, Danielsen H, Sørensen SS, Pedersen ER. 1986. Effect of captopril on renal haemodynamics and the renin-angiotensin-aldosterone and osmoregulatory systems in essential hypertension. *Eur J Clin Pharmacol*, 30: 1-6.
201. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 275: 33238-33243.
202. Tobian L, Hanlon S. 1990. High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension*, 15: 900-903.
203. Tobian L, Duke M. 1969. Increased calcium and water concentrations in the left ventricle of hypertensive rats. *American Journal of Physiology*, 217: 522-524.
204. Tobian L, Janecek J, Tombouljian A, Ferreira D. 1961. Sodium and potassium in the walls of arterioles in experimental renal hypertension. *J Clin Invest*, 40(10): 1922–1925.

205. Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, wakino S, Saruta T. 2002. Differential regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia. *Hypertension*, 40: 34-40.
206. Trippodo N, and Frohlich E. 1981. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: Man and rat. *Ore Res*, 48: 309-319.
207. Unger T, Paulis L, Sica DA. 2011. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *Eur Heart J Nov*, 2(32): 2739–2747.
208. Unger T, Ganten D, Lang RE. 1984. Is tissue converting enzyme inhibition a determinant of the antihypertensive efficacy of converting enzyme inhibitors? Studies with the two different compounds, Hoe498 and MK421, in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 6: 872-80.
209. Urata H. 2000. Pathological involvement of chymase-dependent angiotensin II formation in the development of cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1(2): 35-37.
210. Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. 1993. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest*, 91(4): 1269-81.
211. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. 1990a. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*, 265: 22348–22357.
212. Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FH, Husain A. 1990b. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res*, 66: 883–890.
213. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 277: 14838–14843.
214. Von Thun AM, Vari RC, El-Dahr SS, Navar LG. 1994. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. *Am J Physiol-Renal Physiol* 266: F120–F128.
215. Wald H, Scherzer P, Popovtzer MM. 1991. Na,K-ATPase in isolated nephron segments in rats with experimental heart failure. *Circ Res*, 68(4): 1051-8.
216. Wales JD, Tange JD. 1971. The influence of acute sodium depletion on experimental hypertension in the rat. *J Lab Clin Med*, 78(3): 369–379.

217. Wei C, Tian B, Perry G, Meng QC, Chen Y, Oparil S, DellItalia LJ. 2002. Differential Ang II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282: H2254-H2258.
218. Weishaar RE, Panek RL, Major TC, Simmerman J, Rapundalo ST, Taylor DG Jr. 1991. Evidence for a functional tissue renin-angiotensin system in the rat mesenteric vasculature and its involvement in regulating blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther*, 256(2): 568-574.
219. Wexler BC, McMurtry JP, Iams SG. 1981. Histopathologic changes in aging male vs female spontaneously hypertensive rats. *J Gerontol*, 36: 514-519.
220. Wintroub BU, Schechter NB, Lazarus GS, Kaempfer CE, Schwartz LB. 1984. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol* 83: 336-339.
221. Wu JN, Edwards D, Berecek KH. 1994. Changes in renal angiotensin II receptors in spontaneously hypertensive rats by early treatment with the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril. *Hypertension*, 6 Pt 2: 819-22.
222. Xiao B, Li X, Yan J, Yu X, Yang G, Xiao X, Voltz JW, Darryl C, Zeldin DC, Wang DW. 2010. Overexpression of Cytochrome P450 Epoxygenases Prevents Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats by Enhancing Atrial Natriuretic Peptide. *J Pharmacol Exp Ther*, 334(3): 784-794.
223. Yamada Y, Yamauchi D, Usui H, Zhao H, Yokoo M, Ohinata K, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M. 2008. Hypotensive activity of novokin, a potent analogue of ovokin(2-7), is mediated by angiotensin AT2 receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides*, 29(3): 412-418.
224. Yamamoto H, Okuzaki D, Yamanishi K, Xu Y, Watanabe Y, Yoshida M, Yamashita A, Goto N, Nishiguchi S, Shimada K, Nojima H, Yasunaga T, Okamura H, Matsunaga H, Yamanishi H. 2013. Genetic analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats. *Int J Mol Med*, 31(5): 1057-65.
225. Yamori Y. 1984. The development of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. *Handbook of Hypertension. Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension* (de Jong W, ed). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 224-239.
226. Yang Y, Marczak ED, Yokoo M, Usui H, Yoshikawa M. 2003. Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco. *J Agric Food Chem*, 51(17): 4897-4902.
227. Yen TT, Roeder H, Willard PW. 1974. A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats. *Heredity*, 33, 309-316.

228. Zhang-James Y, Middleton FA, Faraone SV. 2013. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiol Genomics*, 45(13): 528-38.
229. Zhang J, Zhang H, Wang L, Guo X, Wang X, Yao H. 2010a. Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chem*, 119(1): 226-234.
230. Zhang Y, Kouguchi T, Shimizu M, Ohmori T, Takahata Y, Morimatsu F. 2010b. Chicken collagen hydrolysate protects rats from hypertension and cardiovascular damage. *J Med Food*, 13(2): 399-405.
231. Zhao Y, Xu C. 2008. Structure and Function of Angiotensin Converting Enzyme and Its Inhibitors. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24 (2): 171–176.
232. Zicha J, Kunes J. 1999. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev*, 79: 1227-1282.
233. Zicha J, Dobesová Z, Kunes J. 2008. Late blood pressure reduction in SHR subjected to transient captopril treatment in youth: possible mechanisms. *Physiol Res*, 57(3): 495-8.