

mgr inż. Iwona Baranowska

**„Ocena wpływu chronicznego blokowania niezależnych od ACE szlaków konwersji  
angiotensyny w doświadczalnym nadciśnieniu tętniczym”**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Kompanowska-Jeziarska  
Promotor pomocniczy dr inż. Olga Gawryś



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2019

## **Podziękowania**

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania mojej Pani promotor profesor Elżbiecie Kompanowskiej-Jezierskiej za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej. Za cierpliwość, motywację, wyrozumiałość, pomoc w jasnym formułowaniu myśli naukowej oraz inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych.*

*Pragnę podziękować dr n. med.inż. Oldze Gawryś za niezastąpioną pomoc w planowaniu doświadczeń oraz kreatywne podejście w poszukiwaniu rozwiązań problemów badawczych.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam pracownikom Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych za przekazaną wiedzę, pomoc w zakresie technik eksperymentalnych oraz prawdziwie naukową atmosferę w pracy.*

*Składam podziękowania dr n. med. Krzysztofowi Hubertowi Olszyńskiemu za pomoc w realizacji części badań oraz cenne wskazówki merytoryczne.*

*Dziękuję mamie oraz przyjaciołom, za nieustanne wsparcie oraz motywację.*

*W szczególności dziękuję mojej Córeczce za ogromną cierpliwość, miłość oraz niegasnącą wiarę we mnie.*

~

*Projekt badawczy, którego realizacja stała się podstawą do przeprowadzenia badań i napisania niniejszej rozprawy doktorskiej był realizowany w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (IMDiK PAN) w ramach grantu uzyskanego z Narodowego Centrum Nauki Nr 2011/01/B/NZ4/05703 „Antyhipertensyjna skuteczność peptydów z nasion rzepaku u szczurów. Potencjalna rola nowych mechanizmów konwersji Ang I”.*

*Studia doktoranckie realizowano w ramach projektu KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący): “The search for new biomarkers of civilization diseases using high-throughput techniques and modern diagnostic imaging”.*

*Badanie perfuzji nerek metodą rezonansu magnetycznego realizowano w Środowiskowym Laboratorium Rezonansu Magnetycznego dla Małych Zwierząt (LRM, IMDiK PAN).*

*Oznaczenia stężenia angiotensyny II w pobranym materiale biologicznym (w wybranych tkankach i osoczu) wykonano we współpracy z Zakładem Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.*

*Synteza związków peptydowych wykonana została w Pracowni Peptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.*

*Przygotowanie preparatów histologicznych a także ich analizę wykonano w Zakładzie Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej pod kierownictwem pani prof. dr hab. n. med. Ewy Matyi (do 2017 roku pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Janiny Rafałowskiej).*

~

## Spis treści

Innowacyjność Rozprawy .....	5
Wykaz skrótów .....	6
Streszczenie .....	9
Abstract .....	14
1. Wstęp.....	18
1.1.    Nadciśnienie tętnicze .....	18
1.1.1.    Układ renina-angiotensyna-aldosteron .....	21
1.1.2.    Enzymy biorące udział w powstawaniu Ang II. Podział na klasyczny/osoczowy i lokalny RAAS.....	25
1.1.3.    Receptory angiotensynowe (AT <sub>1</sub> , AT <sub>2</sub> ).....	26
1.1.4.    Leczenie nadciśnienia tętniczego.....	30
1.1.5.    Peptydy z nasion rzepaku jako inhibitory konwersji angiotensyny I. ....	34
1.1.6.    Biomarkery w chorobie nadciśnieniowej.....	35
1.1.7.    Zwierzęcy model nadciśnienia.....	37
Cel badań .....	39
2. Materiały i metody .....	40
2.1.    Pomiar aktywności chymazy – badanie <i>in vitro</i> . ....	40
2.2.    Zwierzęcy model nadciśnienia – nadciśnienie tętnicze o podłożu genetycznym.....	41
2.3.    Doświadczenia przewlekłe.....	43
2.3.1.    Obserwacje w kłatkach metabolicznych.....	46
2.3.2.    Obrazowanie nerki metodą rezonansu magnetycznego. ....	46
2.4.    Doświadczenia ostre .....	50
2.5.    Analiza próbek moczu, osocza i tkanek.....	52
2.5.1.    Pomiar tempa przesączania kłębuszkowego.....	52
2.5.2.    Ocena histologiczna nerki.....	53
2.5.3.    Oznaczenia biochemiczne próbek moczu, osocza i tkanek .....	54
2.6.    Analiza statystyczna.....	55
3. Wyniki.....	56
3.1.    Wpływ peptydów na aktywność chymazy.....	56
3.2.    Doświadczenia chroniczne.....	57
3.2.1.    Wpływ badanych substancji na ciśnienie krwi tętniczej i częstość skurczów serca .....	57
3.2.2.    Wpływ badanych związków na parametry metaboliczne, wydalnicze i osoczowe.....	69

3.2.3.	Wpływ badanych związków na tempo wydalania azotanów i azotynów .....	79
3.2.4.	Wyniki obrazowania nerki metodą rezonansu magnetycznego .....	80
3.2.5.	Wyniki oznaczenia biomarkerów w osoczu i moczu (Testy ELISA).....	84
3.3.	Doświadczenia ostre .....	90
3.3.1.	Wpływ podawanych substancji na ciśnienie krwi tętniczej i parametry hemodynamiczne nerek .....	90
3.3.2.	Wpływ podawanych substancji na tempo filtracji kłębuszkowej .....	95
3.3.3.	Wpływ podawanych substancji na morfologię nerek .....	98
4.	Dyskusja .....	101
4.1.	Podsumowanie najważniejszych wyników .....	121
4.2.	Wnioski .....	125
	Literatura.....	126
	Aneks - Tabele zbiorcze .....	135

## **Innowacyjność Rozprawy**

- zbadanie roli niezależnych od enzymu konwertującego (ACE), tkankowych szlaków konwersji angiotensyny I (Ang I) w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi oraz czynności hemodynamicznej i wydalniczej nerek w doświadczeniach *in vivo*
- zbadanie udziału zależnego od chymazy szlaku tkankowej konwersji Ang I w osoczowej i tkankowej (nerka, serce, aorta) puli angiotensyny II (Ang II)
- pierwsza próba zbadania hipotensyjnej i nerko-protekcyjnej efektywności inhibitorów chymazy, hamujących konwersję Ang I, w tym chymostatyny oraz peptydów naturalnie występujących w nasionach rzepaku w modelu *in vivo*
- wykorzystanie innowacyjnej metody obrazowania metodą rezonansu magnetycznego dla małych zwierząt do przewlekłej obserwacji hemodynamiki nerek u czuwających szczurów
- zaproponowanie do dalszych badań peptydu RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna) jako substancji terapeutycznej w leczeniu i/lub prewencji nadciśnienia lub w zastosowaniu jako składowej żywności funkcjonalnej

## Wykaz skrótów

ACE, ACE1 – enzym konwertujący angiotensynę (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*)

Ang I – angiotensyna I

Ang II – angiotensyna II

ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *atrial natriuretic peptide*)

APA – aminopeptydaza A

APB – aminopeptydaza B

APC – aminopeptydaza C

APN – aminopeptydaza A

AT<sub>1</sub>, AT<sub>1</sub>R – receptor angiotensyny II typu 1 (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor*)

AT<sub>2</sub>, AT<sub>2</sub>R – receptor angiotensyny II typu 2 (ang. *Angiotensin II Type 2 Receptor*)

BP – ciśnienie krwi tętniczej (ang. *Blood Pressure*)

CBF – przepływ krwi przez korę nerki (ang. *Cortical Blood Flow*)

CH – chymostatyna (ang. *chymostatin*)

cGMP – cykliczny monofosforan guanozyny

DAG – diacyloglicerol

DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej (ang. *Diastolic Blood Pressure*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

EETs – kwasy epoksyekoizatrienowe (ang. *epoxyeicosatrienoic acids*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ET-1 – endotelina 1

GFR – tempo filtracji kłębuszkowej (ang. *Glomerular Filtration Rate*)

HR – częstość skurczów serca (ang. *Heart Rate*)

IBF – przepływ krwi przez tętnicę biodrową kończyny tylnej (ang. *Iliac Blood Flow*)

ICBF – indeks przepływu krwi przez korę nerki

IIMBF – indeks przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki

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

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

IOMBF – indeks przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki

IP3 – trifosforan inozytolu

MAP – kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

MBP – średnie ciśnienie krwi tętniczej (ang. *Mean Blood Pressure*)

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

NO – tlenek azotu (ang. *Nitric Oxide*)

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. *Nitric Oxide Synthase*)

eNOS, NOS3 – endotelialna syntaza tlenku azotu (ang. *endothelial Nitric Oxide Synthase*), syntaza tlenku azotu pochodzenia śródbłonkowego

iNOS, NOS2 – indukowana syntaza tlenku azotu (ang. *induced Nitric Oxide Synthase*)

nNOS, NOS1 – neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. *neuronal Nitric Oxide Synthase*)

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

PFA – paraformaldehyd

PGI<sub>2</sub> – prostacyklina

PGH<sub>2</sub> – prostaglandyna H<sub>2</sub>

P<sub>Na</sub> – stężenie jonów sodu w osoczu

PRA – aktywność reninowa osocza (ang. *Plasma Renin Activity*)

PRC – stężenie reniny w osoczu (ang. *Plasma Renin Concentration*)

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



$P_x$  – stężenie substancji x w osoczu (ang. *Plasma concentration/ Concentration of substance x in plasma*)

RAAS – układ renina-angiotensyna-aldosteron

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

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

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

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

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

TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

$U_{Na}V$  – tempo wydalania sodu

$U_{osm}V$  – tempo wydalania substancji osmotycznie czynnych

$U_x$  – stężenie substancji x w moczu (ang. *Concentration of substance x in urine*)

## Streszczenie

Rozwój nadciśnienia tętniczego związany jest często ze wzrostem aktywności układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) i zbyt dużą ilością powstającej w jego wyniku angiotensyny II (Ang II). Ang II pełni istotną rolę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi oraz odpowiada za patologiczną przebudowę serca i ścian naczyń krwionośnych. Zwiększona synteza Ang II i wysokie jej stężenie w tkankach, nawet bez towarzyszącego jej nadciśnienia mogą prowadzić do wtórnego uszkodzenia naczyń krwionośnych, serca i nerek (ang. „*end-organ damage*”).

Stosowane obecnie czynniki obniżające aktywność RAAS i wpływające ochronnie na nerkę oraz inne narządy to przede wszystkim substancje bezpośrednio hamujące powstawanie i uwalnianie Ang II (inhibitory enzymu konwertującego – ACE), antagoniści receptorów AT<sub>1</sub> angiotensyny oraz receptorów aldosteronu, a także substancje blokujące powstawanie reniny. Niestety blokada syntezy Ang II poprzez terapię inhibitorami ACE okazuje się niekompletna lub obserwuje się następczą „ucieczkę” spod stosowanego leczenia.

Wiadomo, że terapia inhibitorami ACE obniża tworzenie Ang II i aldosteronu, natomiast zwiększa aktywność reninową osocza i poziom angiotensyny I (Ang I). Wysoki poziom reniny może brać udział w produkcji lokalnej angiotensyny II np. w naczyniach, a podwyższony poziom Ang I prowadzi często do powstawania Ang II na drodze przemian niezależnych od ACE. Według najnowszych doniesień w wielu tkankach (np. w miocytach serca czy komórkach mięśni ścian naczyń krwionośnych) istnieje kompletna „maszyna” biochemiczna umożliwiająca lokalną produkcję Ang II z Ang I, nawet pod nieobecność ACE. W ludzkim sercu i w naczyniach krwionośnych tylko 20-30% powstającej Ang II zależy od ACE. Jednym z enzymów ACE-niezależnych, obok ACE-2 oraz katepsyny G, jest chymaza występująca w komórkach tłuszczowych oraz komórkach śródbłonkowych i śródmiąższowych wielu narządów. Chymaza nie tylko przekształca Ang I w Ang II na drodze przemian niezależnych od ACE, ale również uczestniczy w powstawaniu Ang I z angiotensyny (1-12).

**W związku z najnowszymi doniesieniami o znacznym udziale chymazy w lokalnym powstawaniu naczyniokurczącej Ang II podjęto próbę zbadania jak zablokowanie aktywności tego enzymu wpłynie na ciśnienie krwi tętniczej, hemodynamikę oraz czynność wydalniczą nerek u szczurów ze spontanicznie rozwijającym się nadciśnieniem o podłożu genetycznym (SHR).**

Jako inhibitora niezależnych od ACE szlaków powstawania angiotensyny II zastosowano innowacyjne, syntetyczne peptydy RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna) oraz VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna), które pierwotnie zostały wyizolowane z nasion rzepaku. Wcześniejsze badania wybranych peptydów wskazywały na ich niewielkie powinowactwo do blokowania ACE, a wykonane na potrzeby tego projektu badania *in vitro* wykazały ich zdolność do hamowania aktywności chymazy. Niski koszt i łatwość pozyskania tych peptydów przemawia za podjęciem badań nad ich przydatnością w walce z nadciśnieniem, a także w profilaktyce choroby nadciśnieniowej. Dodatkowo zastosowano chymostatynę (CH), jako komercyjnie dostępnego blokera chymazy.

Wyselekcjonowane substancje: peptydy RIY i VWIS, CH oraz ich rozpuszczalniki, sól fizjologiczną (S) oraz 0.05% roztwór dimetylosulfotlenku (DMSO) w soli fizjologicznej, podawano dożylnie szczurom SHR. Postanowiono przebadać zarówno wpływ zastosowanych blokerów na rozwój nadciśnienia (badania na młodych 6-tyg. szczurach) oraz sprawdzić czy zablokowanie niezależnego od ACE szlaku syntezy Ang II obniży ciśnienie tętnicze krwi u szczurów z utrwalonym nadciśnieniem tętniczym (badania na dorosłych 16-tyg osobnikach). Dodatkowo peptydy RIY i VWIS oraz sól fizjologiczną podawano młodym i dorosłym szczurom SHR drogą dożołądkową. Wszystkie badane związki podawano raz dziennie przez 14 dni. Ciśnienie krwi tętniczej mierzono metodą telemetryczną; dobowe obserwacje w klatkach metabolicznych połączone ze zbiórką moczu, pomiarem spożycia paszy, wody oraz wydalania kału prowadzono raz w tygodniu. Po obserwacji parametrów metabolicznych pobierano krew z ogona do oznaczeń biochemicznych. Po dwóch tygodniach leczenia zwierzęta usypiano i po przygotowaniu chirurgicznym mierzono parametry hemodynamiczne nerki oraz jej czynność wydalniczą. Po zakończeniu doświadczenia ostrego pobierano i utrwalano narządy do dalszych analiz. Jednocześnie prowadzono równoległą grupę dorosłych szczurów SHR (16-tyg.), u których w doświadczeniu chronicznym badano hemodynamikę nerki metodą rezonansu magnetycznego (obrazowanie magnetyczne wyklucza użycie sond telemetrycznych, stąd u tych szczurów nie mierzono ciśnienia krwi).

W trakcie dwutygodniowego doświadczenia w żadnej z grup nie zaobserwowano odbiegających od normy oznak dotyczących zdrowia zwierząt, tj. wyglądu, stanu sierści, aktywności, zachowań pielęgnacyjnych czy socjalnych, nie zaobserwowano żadnego wpływu zabiegów chirurgicznych (implantacja sondy

telemetrycznej, czy kaniul) oraz badanych substancji na dojrzewanie, wzrost oraz kondycję fizyczną zwierząt.

Analiza wyników otrzymanych u młodych zwierząt po zablokowaniu chymazy nie wskazuje na jej kluczową rolę w rozwoju nadciśnienia. Chymostatyna i peptydowe inhibitory chymazy mogły przyczynić się do pewnego zahamowania progresji choroby, ale obserwowane efekty były dość subtelne. Dodatkowo analiza wyników była utrudniona ze względu na silniejsze zmiany w grupach otrzymujących roztwory kontrolne.

**U szczurów dorosłych najbardziej korzystne i wyraźne efekty spośród wszystkich badanych związków wywołał peptyd RIY.** Po podaniu dożylnym tego peptydu u dorosłych szczurów zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie ciśnienia krwi tętniczej (BP) w porównaniu do grupy otrzymującej rozpuszczalnik; jednocześnie zaobserwowano u tych zwierząt obniżenie częstości skurczów serca oraz istotne (prawie 3-krotne) zwiększenie wydalania azotanów i azotynów, co może wskazywać na poprawę czynności śródbłonna i wzrost syntezy naczyniorozszerzającego tlenku azotu. Zaobserwowano również obniżenie stężenia Ang II w nerce ( $p < 0,05$ ) oraz wyraźny trend do obniżenia jej poziomu także w osoczu i w sercu, a także silną tendencję do poprawy ukrwienia kory nerki i obniżenia stopnia uszkodzenia kłębuszków (GSI,  $p = 0,08$ ). Dorosłe zwierzęta otrzymujące ten sam peptyd drogą dożołądkową również wykazywały szereg korzystnych zmian, choć jak wspomniano nie doszło u nich do istotnego obniżenia ciśnienia krwi tętniczej. Po 14 dniach podawania związku zaobserwowano zwiększenie perfuzji nerek/poprawę hemodynamiki nerek, ok. 50% wzrost GFR oraz istotne obniżenie GSI. Większość uzyskanych wyników wskazuje, że efekty uzyskane po RIY zależą od zmian hemodynamicznych w układzie krążenia i wydalania, natomiast nie od wpływu na transport kanalikowy.

**Opierając się na badaniach *in vitro*, przedstawionych w niniejszej dysertacji, które wykazały właściwości blokujące peptydu RIY w stosunku do chymazy, a także na danych literaturowych wskazujących na niewielkie powinowactwo do blokowania ACE sugerujemy, że korzystne efekty podawania RIY są następstwem, przynajmniej częściowego blokowania obu kluczowych szlaków powstawania Ang II.**

Podobnych zmian nie zaobserwowano po drugim z badanych peptydów VWIS; przeciwnie u zwierząt młodych, zarówno po podaniu dożylnym jak i dożołądkowym, prowadził on do wzrostu ciśnienia rozkurczowego, upośledzenia hemodynamiki nerek i

wzrostu stężenia Ang II w sercu (tylko po podaniu i.v.). Nie zmieniał też wskaźnika uszkodzenia kłębuszków. Z kolei u zwierząt dorosłych po dożylnym podaniu VWIS zaobserwowano obniżenie GSI i tendencję do poprawy ukrwienia kory nerki. Podanie dożołądkowe wywołało upośledzenie hemodynamiki nerek i obniżenie GFR (pomiar w doświadczeniach ostrych, w narkozie).

Wydaje się, że brak zakładanej (i zbliżonej do RIY) skuteczności pochodzącego z nasion rzepaku peptydu VWIS wynika z jego rozpadu w układzie pokarmowym i krwionośnym do fragmentów, z których VW jest co prawda słabym blokerem ACE (dane literaturowe), ale nie posiada takich właściwości wobec chymazy (pokazane w dysertacji badania *in vitro*). W związku z powyższym blokowanie tylko jednego ze szlaków, może w układzie przewlekłym prowadzić do uruchomienia alternatywnego szlaku konwersji angiotensyny, tj. chymazy. Co więcej, w założonej przez nas hipotezie to właśnie tkankowe powstawanie Ang II w warunkach patologicznych ma kluczowe znaczenie dla uszkodzenia narządów i dalszej progresji nadciśnienia.

**Analiza zebranych wyników ukazała odmienny obraz zmian spowodowany podawaniem chymostatyny u zwierząt dorosłych.** Niestety w przypadku tej grupy szczurów błąd metodyczny (brak pomiarów w stosownym okresie doświadczenia) oraz stosunkowo duże zmiany w BP po podaniu obu rozpuszczalników (DMSO oraz soli fizjologicznej), znacznie skomplikowały interpretację wyników oraz utrudniły porównania między grupami. Jednakże można przypuszczać, że ten komercyjnie dostępny inhibitor chymazy podany dożylnie nie obniżył ciśnienia krwi u dorosłych szczurów.

Dodatkowo zaobserwowano niekorzystne zmiany w mierzonych parametrach hemodynamicznych, zarówno podczas doświadczeń ostrych (niższy przepływ przez rdzeń wewnętrzny nerki w porównaniu do grupy otrzymującej DMSO), jak i metodą obrazowania w rezonansie magnetycznym (istotne obniżenie przepływu korowego w stosunku do dnia 0 oraz w porównaniu do grupy otrzymującej DMSO w dniu 14). Jednocześnie po podaniu chymostatyny zanotowano najniższą wartość GFR (w porównaniu do obu zastosowanych rozpuszczalników). Kolejnym zjawiskiem zasługującym na szczególną uwagę jest poziom angiotensyny II mierzony w pobranych tkankach. Po dożylnym podaniu chymostatyny u dorosłych szczurów zaobserwowano najwyższe stężenia Ang II w nerce, sercu oraz osoczu w porównaniu do pozostałych grup. Podsumowując wydaje się, że zablokowanie chymazy w grupie szczurów

dorosłych prowadzi do pobudzenia osoczowego układu RAAS i wytwarzania Ang II drogą zależną od ACE.

**Reasumując, wyniki naszych badań wskazują na hipotensyjny i protekcyjny wobec nerki wpływ RIY po podaniu dożylnym. Wydaje się także, że przedłużenie czasu podawania lub/i zwiększenie dawki tego peptydu mogłoby nie tylko poprawić funkcję narządów, ale wywołać wymierne efekty hipotensyjne. Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał peptydu RIY w leczeniu i lub prewencji choroby nadciśnieniowej w przyszłości.**

## **Abstract**

For the past several decades hypertension has been considered one of the most prominent health threats in the world. According to WHO elevated blood pressure have caused 9.4 million deaths in 2010. Uncontrolled hypertension is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality and may lead to an end-organ damage, such as myocardial infarction, heart failure, stroke, kidney diseases, retinopathy and many others.

The development of hypertension is frequently associated with hyperactivity of renin-angiotensin- aldosterone system (RAAS) and high levels of angiotensin II (Ang II) in plasma. This vasoconstrictive peptide plays a key role in the control of blood pressure and it is responsible for pathological remodelling of the heart and walls of blood vessels. Increased synthesis of Ang II and its high level in tissues, even without concomitant hypertension may lead to secondary damage of blood vessels, heart and kidneys, which leads to end-organ damage.

RAAS inhibitors, which protect the kidneys and other organs, include inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE), AT<sub>1</sub> and aldosterone receptors antagonists and renin inhibitors. ACE inhibitors, which are one of the most commonly prescribed drugs in the treatment of hypertension, often seem not to be fully effective in Ang II synthesis blockade. It is known that treatment with ACE inhibitors lowers Ang II and aldosterone levels, however it also increases plasma renin activity and the level of angiotensin I (Ang I). High level of renin may in turn lead to increased local Ang II production, for example in the blood vessels, and high levels of Ang I may cause the increase of Ang II generation independently of ACE. In many tissues (i.e. cardiomyocytes or in the smooth muscle cells of blood vessels walls) exists “complete machinery” capable to produce Ang II from Ang I without ACE involvement. In the heart and blood vessels only 20-30% of Ang II is synthesised by ACE. It is assumed that this rebound production of Ang II happen through the action of chymostatin-sensitive Ang II-generating enzymes, such as cathepsin G and chymase. The latter has been of interest of many scientific research, including this dissertation. Chymase, commonly found in mast cells, interstitium and endothelium cells of many organs, not only can generate Ang II form Ang I independently of ACE, but also converts Ang (1-12) to Ang I.

**Due to the latest reports regarding significant involvement of chymase in local Ang II production, in the presented thesis an attempt was made to investigate how inhibition of this enzyme will affect arterial pressure, renal haemodynamics and excretion in spontaneously hypertensive rats (SHR).**

To block ACE-independent pathways of Ang II production innovative, synthetic, rapeseed-derived peptides were used: RIY (Arginine-Isoleucine-Tyrosine) and VWIS (Valine-Tryptophan-Isoleucine-Serine). Selected peptides were proved in *in vitro* tests to inhibit chymase activity and possess weak affinity towards ACE. Rapeseed-derived peptides are easy and cheap to obtain, therefore they seem very promising as a new tool in the treatment and/or prevention of hypertensive disease. Also chymostatin (CH) was used as a commercially available inhibitor of chymase and other chymostatin-sensitive enzymes. Selected substances RIY, VWIS, CH and their solvents i.e. saline (S) and 0.05% dimethyl sulfoxide (DMSO) in saline were infused daily, intravenously for 14 days to SHR. Rats in two stages of disease development were used: young (6 weeks old) in the pre-hypertensive phase and adult (16 weeks old) rats with established hypertension. Peptides RIY, VWIS and saline were also administered intragastrically to young and adult SHR.

Blood pressure (BP) was monitored with telemetry, once a week observations in metabolic cages were performed with urine collection and metabolic parameters assessment (diuresis, water and food intake, faeces weight); metabolic observations were followed by blood sampling for biochemical analysis. After two weeks of treatment rats were anaesthetised and after surgical preparations renal haemodynamics and excretory function evaluation was performed in acute experiments. In the end organs (kidneys, heart, aorta) were harvested for further analysis. Separate group of adult SHR (without telemetry probes) was used in magnetic resonance imaging to measure changes in renal perfusion during chronic observations.

All animals were in good health and displayed normal physical activity. Tested substances did not cause any abnormalities in the maturation, nocturnal activity, social and grooming behaviour of studied rats.

Based on detailed analysis of accumulated results in young pre-hypertensive animals after chymase inhibition, we suggest that chymase does not play a crucial role in the development of hypertension in this genetic model of this disease. It seems that



chymostatin and peptide inhibitors of chymase could only slightly slow down the progression of the disease, however observed effects were rather subtle. Additionally, more pronounced changes in the control groups (receiving DMSO and saline) significantly hamper any solid conclusions.

Out of all tested potential inhibitors of chymase in adult rats, the most substantial and beneficial effects were observed after intravenous RIY administration. RIY significantly reduced blood pressure in comparison to the control group (saline). Also it decreased heart rates and increased almost 3-fold the nitric oxide (NO) metabolites excretion. This substantial elevation of potent vasorelaxating agent (NO) might suggest the improvement of endothelium function. Furthermore angiotensin II level in the kidneys was decreased after intravenous RIY administration and we observed a decreasing tendency in plasma and heart Ang II levels. Also blood flow through renal cortex was improved in this group and glomerulosclerosis index (GSI) was diminished, suggesting that RIY alleviated renal impairment. In adult rats, which received peptide RIY intragastrically, also substantial amount of beneficial effects was observed, however without significant decrease in blood pressure. The increase in renal haemodynamics and glomerular filtration rate (GFR), but also a decrease in GSI were recorded.

**The majority of analysed effects suggest that beneficial activity of RIY is related to haemodynamic changes in cardiovascular and renal systems and rather not connected to tubular transport. Based on *in vitro* tests, which were performed prior to *in vivo* experiments, we suspect that RIY exhibits strong inhibitory activity towards chymase, but also it shows slight affinity to block ACE. We suggest that at least partial, but double blockade of both Ang II synthesis pathways (chymase and ACE-dependent) might be responsible for such advantageous effects after RIY administration.**

Peptide VWIS did not prove to be as potent as tripeptide RIY. On the contrary, after intravenous and intragastric administration of VWIS to young animals increased blood pressure, impaired renal haemodynamics and increased Ang II levels in the heart (only after iv administration) were observed. Some beneficial activity was observed after intravenous administration in adult rats (decreased GSI and a tendency to increase

renal perfusion), however after intragastric administration to adult rats VWIS caused adverse effects, such as renal haemodynamic impairment and GFR decrease.

It seems that the lack of hypotensive activity of VWIS might be caused by its rapid degradation in the digestive and circulatory system to shorter compounds: VW and IS. Although VW was proved to be a weak ACE inhibitor, but our *in vitro* tests showed that it does not exhibit blocking activity towards chymase. We suspect that minor inhibition of only one of Ang II generating pathways might not be sufficient. Additionally, chronic inhibition of only one pathway (ACE-dependent) might even lead to increased alternative chymase-dependent pathway activity.

Analysis of the results obtained in chymostatin-receiving adult rats showed quite diverse set of changes, than after peptides administration. Unfortunately due to methodical mistake and relatively strong changes in control groups this analysis was troublesome and complicated. However it seems that chymostatin did exhibit hypotensive activity in adult rats. Additionally, some adverse effects were also observed, both measured in acute experiments (lower perfusion of renal medulla) and obtained during magnetic resonance imaging (significant reduction of cortex blood flow). GFR was also the lowest in this group in comparison to both control groups (receiving DMSO and saline). After intravenous administration of chymostatin to adult rats plasma and renal levels of Ang II were the highest. It seems that exclusive blockade of chymase activity might in turn lead to stimulation of systemic RAAS and generation of Ang II in the ACE-dependent manner.

**In conclusion, obtained results suggest that peptide RIY possess antihypertensive activity and some reno-protective effectiveness. It seems that prolongation of the administration and/or elevation of the administered dosage might prove to be even more beneficial. Nevertheless, we think that peptide RIY might be useful in a treatment and/or prevention of hypertension in the future.**

## 1. Wstęp

### 1.1. Nadciśnienie tętnicze

Choroba nadciśnieniowa stanowi ogromny problem zdrowotny, szczególnie w wysokorozwiniętych społeczeństwach. Zmaga się z nią ok. 1/3 ludności na całym świecie. Pomimo wielu lat intensywnych badań znajomość jej zróżnicowanej patogenezы jest niepełna, co ogranicza możliwości precyzyjnej diagnozy, a w konsekwencji skutecznej terapii. Nadciśnienie tętnicze może prowadzić do rozwoju wielu chorób układu sercowo-naczyniowego; zwiększa ryzyko choroby niedokrwiennej serca, udaru mózgu, niewydolności serca, miażdżycy tętnic obwodowych i niewydolności nerek, może także prowadzić do wtórnego uszkodzenia wielu narządów jak nerka, serce czy mózg. Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego (PTNT) przyjęło, powszechnie uznaną w świecie nauki klasyfikację zgodnie z opublikowanymi w *European Society of Hypertension* (ESH) i *European Society of Cardiology* (ESC) wytycznymi, definiującymi nadciśnienie tętnicze jako ciśnienie tętnicze krwi przekraczające wartości 140 mmHg dla ciśnienia skurczowego (*Systolic Blood Pressure*, SBP), 90 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego (*Diastolic Blood Pressure*, DBP) [1], [2].

Nadciśnienie tętnicze definiowane jest ze względu na podłoże rozwoju choroby jako pierwotne (najczęściej samoistne, bez możliwości wskazania jednoznacznej przyczyny) i wtórne (nazywane także objawowym). Nadciśnienie pierwotne (ang. *essential/primary hypertension*) wywołane jest działaniem różnych czynników genetycznych i środowiskowych. Na rozwój choroby wpływa równocześnie wiele czynników takich jak nadmierne spożycie soli, otyłość, brak aktywności fizycznej, oporność na insulinę, nieprawidłowe działanie układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), a także zaburzone funkcjonowanie układu współczulnego. W patogenezie nadciśnienia pierwotnego znaczenie mają czynniki genetyczne (m.in. geny kodujące różne składowe układu renina-angiotensyna-aldosteron), immunologiczne, aktywność peptydowych hormonów natriuretycznych oraz czynniki związane z dysfunkcją śródbłónka; te ostatnie charakteryzują się zmianami w uwalnianiu szeregu substancji pochodzenia śródbłónkowego jak np. endotelina (ET-1), kwasy epoksyeikozatrienowe (EETs) czy tlenek azotu (NO) [3].

Wśród przyczyn pierwotnego nadciśnienia tętniczego wskazuje się na udział wymienionych poniżej mechanizmów patogennych [4]:

– **mechanizm nerkowy**

- zaburzenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem substancji/czynników naczyniokurczących (angiotensyna II, endotelina, neuropeptyd Y), a wytwarzaniem substancji/czynników naczyniorozszerzających (tlenek azotu i acetylocholina, peptydy natriuretyczne, bradykinina), co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia ukrwienia nerek
- wzrost wydzielania reniny w wyniku pobudzenia receptorów beta<sub>1</sub>-adrenergicznych w komórkach aparatu przykłębuszkowego na skutek uwalnianej z zakończeń współczulnych noradrenaliny
- zwiększenie wydzielania reniny w wyniku obniżenia ciśnienia w tętnicy doprowadzającej krew do kłębuszka nerkowego, a także obniżenia zawartości jonów sodu w moczu kanalika dystalnego nefronu
- zaburzenia w wydalaniu sodu; uszkodzenie kanałów jonowych odpowiedzialnych za transport kanalikowy, a więc i wydalanie sodu

– **mechanizm naczyniowy**

- wzrost wrażliwości naczyń na katecholaminy, a także ich nadmierne wytwarzanie
- upośledzenie syntezy lub/i wydzielania śródbłonkowych substancji naczyniorozszerzających (NO, prostacyklina) przy prawidłowej lub nawet nasilonej syntezie czynników naczyniokurczących (ET-1, Ang II)
- przebudowa ściany naczyń prowadząca do zwężenia światła naczynia krwionośnego, a także jej usztywnienie; proces stymulowany poprzez lokalne działanie układu renina-angiotensyna, endotelinę, insulinę (hiperinsulinizm wtórny w stosunku do insulinooporności), a hamowany w wyniku działania NO, naczyniowych czynników natriuretycznych i bradykininę

– **mechanizm neurogenny**

- podwyższone napięcie układu współczulnego (wzrost naczyniowego oporu obwodowego, wzrost pojemności minutowej serca, stymulacja wydzielania reniny, wzrost aktywności układu RAAS)
- brak prawidłowej reakcji na bodźce z baroreceptorów i receptorów objętościowych

– **czynniki genetyczne**

- wiele genów związanych z mechanizmami regulującymi ciśnienie tętnicze krwi wpływa na jego wartość; istnieją m.in. genetycznie uwarunkowane anomalie w strukturze angiotensynogenu czy receptora AT<sub>1</sub> (receptor typu 1 odpowiedzialny za prohipertensyjne efekty Ang II); ekspresja takich genów może także zależeć od czynników środowiskowych

– **czynniki środowiskowe**

- aktywność fizyczna
- spożycie soli
- otyłość
- stres psychiczny

Wtórne nadciśnienie tętnicze lub wzrost ciśnienia krwi tętniczej powstaje w wyniku innego zdefiniowanego stanu chorobowego; często przebiega początkowo bezobjawowo, a rozpoznaje się je dopiero po wystąpieniu powikłań narządowych. Wśród najczęstszych przyczyn nadciśnienia wtórnego wymienia się różne stany chorobowe oraz nieprawidłowości rozwojowe naczyń tętniczych zaopatrujących nerki w krew. Na skutek niedokrwienia nerek uruchomiane są biochemiczne mechanizmy prowadzące do podwyższenia ciśnienia tętniczego krwi. Wśród chorób należących do tej grupy wymienia się niektóre uszkodzenia/dysfunkcje gruczołów dokrewnych przebiegające z zaburzeniami wydzielania hormonów (np. guz chromochłonny nadnercza uwalniający adrenalinę) oraz guzy i urazy mózgu, stany zapalne mózgu i opon mózgowych.

W oparciu o ogromną liczbę obserwacji doświadczalnych i rozważań teoretycznych, poczynając od badań Artura Guytona, proponuje się, że nerka jest głównym organem odpowiedzialnym za utrzymanie prawidłowego BP (ang. *Blood Pressure*) [5]–[8]. Wiele eksperymentalnych badań, jak również praktyka kliniczna wynikająca ze stosowania inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE) i antagonistów receptora AT<sub>1</sub>, wskazują na centralną rolę RAAS w regulacji BP co nie jest zaskakujące, ponieważ i aktywność RAAS i czynność nerek są ściśle ze sobą związane.

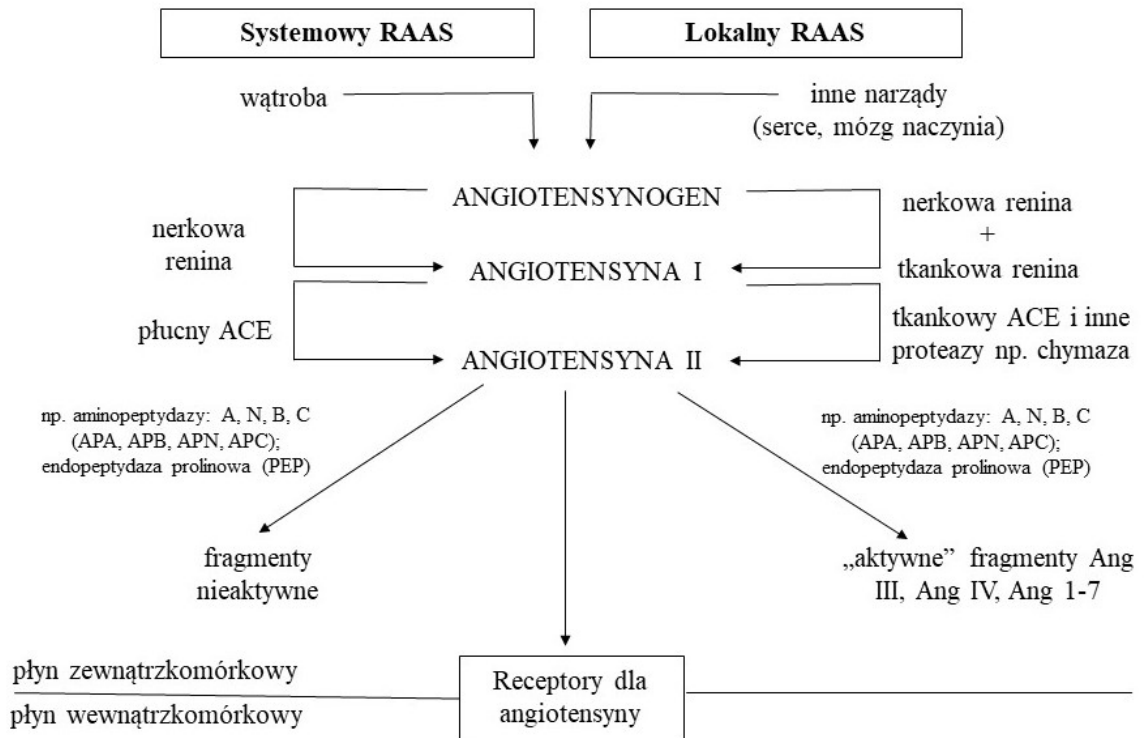
Należy pamiętać również o podstawowej roli nerek w regulacji stałej objętości, składu i ciśnienia osmotycznego płynów ustrojowych, co ma w sposób oczywisty kluczowe znaczenie w kontroli ciśnienia tętniczego krwi. Ponadto w związku ze swoją funkcją endokrynną (przede wszystkim uwalnianie reniny będącej pierwszym ogniwem

układu RAAS) nerki uważane są za narząd biorący udział w rozwoju nadciśnienia tętniczego wtórnego, a także pierwotnego.

W kolejnych podrozdziałach omówione zostaną zagadnienia związane z rolą układu RAAS (z podziałem na klasyczny/systemowy RAAS oraz opisany stosunkowo niedawno, ale coraz bardziej zyskujący na znaczeniu, lokalny/tkankowy RAAS), zwiększonym stężeniem angiotensyny II w osoczu i tkankach oraz nadekspresją jej receptorów oraz z rolą tych procesów w rozwoju nadciśnienia tętniczego.

### **1.1.1. Układ renina-angiotensyna-aldosteron**

Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) ma istotne znaczenie w kontroli ciśnienia krwi tętniczej. Zakres i charakterystyka zaburzeń jego funkcjonowania prowadzących do nadciśnienia są bardzo złożone i wciąż nie w pełni zrozumiałe, co skłania do badań, które w istotny sposób poszerzyłyby naszą wiedzę dotyczącą funkcji RAAS w układzie krążenia i wydalania. W skład tego układu hormonalno-enzymatycznego wchodzi przede wszystkim: renina, angiotensyna i aldosteron (Ryc.1). RAAS zaangażowany jest w kontrolę objętości krwi krążącej, stężenia jonów sodu i potasu w płynach ustrojowych, jako układ działający w całym organizmie lub lokalnie, między innymi w mięśniu sercowym, ścianach naczyń krwionośnych, nerkach. Powstające w wyniku przekształcenia angiotensynogenu związki wykazują zróżnicowaną aktywność biologiczną, a niektóre z nich mają krańcowo przeciwstawne działanie. Dużym osiągnięciem w dziedzinie medycyny było zidentyfikowanie najistotniejszych dla funkcjonowania i regulacji tego złożonego układu elementów oraz czynników mogących zaburzać jego prawidłowe działanie. Kluczowe zjawiska w zmieniającej się aktywności RAAS dotyczą regulacji wydzielania reniny, regulacji aktywności enzymów odpowiedzialnych za odcinanie poszczególnych angiotensyn od ich macierzystych peptydów oraz procesy odpowiedzialne za regulację syntezy właściwych dla nich receptorów. Kolejnym ważnym czynnikiem determinującym pobudzenia RAAS jest współistniejące działanie hormonów i czynników humoralnych, z którymi peptydy angiotensynowe wchodzi w interakcję na poziomie komórki [9].



Ryc. 1 Schemat układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Modyfikacja własna schematu: Systemowa i tkankowa komponenta syntezy angiotensyny II; aminopeptydaza A, B, C, N – APA, APB, APC, APN. (Na podstawie: Braunwald's Heart Disease, A textbook of cardiovascular medicine, pod red. Zipes I wsp., 7<sup>th</sup> ed. 2006; [10], [11]).

Kluczową rolę w inicjowaniu reakcji prowadzących do powstania peptydów angiotensynowych pełni kwaśna proteaza aspartylowa (enzym polipeptydowy z resztą kwasu asparaginowego w miejscu aktywnym) - **renina**. Prekursorem enzymu jest prorenina powstająca z preproreniny, a głównym miejscem jej powstawania są komórki ziarniste tętniczki doprowadzającej kłębuszka (w obrębie tzw. aparatu przykłębuszkowego nerek). Ziarnistości zlokalizowane są głównie w warstwie środkowej ściany tętniczek doprowadzających (w mniejszym stopniu odprowadzających). Przestrzenne położenie tętniczki doprowadzającej i kanałka nerkowego umożliwia jej kontakt ze ścianą kanałka dystalnego nefronu zawierającego wyspecjalizowane komórki plamki gęstej (*macula densa*), które reagują na lokalną szybkość przepływu moczu kanalikowego i stężenie zawartych w nim jonów sodu; dzięki temu komórki plamki gęstej także uczestniczą w wydzielaniu reniny. Zwężenie tętniczek doprowadzających w odpowiedzi na wzrost przepływu moczu na wysokości *macula densa* określane jest mianem kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego

(*tubulo-glomerular feedback*). Aparat przykłębuszkowy wyposażony jest we włókna nerwów nerkowych (współczulne), których zakończenia zlokalizowano m.in. w ścianach tętniczek doprowadzających i naczyń prostych. (*vasa recta*). Pobudzenie nerwów układu współczulnego, powoduje zwężenie tętniczki doprowadzającej za pośrednictwem  $\alpha$ -receptorów adrenergicznych oraz zwiększenie uwalniania reniny przez aparat przykłębuszkowy. Pośrednio stymulacja nerwów współczulnych łączy się z miogennym mechanizmem regulującym przepływ krwi w nerkach. Kiedy ciśnienie krwi wzrasta, komórki mięśni gładkich w ścianie naczyń tętniczek doprowadzających rozciągają się, co w odpowiedzi ochronnej dla nerki wywołuje ich kurczenie się (przeciwstawienie się zmianom ciśnienia oraz przepływu krwi) [12]–[14].

Ważne miejsce w regulacji wydzielania reniny odgrywają także hormony i czynniki humoralne dopływające do nerek z krwią, a także wydzielane w niej lokalnie. Reasumując, kluczową rolę w stymulacji wydzielania reniny odgrywa obniżenie ciśnienia transmularnego w tętniczkach doprowadzających (aferyntnych) poniżej 90 mmHg, pobudzenie układu współczulnego, a także zmniejszenie zawartości jonów sodu w komórkach płamki gęstej. Na pobudzenie wydzielania reniny wpływają również krążące we krwi katecholaminy. Komórki wydzielające reninę wykazują właściwości baroreceptyjne, co oznacza, że ich aktywność wydzielnicza zmienia się pod wpływem rozciągania tętniczki doprowadzającej. Kolejnym czynnikiem mechanicznym regulującym wydzielanie reniny jest zmiana szybkości przepływu krwi w tętniczkach doprowadzających i odprowadzających kłębuszków. Zwiększona szybkość przepływu krwi jest przyczyną zwiększenia siły ścinającej (*shear stress*) w naczyniach kłębuszka oraz zwiększenia poziomu/aktywności śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS); powstający tlenek azotu wpływa hamująco na wydzielanie reniny przez komórki aparatu przykłębuszkowego. Jak wspomniano, kluczową rolę w wykrywaniu przez komórki wydzielające reninę szybkości przepływu moczu przez dystalną część nefronu pełnią komórki płamki gęstej. Zmniejszenie szybkości przepływu moczu przez kanalik nerkowy wiąże się ze zmniejszeniem tempa biernego transportu jonów sodu ze światła kanalika, co prowadzi do zwiększania wydzielania reniny.

Renina charakteryzuje się wysoką selektywnością w stosunku do substratu, którym jest wydzielany głównie przez wątrobę, zbudowany z 453 reszt aminokwasowych, **angiotensynogen**. Miejscem aktywnym reniny jest para reszt kwasu



asparaginowego, współdziałająca ze sobą w rozbijaniu wiązania karbonylowego substratu.

Pod wpływem działania reniny na angiotensynogen powstaje **angiotensyna I (Ang I)**, która pod wpływem enzymu konwertującego (*Angiotensin-Converting Enzyme*, ACE) rozkładana jest m.in. do angiotensyny II (Ang II), czyli najważniejszego ogniwa w układzie RAAS. Ang II jest hormonem peptydowym i stanowi najsilniejszą endogenną substancję naczyniokurczącą.

Ang II reguluje transport kanalikowy sodu i uczestniczy w kontroli stężenia jonów sodowych i potasowych w organizmie. Ang II pobudza także wydzielanie aldosteronu z warstwy kłębkowatej kory nadnerczy. Główną funkcją aldosteronu, który należy do grupy hormonów sterydowych, jest regulacja gospodarki wodno-mineralnej ustroju. Jego działanie powoduje zwiększanie wchłaniania zwrotnego jonów  $\text{Na}^+$  i wydalanie jonów  $\text{K}^+$  przez komórki kanalików nerkowych, zwiększenie wchłaniania jonów  $\text{Na}^+$  przez komórki gruczołów potowych, ślinowych i nabłonka jelitowego, a także zwiększenie objętości płynu zewnątrzkomórkowego, co powoduje zwiększenie objętości wyrzutowej serca i wzrost ciśnienia tętniczego krwi [15].

Powstająca w układzie RAAS Ang II pełni istotną rolę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi oraz odpowiada za patologiczną przebudowę serca i ścian naczyń krwionośnych. Zwiększona synteza i wysokie stężenie Ang II w tkankach, nawet bez towarzyszącego jej nadciśnienia mogą prowadzić do wtórnego uszkodzenia naczyń krwionośnych, serca czy nerek („*end-stage organ damage*”). Jednym z mechanizmów prowadzących do rozwoju nadciśnienia tętniczego jest właśnie nadmierna aktywność układu RAA i zbyt duża ilość powstającej w nim Ang II. Powstająca w płucach glikoproteina należąca do enzymów z grupy egzopeptydaz – konwertaza angiotensyny (ACE) ma istotne znaczenie w powstawaniu osoczowej Ang II. Enzym ten ponadto rozkłada bradykininę będącą silnym czynnikiem rozszerzającym naczynia krwionośne .

Ang II po związaniu się ze specyficznymi receptorami  $\text{AT}_1$  i  $\text{AT}_2$  w miocytach mięśni gładkich ściany naczyniowej i fibroblastach inicjuje liczne reakcje prowadzące do zmian w naczyniach krwionośnych. Pobudzenie  $\text{AT}_1\text{R}$  powoduje zahamowanie syntezy i wydzielania bradykininy oraz NO, a także zwiększone wydzielanie endoteliny. Nasila także proliferację i hipertrofię miocytów ściany naczyniowej. Aktywacja receptorów  $\text{AT}_2$  wywiera na śródbłonek naczyniowy działanie przeciwstawne do  $\text{AT}_1$ , a także hamuje hipertrofię i hiperplazję mięśni gładkich ściany naczyniowej.

W leczeniu nadciśnienia tętniczego stosuje się m.in.:  $\beta$ -blokery, diuretyki, blokery receptora reniny, a przede wszystkim inhibitory ACE oraz blokery receptora AT<sub>1</sub>, należące do czynników hamujących aktywność RAAS. Niestety blokada syntezy Ang II poprzez podawanie inhibitorów ACE bardzo często okazuje się niekompletna lub obserwuje się następczą „ucieczkę” spod stosowanego leczenia. Wiadomo, że terapia inhibitorami ACE obniża tworzenie się Ang II i aldosteronu (poziom tych hormonów mierzony w osoczu jest niższy), ale zwiększa aktywność reninową osocza i poziom krążącej angiotensyny I. Wysoki poziom reniny może zwiększać powstawanie Ang II lokalnie np. w ścianach naczyń, a podwyższony poziom Ang I bywa często przyczyną powstawania Ang II drogą niezależną od ACE.

### **1.1.2. Enzymy biorące udział w powstawaniu Ang II. Podział na klasyczny/osoczowy i lokalny RAAS**

Wyróżnia się dwa rodzaje układu RAA: systemowy zwany także osoczowym, zależny od aktywności enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) i uważany przez dekady za główne źródło krążącej we krwi Ang II oraz tkankowy, obecny i operujący lokalnie w tkankach (między innymi w mięśniu sercowym, ścianach naczyń krwionośnych i nerkach) [14], [16]–[18]. Płuca są głównym źródłem ACE, a większość angiotensyny I jest przekształcana w angiotensynę II podczas pojedynczego przejścia przez ten narząd. Istnieją istotne dane wskazujące na funkcjonalną rolę wytwarzanej lokalnie angiotensyny II, głównie w mózgu, sercu i nerkach [11], [15]. Powstawanie tkankowej Ang II jest kontrolowane zarówno przez ACE jak i inne enzymy. W wielu tkankach (np. w miocytach serca czy w komórkach mięśni ścian naczyń krwionośnych) istnieje kompletna „maszyna” biochemiczna umożliwiająca lokalną produkcję Ang II, nawet pod nieobecność ACE. Jednym z enzymów ACE-niezależnych, obok ACE-2, katepsyny G czy enzymów podobnych do kalikreiny jest chymaza, znajdująca w komórkach tucznych oraz komórkach śródbłonkowych i śródmiąższowych wielu narządów.

Chymaza nie tylko przekształca Ang I w Ang II na drodze przemian niezależnych od ACE, ale również uczestniczy w powstawaniu Ang I i/lub Ang II z angiotensyny (1-12) (tzw. proangiotensyn-12). Po raz pierwszy w 2006 roku Ang (1-12) zidentyfikowano w osoczu i wybranych tkankach szczurów (w jelicie cienkim, śledzionie, nerkach i wątrobie szczurów), a także sugeruje się, że może mieć ona istotną

rolę dla układu renina-angiotensyna [19]–[23]. Autorzy jednej z prac w swoich badaniach wskazują na szybkie przekształcenie powstającej z angiotensynogenu proangiotensyny-12 w Ang I, niezależnie od reniny, a następnie w Ang II [22]. Doniesienia literaturowe wskazują również, że Ang (1-12) może być bezpośrednio przekształcona w Ang II w błonach plazmatycznych komórek uzyskanych z lewej komory serca [19], [24].

Wykazano również wzrost aktywności chymazy zarówno w śródmiaższu nerki jak i w ścianach żyły oraz tętnicy nerkowej u pacjenta, któremu usunięto nerkę z powodu nadciśnienia zależnego od pierwotnego zwężenia tętnicy nerkowej [25]. Stosowane u tego pacjenta inhibitory ACE co prawda obniżyły ciśnienie krwi i poziom krążącej Ang II, natomiast zwiększyły stężenie reniny i aldosteronu. Autorzy sugerują, że to właśnie chymaza ma udział w tworzeniu Ang II, która następnie stymuluje sekrecję aldosteronu. Ponadto, zależny od blokowania ACE wzrost stężenia Ang I - będącej jednocześnie substratem dla chymazy - dodatkowo zwiększa ilość powstającej Ang II w różnych tkankach, prowadząc bezpośrednio (fibrynolityczne właściwości samej chymazy) i pośrednio (np. poprzez mitogenne działanie Ang II) do ich uszkodzenia.

### **1.1.3. Receptory angiotensynowe (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>)**

W regulacji procesów zależnych od angiotensyny II (Ang II) pośredniczą receptory AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub>, które są zbudowane z siedmiu transbłonowych glikoprotein. Receptory AT<sub>1</sub> są w przeważającej mierze sprzężone z białkiem G (q / 11) i uruchamiają kaskady sygnałowe poprzez fosfolipazy A, C, D, fosforan inozytolu, kanały wapniowe, kinazy serynowo-treoninowe i kinazy tyrozynowe. Wiele odpowiedzi stymulacyjnych wywołanych w wyniku pobudzenia AT<sub>1</sub> jest mediowanych przez aktywację receptorów czynników wzrostu. Określono miejsca wiązania receptora dla ligandów agonistycznych i niepeptydowych antagonistycznych. Te ostatnie związki są tak samo skuteczne w terapii chorób sercowo-naczyniowych jak inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, ale są lepiej tolerowane. Podczas rozwoju płodowego receptory AT<sub>2</sub> są intensywnie ekspresjonowane i ich gęstość jest bardzo wysoka. Receptor AT<sub>2</sub> występuje w znacznie mniejszej gęstości w tkankach osobników dorosłych, ale jego ekspresja ulega podwyższeniu w stanach patologicznych. Główne elementy na przebiegu szlaków sygnałowych dla AT<sub>2</sub> to kinazy serynowo-treoninowe,

fosfatazy tyrozynowe, fosfolipaza A<sub>2</sub>, tlenek azotu i cykliczny monofosforan guanozyny [26], [27].

Pobudzenie poszczególnych typów receptorów angiotensynowych zależy przede wszystkim od stężenia biologicznie aktywnych angiotensyn. Znaczenie mają również liczba i powinowactwo specyficznych dla nich receptorów, a także czynniki zewnętrzne takie jak zmiany w środowisku zewnątrzkomórkowym i równoczesne działanie innych związków, które mogą konkurować lub wspomagać aktywację tych samych szlaków przekazywania wewnątrzkomórkowego. Peptydy angiotensynowe mają zdolność do regulacji ekspresji swoich własnych receptorów, a także do stymulacji wydzielania ważnych hormonów i cytokin, które dodatkowo mogą potęgować lub osłabiać działanie Ang II [15].

### **Receptor AT<sub>1</sub>**

Receptor AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>R) występuje w wielu narządach, a kodujący go gen znajduje się na chromosomie 3 w regionie q21-q25. Białko receptorowe oraz gen kodujący receptor AT<sub>1</sub> występują w komórkach śródbłonna, miocytach i fibroblastach ścian naczyń krwionośnych, w kardiomiocytach i fibroblastach serca, w nerkach (podocytach, komórkach mezangialnych, fibroblastach komórek ścian kanalików nerkowych i naczyń tętniczych), w nabłonku oddechowym płuc, w neuronach i komórkach glejowych mózgu, w przewodzie pokarmowym, wątrobie, przysadce, nadnerczach, jajnikach, jądrach a także w układzie autonomicznym (zwłaszcza w części współczulnej; m.in. w ciałach komórkowych neuronów przedwojowych i pozawojowych oraz w neuronach przedwspółczulnych np. jądra przykomorowego, w jądrze szlaku pasma samotnego, obszarach noradrenergicznych A5 i A6) [28]. Obecność AT<sub>1</sub>R wykazano również we wszystkich narządach okołokomorowych pozbawionych bariery krew-mózg (szczególnie w narządzie okołosklepieniowym, w narządzie naczyniowym blaszki krańcowej i w polu najdalszym).

Wiele czynników ogólnoustrojowych i lokalnych ma wpływ na regulację ekspresji genu i białka receptora AT<sub>1</sub>. Aktywność tych czynników w różnych rodzajach komórek może się zmieniać w zależności od stanu czynnościowego samej komórki, prowadząc do zmian w regulacji liczby i funkcji receptorów AT<sub>1</sub> (szczególnie w stanach patologicznych). Synteza i powinowactwo tych receptorów może ulegać zmianie także pod wpływem związków egzogennych (np. leków).

Pobudzenie receptorów  $AT_1$  w wyniku działania Ang II lub angiotensyny III, uruchamia w komórce tzw. reakcje szybkie (trwające kilkanaście minut), a także długotrwałe związane z chronicznie zwiększoną stymulacją receptorów  $AT_1$  i zwiększoną transkrypcją genów. Przyłączenie Ang II do receptora stymuluje fosfolipazę C, która przekształca w procesie hydrolizy fosfolipidy połączone z błoną komórkową prowadząc do uwolnienia trifosforanu inozytolu (IP3) i diacyloglicerolu (DAG). IP3 działając na swoje receptory zlokalizowane w siateczce sarkoplazmatycznej lub śródplazmatycznej poprzez uwolnienie z nich jonów wapnia zapoczątkowuje procesy skurczu a także zwiększa aktywność innych białek regulujących procesy wewnątrzkomórkowe. DAG aktywuje kinazę białkową C i otwiera kanały jonowe dla jonów  $Na^+$  i  $H^+$  przyczyniając się w ten sposób do wzrostu pH cytoplazmy [29].

Angiotensyna II odgrywa także rolę w regulacji pobudliwości mięśni gładkich, neuronów i innych komórek poprzez wpływ na przewodność kanałów dla jonów potasu i chloru oraz nieselektywnych kanałów dla kationów. Zamknięcie kanałów potasowych zależnych od potencjału ( $I_A$ , w sercu  $I_{to}$ ), kanałów regulowanych przez jony  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) i przez ATP ( $K_{ATP}$ ) następuje w wyniku pobudzenia receptorów  $AT_1$ . W wyniku zamknięcia kanałów potasowych potencjał błonowy komórek w spoczynku przyjmuje wartości mniej ujemne, a repolaryzacja po pobudzeniu przebiega wolniej [30].

Zwiększone stężenie jonów wapnia w komórce w konsekwencji prowadzi także do aktywacji enzymów odpowiedzialnych za syntezę eikozanoidów i tlenku azotu. W komórkach układu krążenia i nerek Ang II zwiększa aktywność fosfolipazy  $A_2$ , która hydrolizuje fosfatydylocholinę i fosfoetanolaminę do fosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych. W wyniku tych reakcji zwiększa się stężenie kwasu arachidonowego oraz jego metabolitów o działaniu naczyniorozszerzającym ( $PGI_2$ ) i naczyniozwążającym ( $TXA_2$ ,  $PGH_2$ ). Proporcja pomiędzy eikozanoidami naczyniorozszerzającymi i naczyniozwążającymi zależy od czynników regulujących aktywność cyklooksygenaz i syntazy tromboksanu. W wyniku podwyższonego stężenia jonów wapnia w cytoplazmie aktywowana jest także śródbłonkowa syntaza tlenku azotu ( $NOS_3$ ,  $eNOS$ ) prowadząca do wytwarzania naczyniorozszerzającego tlenku azotu. Wzmoczone wytwarzanie w ścianie naczyń  $PGI_2$  i  $NO$  w wyniku aktywacji  $AT_1R$ , ogranicza częściowo naczyniozwążający wpływ stymulacji tych receptorów przez Ang II, nie znosząc go całkowicie. Wyjątkiem są naczynia rdzenia nerek, w których naczyniozwążające działanie Ang II ujawnia się dopiero po zablokowaniu syntazy tlenku azotu [31], [32].

## Receptor AT<sub>2</sub>

Zakres wiedzy o mechanizmach pobudzania i regulacji receptorów AT<sub>2</sub> (AT<sub>2</sub>R) jest znacznie mniejszy niż w przypadku AT<sub>1</sub>R. Gen dla receptora AT<sub>2</sub> znajduje się na chromosomie X. W regionie promotora genu dla receptora AT<sub>2</sub> występuje szereg elementów regulacyjnych w konfiguracji *cis*, które pośredniczą w regulacji ekspresji genu dla receptora AT<sub>2</sub> przez hormony i cytokiny. Transkrypcja genu dla AT<sub>2</sub> prowadzi do syntezy białka zbudowanego z 363 aminokwasów należącego do grupy siedmiodomenowych receptorów błony komórkowej [27].

AT<sub>2</sub>R zlokalizowano w sercu (na błonach kardiomiocytów i fibroblastów), ścianie większości naczyń układu krążenia, a także w mózgu (m.in. w podwzgórzu, przegrodzie, jądrach podstawy i śródmózgowia, w rdzeniu przedłużonym), nadnerczach i wysepkach trzustki. W nerkach AT<sub>2</sub>R występują w śródbłonku naczyń nerkowych, na pograniczu strefy zewnętrznej i wewnętrznej rdzenia nerek, w ścianie kanalików proksymalnych i w torebce nerkowej [33], [34]; odgrywają one istotną rolę w procesach zapalnych nerki [35].

Pobudzenie receptorów AT<sub>2</sub> w układzie krążenia prowadzi do syntezy bradykininy, prostaglandyny I<sub>2</sub>, NO, a także do zahamowania aktywności kinaz ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) i MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*). Pobudzenie receptorów AT<sub>2</sub> wywołuje zmniejszenie aktywności kanałów wapniowych T i otwarcie kanałów potasowych poprzez cykliczny monofosforan guanozyny (cGMP), którego wytworzenie stymulowane jest przez NO. Prowadzi to do zmniejszenia pobudliwości komórek układu sercowo-naczyniowego chroniąc go przed negatywnymi skutkami działania cytokin i aldosteronu [36], [37].

Efekt hipotensyjny wywierany przez działanie Ang II na układ krążenia za pośrednictwem receptorów AT<sub>2</sub> jest zdominowany przez znacznie silniejsze działanie presyjne za pośrednictwem receptorów AT<sub>1</sub>. W prawidłowych warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy syntezą receptorów AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub> oraz ich pobudzaniem przez angiotensynę II. W stanach patologicznych obserwuje się zakłócenie owej równowagi w wyniku działania samej Ang II lub też innych składowych układu RAAS.

Receptor AT<sub>2</sub> przeciwdziała reakcjom zainicjowanym przez receptory AT<sub>1</sub> i czynniki wzrostu; hamuje mechanizmy zakrzepowe oraz zapalne w śródbłonku, zwiększa wytwarzanie tlenku azotu i prostaglandyn rozszerzających naczynia

krwionośne Przyczynia się do regulacji ciśnienia krwi tętniczej oraz czynności nerek [38], [39].

#### 1.1.4. Leczenie nadciśnienia tętniczego

Przy wyborze leków hipotensyjnych uwzględnia się m.in. czynniki konstytucyjne takie jak: wiek, płeć, rasa czy masa ciała; ale przede wszystkim obecność czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, uszkodzeń narządowych, obecność powikłań sercowo-naczyniowych i nerkowych, a także istnienie innych chorób współtowarzyszących.

W przypadku nadciśnienia tętniczego, u chorych z łagodnym przebiegiem choroby leczenie rozpoczyna się od monoterapii tj. zastosowania jednego z leków tzw. pierwszego rzutu. Należą do nich: diuretyki, leki blokujące receptory beta-adrenergiczne, blokery kanału wapniowego, inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ang. *angiotensin-converting enzyme inhibitors* – ACEi) oraz leki blokujące receptor AT<sub>1</sub> tj. antagoniści receptorów angiotensyny II (ang. *angiotensin II receptor blockers* – ARB), zwane potocznie sartanami [2].

Diuretyki należą do grupy leków zapobiegających powstawaniu dodatniego bilansu sodu i wody w organizmie. Mechanizm ich działania polega na zahamowaniu reabsorpcji sodu w kanalikach nerkowych. Problemem przy stosowaniu szeregu diuretyków jest zwiększenie wydalania potasu. Skłoniło to do poszukiwań diuretyków tzw. oszczędzających potas, które działają w końcowym odcinku nefronu, poprzez blokowanie receptorów mineralokortykosteroidowych lub bezpośrednio hamowanie kanałów sodowych (ENaC). Wchłanianie zwrotne sodu w tym odcinku nefronu zależne jest od równoległego wydalania potasu przez kanały ROMK powodując zmniejszenie utraty potasu z moczem.

Leczenie diuretykami prowadzi do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi poprzez zmniejszenie objętości krwi krążącej (wolemii) oraz objętości wyrzutowej serca, pomimo jednoczesnej aktywacji współczulnego układu nerwowego, układu renina-angiotensyna oraz zwiększonego wydzielania innych substancji naczyniokurczących (np. endoteliny 1). Są to efekty towarzyszące pierwszej fazie leczenia. W długotrwałym leczeniu diuretykami wolemia stopniowo zwiększa się i następuje normalizacja objętości wyrzutowej serca. Dochodzi także do zmniejszenia wrażliwości komórek mięśniowych ściany naczyń na substancje naczyniokurczące (np. katecholaminy, endotelinę 1 czy angiotensynę II). W wyniku działania diuretyków dochodzi także do

uwalniania prostaglandyn o działaniu naczyniorozszerzającym prowadzących do obniżenia ciśnienia krwi tętniczej.

Kolejną grupę stanowią leki blokujące receptory układu adrenergicznego, głównie typu beta (beta-adrenolityki). Dzielą się one ze względu na wybiórczość powinowactwa do receptorów beta-1 i wewnętrzną aktywność sympatykomimetyczną. Leki należące do beta-adrenolityków to tzw. leki wielofunkcyjne (hybrydowe), które łączą właściwości blokowania receptorów beta z działaniem rozszerzającym na naczynia krwionośne. Leki te zmniejszają także wydzielanie reniny, a w konsekwencji syntezę angiotensyny II. Beta-adrenolityki cechuje podobny do innych leków przeciwnadciśnieniowych obraz powikłań w postaci incydentów sercowo-naczyniowych, obserwuje się również niekorzystne efekty metaboliczne (dislipidemię oraz pogorszenie tolerancji glukozy), a także nasilenie odczuwania objawów hipoglikemii u chorych na cukrzycę.

Leki blokujące receptory  $\alpha$ -adrenergiczne dzielą się na: nieselektywne i selektywne. Leki te wywołują efekt hipotensyjny poprzez blokowanie postsynaptycznych receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych. Preparaty różnią się selektywnością wobec receptorów  $\alpha_1$ - i  $\alpha_2$ - adrenergicznych, co ma znaczenie dla efektów hemodynamicznych oraz częstości występowania działań niepożądanych, głównie hipoksji. Leki działające na receptory  $\alpha_1$  blokują je wybiórczo w ścianie naczyń krwionośnych; naczynia rozszerzają się co prowadzi do zmniejszenia oporu obwodowego. Jednocześnie zahamowaniu ulegają receptory presynaptyczne  $\alpha_2$  zlokalizowane na zakończeniach nerwowych, co jednak nie upośledza zwrotnego uwalniania noradrenaliny w obrębie zakończeń nerwowych. Dzięki takiemu działaniu nie dochodzi do zwiększenia częstotliwości pracy serca. Leki te na ogół są dobrze tolerowane a częstość występowania działań niepożądanych zależy od selektywności wobec postsynaptycznych receptorów  $\alpha_1$  zlokalizowanych w ścianie naczyń krwionośnych.

Blokery kanału wapniowego należą do kolejnej grupy leków w terapii nadciśnienia tętniczego. Wyróżnia się 3 podgrupy tych leków: pochodne fenyloalkiloaminy, pochodne benzotiazepiny i pochodne dihydropirydyny. Mechanizm ich działania polega na zablokowaniu kanałów wapniowych typu L (ang. *long-lasting*) w błonie komórkowej, w wyniku czego dochodzi do zmniejszenia napływu wapnia do komórki a w konsekwencji do zmniejszenia napięcia mięśni gładkich ściany



naczyniowej czego wynikiem jest rozszerzenie naczyń, spadek oporu obwodowego i obniżenie ciśnienia tętniczego krwi.

Koleją grupą leków stosowaną w leczeniu nadciśnienia tętniczego są leki hamujące układ renina-angiotensyna. Należą do niej tzw. inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEi), których działanie polega przede wszystkim na blokowaniu powstawania Ang II. ACEi posiadają grupę czynnościową (karboksylową, sulfhydrylową lub fosforylową), która wiąże cynk w miejscu aktywnym ACE w wyniku czego dochodzi do zablokowania przekształcenia angiotensyny I do angiotensyny II. Wiele leków należących do tej grupy występuje w formie proleków, z których powstają w ustroju aktywne metabolity. W ich działaniu uwzględnia się współzależność kilku mechanizmów. Poza obniżeniem stężenia angiotensyny II, wykazują one również wpływ na inne współistniejące mechanizmy np. zahamowanie degradacji bradykininy. Dzięki wzrostowi poziomu bradykininy następuje wzrost stężenia tlenu azotu oraz prostacykliny, obniża się stężenie fibrynogenu oraz wzrasta aktywność antyagregacyjna. Kolejnym istotnym mechanizmem działania inhibitorów konwertazy angiotensyny jest zmniejszenie wydzielania aldosteronu oraz przeciwdziałanie efektom pobudzenia układu współczulnego. Dzięki wielokierunkowym wpływom na procesy patofizjologiczne inhibitory konwertazy angiotensyny, obok działania hipotensyjnego, wywierają także korzystny wpływ na serce, nerki oraz śródbłonek naczyń krwionośnych.

Wiadomo, że jednym z powikłań narządowych w nadciśnieniu tętniczym może być przerost lewej komory serca, co kilkukrotnie zwiększa ryzyko zawału serca oraz nagłego zgonu sercowego. Dlatego ważnym celem terapii nadciśnienia tętniczego powinno być nie tylko obniżanie ciśnienia tętniczego krwi, ale również zapobieganie wystąpieniu przerostu lewej komory serca.

Inhibitory enzymu konwertującego, a także antagoniści receptora angiotensyny II (ARB) obniżają ciśnienie tętnicze krwi głównie poprzez zmniejszenie oporu naczyniowego w wyniku mniejszej dostępności biologicznej naczyniokurczącej angiotensyny II. Leki należące do grupy ARB blokują połączenie angiotensyny II z jej receptorem typu 1 (AT<sub>1</sub>). Hamujący wpływ ARB na interakcję angiotensyna II - AT<sub>1</sub> jest znacząco większy niż wpływ ACEi, ponieważ Ang II może powstawać również poprzez szlaki alternatywne np. z udziałem chymazy. Zablokowanie receptorów AT<sub>1</sub> przeciwdziała efektom biologicznym Ang II, które obejmującym przede wszystkim skurcz naczyń, wydzielanie aldosteronu przez nadnercza, stymulację transportu

kanalikowego sodu w nefronach, działanie prozapalne i pobudzające procesy przerostu i włóknienia, ale jednocześnie podwyższa stężenie Ang II. Jej nadmiar powoduje zmniejszenie ekspresji receptora AT<sub>1</sub> co sprzyja jej wiązaniu z receptorem AT<sub>2</sub> i stymulacji szeregu pozytywnych efektów zależnych od tychże receptorów [40], [41]. Aktywacja receptorów AT<sub>2</sub> prowadzi do obniżenia ciśnienia krwi tętniczej w wyniku uwalniania tlenku azotu, hamowania procesów wzrostu i różnicowania komórek. Pobudzenie receptorów AT<sub>2</sub> może wywoływać niekorzystne zjawiska jak np. pobudzenie procesów zapalnych czy stymulacja procesów apoptozy (głównie w wyniku hamowania kinazy MAP) [36], [37].

Stosunkowo nową podgrupą leków hamujących układ renina–angiotensyna są leki hamujące aktywność reniny. Mechanizm ich działania polega na blokowaniu aktywnego miejsca reniny co uniemożliwia powstanie angiotensyny I z angiotensynogenu. Dochodzi do obniżenia stężenia angiotensyny I i II, prowadzące do zniesienia fizjologicznego zahamowania uwalniania proreniny i reniny z komórek aparatu przykłębuszkowego. Przyłączanie się proreniny do własnych receptorów zlokalizowanych w różnych tkankach może nasilać procesy włóknienia. Pierwsze inhibitory reniny skutecznie hamowały jej aktywność oraz zmniejszały ciśnienie tętnicze krwi [42]–[45]. Prowadzone badania nad możliwościami zablokowania reniny polegały na stosowaniu swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko reninie, które były skuteczne w zwiększaniu przepływu nerkowego [46]. Wprowadzonymi do badań nowymi związkami należącymi do inhibitorów reniny były: enalkiren, remikiren, terlakiren i zankiren. Każdy z nich wywoływał obniżenie ciśnienia krwi tętniczej, natomiast enalkiren i remikiren charakteryzowały się niską biodostępnością [47]. Wyższą biodostępnością charakteryzowały się tarlakiren i zankiren, jednak badania nad tą grupą leków zawieszono w połowie lat 90 [48]. Kilka lat później powrócono do badań nad inhibitorami reniny z aliskirenem jako przedstawicielem leków nowej generacji. Mechanizm jego działania jest podobny do opisanego powyżej, ale co ważne aliskiren nie wpływa na receptory proreniny. W przytoczonych badaniach nad aliskirenem wykazano podobny efekt hipotensyjny aliskirenu do efektu uzyskanego w terapii walsartanem czy losartanem (antagoniści receptora angiotensyny II AT<sub>1</sub>) [43], [49], [50], a zastosowanie tych leków w terapii łączonej (skojarzonej) pozwoliło na uzyskanie silniejszego efektu hipotensyjnego. Przeprowadzono również badania mające na celu ocenę wpływu aliskirenu na rozwój i/lub regresję powikłań narządowych a także częstość zdarzeń sercowo-naczyniowych. Badania wykazały, że aliskiren i

losartan w podobnym stopniu zmniejszały przerost lewej komory serca [51]. W innych badaniach wykazano właściwości nefroprotektoryjne aliskirenu [52]. Inhibitory reniny w klinice stanowią nową możliwość leczenia nadciśnienia tętniczego. Przeprowadzono szereg badań z zastosowaniem podwójnej blokady tj. RAAS za pomocą ACEi i aliskirenu (grupa 837 chorych z nadciśnieniem tętniczym krwi). Uzyskane wyniki wskazują na większą skuteczność w leczeniu nadciśnienia tętniczego w tego rodzaju terapii, gdzie jednocześnie zablokowano PRA (aktywność reninowa osocza), której wzrost jest typowy przy zastosowaniu ACEi, oraz znacznego zwiększenia PRC (stężenia reniny w osoczu) [43].

#### **1.1.5. Peptydy z nasion rzepaku jako inhibitory konwersji angiotensyny I.**

W ramach projektu podjęto próbę oceny hipotensyjnego działania substancji blokujących powstawanie Ang II na drodze niezależnej od ACE (blokowanie chymazy), a także próbę określenia mechanizmu działania nowych substancji syntetycznych, pochodnych peptydów z nasion rzepaku, wykazujących słabą aktywność blokującą wobec ACE i podejrzewanych o aktywność hamującą wobec chymazy. W założeniach projektu miały to być fragmenty pochodzące z białek zapasowych nasienia: napiny i krucyferyny. W badaniach wstępnych wykazano, że wytypowane peptydy (RIY: Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; VWIS: Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna) skutecznie obniżały ciśnienie krwi tętniczej u szczurów spontanicznie nadciśnieniowych (SHR), pomimo tego, że peptydy te charakteryzowały się znacznie niższą aktywnością wobec ACE niż znane inhibitory tego enzymu [53]. Eksperymentalnie potwierdzono zdolność wspomnianych peptydów do blokowania enzymu konwertującego; badanie ich działania opierało się na pomiarze  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ] przed i po inkubacji peptydów RIY i VWIS z ACE (RIY: przed: 28  $\mu M$ , po: 20  $\mu M$ ; VWIS przed: 30  $\mu M$ , po: 5  $\mu M$ ; odpowiednio) lub też aktywne stawały się ich mniejsze fragmenty, dopiero po przekształceniu wyjściowego peptydu w układzie pokarmowym (tzw. „prodrugs”) [53], [54]. Wspomniane peptydy wykazywały większą skuteczność obniżania ciśnienia krwi tętniczej (hipotensyjną) u szczurów dorosłych (starych, będących w ustalonej fazie nadciśnienia), u których inhibitory ACE są zdecydowanie mniej efektywne. Informacje te stały się przesłanką do podjęcia badań nad rolą peptydów w obniżaniu ciśnienia krwi tętniczej poprzez hamowanie powstawania Ang II, a także nad poszukiwaniem dodatkowych poza ACE miejsc uchwytu dla tego hamowania.

Ponieważ opisane przez Marczak i wsp. [53] efekty hipotensyjne po jednorazowym dożołądkowym podaniu peptydów były nieproporcjonalnie duże, przy ich bardzo słabym działaniu anty-ACE, postawiliśmy hipotezę, że peptydy te mogą blokować powstawanie Ang II niezależnie od ACE. Jako miejsce docelowe wytypowano enzymy konwertujące Ang I w tkankach tj. chymazy. W celu weryfikacji powyższego założenia wykonano badanie w układzie *in vitro* dla ustalenia czy peptydy te wykazują aktywność hamującą w stosunku do chymazy. Badanie to pozwoliło również na wybranie dwóch najbardziej skutecznych peptydów w odniesieniu do blokowania chymazy, spośród kilku o potencjalnie hamującej aktywności.

### 1.1.6. Biomarkery w chorobie nadciśnieniowej

Wiadomo, że nadciśnienie tętnicze może być związane z występowaniem lokalnych stanów zapalnych (w tym stanu zapalnego śródbłónka), rozpoczęciem przebudowy struktur oraz obecnością lokalnych stanów hipoksyjnych. Procesy te mogą powodować zmiany w obrazie morfologicznym tkanek i funkcjonowaniu narządów i w konsekwencji prowadzić do zmian w lokalizacji, ekspresji oraz aktywności wielu związków przeciwdziałających powstawaniu stanu zapalnego (*PGE<sub>2</sub>-prostaglandin E<sub>2</sub>*, NOS, MMP9 – *matrix metalloproteinase 9*), przebudowie struktur szczególnie macierzy zewnątrzkomórkowej (*integriny, czynniki wzrostu*) oraz rozwojowi hipoksji (MMP1,2,9, VEGF - *vascular endothelial growth factor*, TGF $\alpha,\beta$  – *transforming growth factor  $\alpha,\beta$* ). Wymienione powyżej czynniki mają wpływ na obraz i przebieg zmian zachodzących w strukturze naczyń krwionośnych, nefronów a także w śródmiąszcu nerki. Zmiany te mogą przekładać się na funkcje wielu narządów.

Liczne badania doświadczalne prowadzone na modelach zwierzęcych wskazują także na związek pomiędzy stresem oksydacyjnym, a nadciśnieniem tętniczym. Reaktywne formy tlenu, w tym głównie anionorodnik ponadtlenkowy przyczyniają się do dysfunkcji śródbłónka (wywołując m.in. zaburzoną relaksację naczynia) i odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób układu krążenia. Głównymi źródłami anionu ponadtlenkowego w ścianie naczyń krwionośnych są: oksydaza NADPH (której silnym aktywatorem jest Ang II), oksydaza ksantynowa, syntaza tlenu azotu i cyklooksygenaza. Zachwianie równowagi między stężeniem czynników utleniających, a układem antyoksydacyjnym prowadzi do uszkodzenia śródbłónka co sprzyja rozwojowi nadciśnienia tętniczego. Dodatkowo wolne rodniki tlenowe zwiększają ekspresję

receptora dla angiotensyny II (AT<sub>1</sub>R), powodując skurcz naczyń, a oddziałując na nerki, przyczyniają się do retencji sodu i wody w konsekwencji prowadząc do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej. Dodatkowo reaktywne formy tlenu wpływają na pobudzenie procesów zapalnych (pobudzenie wydzielania cytokin prozapalnych np. interleukiny-2, -4, -5, -10, TNF $\alpha$ , $\beta$  – ang. *tumor necrosis factor*) w organizmie [55].

Mimo wieloletnich poszukiwań w dalszym ciągu brakuje dobrych biomarkerów, które mogłyby pomóc w rozpoznaniu wczesnego stadium rozwoju nadciśnienia i uszkodzenia narządów. Te odnoszące się do uszkodzenia nerek jak np. albumina, kreatynina, tempo filtracji kłębuszkowej, najczęściej osiągają już wartości wykraczające poza normę w przypadku poważnego uszkodzenia lub/i upośledzenia pracy narządów. W klinice istnieje potrzeba poszukiwania biomarkerów, które mogłyby wskazywać wcześniejsze stadium choroby.

### 1.1.7. Zwierzęcy model nadciśnienia

W ostatnich latach zwrócono uwagę na znaczenie czynnika genetycznego w patogenezie klinicznego nadciśnienia tętniczego [56], [57]. Jednym z najważniejszych modeli doświadczalnych prezentujących genetycznie uwarunkowane nadciśnienie tętnicze są szczury SHR (*ang. spontaneously hypertensive rat*; spontanicznie rozwijające nadciśnienie).

Szczury tego szczepu charakteryzuje wrodzona niska liczba nefronów, co ma pośredni wpływ na rozwój nadciśnienia. Badania sugerują, że niska liczba nefronów prawdopodobnie wywołuje nadciśnienie, ponieważ prowadzi do rozwoju choroby mikronaczyniowej nerek i rozwoju stanu zapalnego. Niska liczba nefronów jest więc czynnikiem ryzyka, który przyspiesza uruchomienie mechanizmów leżących u podstaw nadciśnienia (choroba mikronaczyniowa nerek), a nie jest przyczyną samą w sobie. Przebieg zmian narządowych oraz zmiany aktywności układów zaangażowanych w regulację ciśnienia krwi tętniczej u szczurów SHR jest podobny do tych występujących w nadciśnieniu pierwotnym u ludzi [58], [59].

Dane z literaturowe wskazują także na podwyższoną wewnątrznerkową produkcję angiotensynogenu, co przyczynia się do podwyższonego poziomu Ang II prowadząc do rozwoju nadciśnienia i uszkodzenia nerek u tych zwierząt [60].

Szczury szczepu SHR wyhodowano na Uniwersytecie w Kyoto (Kyoto School of Medicine) w Japonii już w 1963 roku wybierając niekrewniacze szczury Wistar Kyoto (WKY) charakteryzujące się podwyższonym ciśnieniem krwi [61], [62]. W wyniku krzyżowania już w trzecim pokoleniu uzyskano blisko 100% pewność wystąpienia nadciśnienia u potomstwa [61]. Przeciętna długość życia szczurów SHR wynosi od 1 do 2 lat, natomiast szczury WKY żyją ok. 2,5 do 3 lat [63].

Rozwój nadciśnienia tętniczego u SHR następuje w sposób spontaniczny pomiędzy 7 a 15 tygodniem ich życia [63], [64]. Inne źródła literaturowe wskazują, że rozwój nadciśnienia rozpoczyna się ok 5-6 tygodnia życia a skurczowe ciśnienie krwi tętniczej w fazie ustalonego nadciśnienia osiąga wartości w zakresie 180-200 mmHg w fazie ustalonego nadciśnienia. W nadciśnieniu takim obserwuje się przerost i niewydolność mięśnia sercowego, a także zaburzenie czynności nerek [65].

W tym genetycznym modelu nadciśnienia zaobserwowano między innymi zwiększoną częstość skurczów serca, wyraźne osłabienie odruchów z baroreceptorów i zaburzenie ośrodkowej regulacji ciśnienia tętniczego. Stwierdzono również zwiększenie

liczby receptorów AT<sub>1</sub> oraz wzrost stężenia peptydów opioidowych, natomiast liczba receptorów dla ANP ulega zmniejszeniu [65]. Zaobserwowano także zmniejszenie zawartości wazopresyny w mózgu z jednoczesnym podwyższeniem tempa obrotu noradrenaliny w ośrodkowym układzie nerwowym.

Rozwój choroby nadciśnieniowej u szczurów szczepu SHR związany jest z uszkodzeniem nerek. Szczury tego szczepu, jak już wspomniano, mają mniej kłębuszków nerkowych w porównaniu do szczurów WKY, co skutkuje zmniejszeniem zdolności filtracyjnej nerek [66]. Potwierdza to pogląd o istotnej roli nerek w patogenezie nadciśnienia tętniczego u szczurów SHR [67].

Szczury SHR są jednym z najczęściej wykorzystywanych modeli doświadczalnych do badań hipertrofii oraz niewydolności serca, a także charakteryzują się one wysoką aktywnością układu RAAS [68], [69].

Autorzy jednej z prac wykazali większą ekspresję receptora AT<sub>1</sub> u dorosłych szczurów SHR w porównaniu do szczurów kontrolnych (WKY) wskazując na jego rolę w rozwoju nadciśnienia tętniczego krwi u tych zwierząt [70].

## Cel badań

W szerokim kontekście, badania miały na celu sprawdzenie czy blokowanie lokalnie/tkankowo powstającej Ang II obniży ciśnienie krwi tętniczej, a także poprawi funkcję narządów. Zakładając poprawność hipotezy, że peptydy pochodzące z nasion rzepaku posiadają nie tylko słaby efekt hamujący wobec ACE, ale także blokują chymazę, sugerujemy, że te łatwe do pozyskania substancje mogą być skuteczne w terapii i prewencji nadciśnienia. Ponadto stawiamy hipotezę, że skuteczniejszą terapią w leczeniu nadciśnienia może być zastosowanie podwójnej blokady osoczowego/systemowego i tkankowego/lokalnego RAAS, niż obecnie stosowana terapia nadciśnienia opierająca się na blokowaniu osoczowego RAAS.

**W ścisłym ujęciu, celem naukowym realizowanego projektu było zbadanie czy chroniczne/przewlekłe zablokowanie chymazy, za pomocą chymostatyny a także peptydów pochodzących z nasion rzepaku, doprowadzi do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi u szczurów będących w fazie utrwalonego nadciśnienia lub/i zapobiegnie rozwojowi nadciśnienia u osobników młodych z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (SHR).**

Sformułowano następujące cele szczegółowe:

1. Zbadanie wpływu przewlekłego (14 dni) podawania inhibitorów niezależnych od ACE szlaków konwersji Ang I: komercyjnie dostępnej chymostatyny (inhibitora chymazy) oraz syntetycznych, potencjalnie antyhipertensyjnych, analogów peptydów pochodzących z nasion rzepaku na ciśnienie tętnicze krwi, parametry czynnościowe nerki (hemodynamika nerki, filtracja kłębuszkowa, tempo wydalania), morfologię nerek oraz stężenie Ang II w osoczu i wybranych narządach (nerka, serce, aorta).
2. Próba znalezienia biomarkerów, pozwalających ocenić stan uszkodzenia wybranych narządów oraz powiązać stopień nadciśnienia i dynamikę przebiegu choroby z ilością lub obecnością wybranych substancji w łatwo dostępnych płynach ustrojowych takich jak osocze czy mocz.



## 2. Materiały i metody

### 2.1. Pomiar aktywności chymazy – badanie *in vitro*.

W ramach realizowanego projektu we współpracy z Pracownią Peptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, wykonano badania w układzie *in vitro* zdolności do przekształcania Ang I przez wybrane peptydy.

#### *Trawienie Ang I przez chymazę w obecności inhibitorów peptydowych*

Chymazę (Sigma-Aldrich, 72 units/mg białka; 259 µg/1 ml, objętość 187 µl) rozpuszczono w buforze Tris\*HCl (0,27 mM Tris\*HCl, pH 7,88 oraz 150 mM NaCl) do ostatecznego stężenia enzymu 1,379 µg/ml. Roztwór 1 mM angiotensyny I (sekwencja peptydowa DRVYIHPFHL) przygotowano w buforze Tris\*HCl (skład jw). Cztery roztwory inhibitorów peptydowych (RIY – Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna, VWIS – Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna, IY - Izoleucyna-Tyrozyna, VW - Walina-Tryptofan) zostały przygotowane poprzez rozpuszczenie odpowiedniego peptydu w postaci soli z kwasem trifluorooctowym (TFA) w roztworze Ang I do ostatecznego stężenia 5 mM (5-krotny nadmiar w stosunku do Ang I). 100 µl przygotowanego wcześniej roztworu chymazy inkubowano w temperaturze 37±1°C przez 15 min, a następnie dodawano 100 µl roztworu Ang I lub roztworu Ang I w mieszaninie z inhibitorem peptydowym. Reakcja przekształcania Ang I do Ang II (odcięcie dwóch C-terminalnych aminokwasów) była zatrzymywana po upływie odpowiedniego czasu (0, 10, 20, 30, 40, 60 lub 80 min) poprzez dodanie 10 µl kwasu mrówkowego o stężeniu 98%. Po zatrzymaniu reakcji próbki były liofilizowane i ponownie rozpuszczane w 0.5 ml metanolu (Sigma-Aldrich). Stężenie pozostałej w roztworze Ang I było analizowane za pomocą systemu HPLC-MS (kolumna C-12, gradient liniowy AB: 20-44 % B w 20 min; eluent A: 0,05% TFA/woda; eluent B: 0,05% TFA/acetonitryl).

Jeżeli nie stwierdzono inaczej to wszystkie roztwory wykorzystane w tej części badań zakupione zostały w firmie Sigma-Aldrich.

Blokującą aktywność peptydów w stosunku do chymazy wyrażono poprzez stężenie pozostałego substratu po reakcji (Ang I) w stosunku do czasu trwania reakcji. Obliczeń dokonano według poniższego wzoru:

$$[\text{Ang } I_{t = X \text{ min}} / \text{Ang } I_{t = 0 \text{ min}}] \times 100\%$$

gdzie:

Ang  $I_{t = X \text{ min}}$  oznacza pole powierzchni piku dla Ang I w odpowiednim czasie reakcji,

Ang  $I_{t = 0 \text{ min}}$  to pole powierzchni piku dla Ang I w zerowej minucie reakcji.

Na podstawie otrzymanych wyników obliczono czas półtrwania Ang I w roztworze w obecności lub bez inhibitorów peptydowych.

## **2.2. Zwierzęcy model nadciśnienia – nadciśnienie tętnicze o podłożu genetycznym**

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem tętniczym (SHR) w dwóch fazach jego rozwoju. Badano szczury 6-tygodniowe będące we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia (SHR-6) i szczury 16-tygodniowe będące w utrwalonej fazie nadciśnienia tętniczego (SHR-16). Procedury doświadczalne zostały zaaprobowane przez IV Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie (nr uchwał 30/2011, 10/2014, 11/2014, 86/2015, 483/2017).

Samce szczurów, spontanicznie rozwijających nadciśnienie podzielono na dwie grupy ze względu na stadium rozwoju choroby: 6-tygodniowe (SHR-6) szczury we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia oraz 16-tygodniowe (SHR-16) będące w fazie utrwalonego nadciśnienia. Badania przewlekłe prowadzono na zwierzętach czuwających, które otrzymywały chymostatynę (CH) lub jej rozpuszczalnik (DMSO) oraz peptydy, RIY lub VWIS, albo ich rozpuszczalnik (0,9% NaCl). Po zakończeniu obserwacji chronicznych, zwierzęta poddawane były obserwacji w narkozie, po zakończeniu których pobierano narządy do dalszej analizy.

Protokół badań i grupy doświadczalne (Ryc. 2):

**Szczury SHR będące we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia (6-tygodniowe), n=49, otrzymujące:**

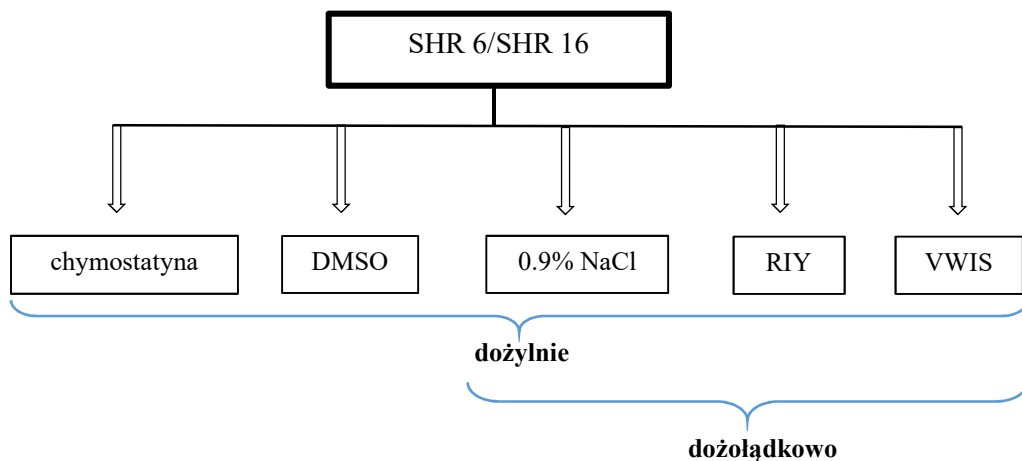
- **dożylnie; objętość 0,5 ml:**
- SHR 6-CH *i.v.* – roztwór chymostatyny; 2 mg/kg
- SHR 6-DMSO *i.v.* – roztwór 0,05% DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)
- SHR 6-S *i.v.* – 0,9% roztwór soli fizjologicznej
- SHR 6-RIY *i.v.* – roztwór peptydu RIY; 7,5 mg/kg
- SHR 6-VWIS *i.v.* – roztwór peptydu VWIS; 12,5 mg/kg

- **dożoładkowo; objętość 0,5 ml:**
- SHR 6-S *p.o.* – 0,9% roztwór soli fizjologicznej
- SHR 6-RIY *p.o.* – roztwór peptydu RIY; 7,5 mg/kg
- SHR 6-VWIS *p.o.* – roztwór peptydu VWIS; 12,5 mg/kg

**Szczury SHR będące w ustalonej fazie nadciśnienia (16-tygodniowe), n=60, otrzymujące:**

- **dożylnie; objętość 1 ml:**
- SHR 16-CH *i.v.* – roztwór chymostatyny; 2 mg/kg
- SHR 16-DMSO *i.v.* – roztwór 0,05% DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)
- SHR 16-S *i.v.* – 0,9% roztwór soli fizjologicznej
- SHR 16-RIY *i.v.* – roztwór peptydu RIY; 7,5 mg/kg
- SHR 16-VWIS *i.v.* – roztwór peptydu VWIS; 12,5 mg/kg

- **dożoładkowo; objętość 1 ml:**
- SHR 16-S *p.o.* – 0,9% roztwór soli fizjologicznej
- SHR 16-RIY *p.o.* – roztwór peptydu RIY; 7,5 mg/kg
- SHR 16-VWIS *p.o.* – roztwór peptydu VWIS; 12,5 mg/kg



*Ryc. 2 Schemat badanych grup zwierząt oraz podawanych substancji. SHR-6 – szczury spontanicznie nadciśnieniowe we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia; SHR-16 – szczury spontanicznie nadciśnieniowe w ustalonej fazie nadciśnienia; DMSO - dimetylosulfotlenek; RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; VWIS - Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna.*

### 2.3. Doświadczenia przewlekłe

#### *Przygotowanie chirurgiczne zwierząt*

Przed rozpoczęciem doświadczenia u zwierząt wykonywano konieczne zabiegi chirurgiczne. W grupie szczurów, u których zaplanowano rejestrację ciśnienia tętniczego krwi wykorzystano inwazyjną metodę pomiaru za pomocą systemu telemetrycznego firmy Data Science International (DSI, St. Paul, MN, USA). System ten składa się z następujących elementów: (i) nadajnika umieszczonego w ciele zwierzęcia, (ii) odbiornika umieszczonego w bezpośrednim sąsiedztwie szczura, (iii) macierzy zbierającej dane z kilku odbiorników oraz (iv) komputera wraz z oprogramowaniem do rejestracji i analizy zgromadzonych danych (Dataquest ART 4.36).

Nadajniki telemetryczne działają na zasadzie bezprzewodowego analogowego przesyłu danych za pomocą fal radiowych o częstotliwości 55 kHz. Każdy nadajnik zbudowany jest z kapsuły zawierającej baterię i wysyłającej sygnał do odbiornika oraz z kaniuli zakończonej membraną czułą na zmiany ciśnienia. Kaniulę zakończoną membraną wszczepiano do aorty szczura po wprowadzeniu go w krótkotrwałe uśpienie barbituranowe (Pentobarbital sodu, pochodna kwasu barbiturowego, Biowet, Puławy, dawka 50 mg/kg, podana dootrzewnowo). Okolice ciała nacinane podczas zabiegu chirurgicznego uprzednio golono i dezynfekowano (Octenisept, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Niemcy). Tak przygotowanego szczura umieszczano w jałowym polu operacyjnym. W celu wprowadzenia kaniuli do aorty wykonywano cięcie środkowe brzucha, wzdłuż „linii białej” odsłaniając aortę. Następnie zakładano na nią dwa zaciski: jeden poniżej lewej tętnicy nerkowej, drugi powyżej rozgałęzienia aorty na tętnice biodrowe. Aortę nakłuwno pomiędzy zaciskami i wprowadzano do jej światła koniec kaniuli nadajnika telemetrycznego, następnie przyklejano do aorty klejem tkankowym Histoacryl® (B. Braun, Rubí, Hiszpania). W kolejnym kroku zdejmowano zaciski (zamknięcie przepływu ograniczone było do ok. 4 minut) a kapsułę sondy przyszywano do mięśni brzucha. Ranę zamykano za pomocą szwów pojedynczych. Na zakończenie podawano podskórną dawkę środków przeciwbólowych (Metacam, 0,4 mg/kg) i przeciwzapalnych (Baytril 10 mg/kg). Każdorazowe przygotowanie nadajnika do wszczepienia obejmuje: (i) wymianę żelu nad membraną pomiarową, (ii) offset (wyznaczenie punktu zero dla nadajnika niewszczepionego), (iii) sterylizację i

odbiałczanie roztworem 2% aldehydu glutarowego (CIDEX, Johnson&Johnson). Podczas całego doświadczenia monitorowano odruch rogówkowy oraz sztywność ogona i w razie potrzeby dodawano odpowiednią objętość środka znieczulającego.

#### *Pomiar ciśnienia tętniczego krwi*

Szczury umieszczano w klatkach pojedynczo. Pierwszy pomiar ciśnienia przeprowadzano po siedmiodniowym okresie rekonwalescencji. W zależności od wieku szczurów stosowano dwa modele nadajników, różniące się rozmiarami kapsuły: u szczurów w wieku 5 tygodni stosowano model PA-C10, a u szczurów w wieku 15 tygodni model PA-C40. Modele te pozwalają na rejestrację ciśnienia tętniczego krwi (skurczowego, rozkurczowego, średniego), częstości skurczów serca (*Heart Rate*, HR) i temperatury.

W trakcie całego okresu badań zwierzęta przetrzymywane były w klatkach hodowlanych w systemie oświetlenia dzień: noc = 12:12, ze stałym dostępem do pożywienia i wody. Pod klatką znajdował się odbiornik sygnału nadajnika. Celem uniknięcia zbierania przez odbiornik sygnału z dwóch różnych nadajników klatki szczurów umieszczone były na metalowym regale, tłumiącym fale radiowe, w odległości co najmniej 50 cm od siebie. Zapis ciśnienia tętniczego był automatycznie weryfikowany o zmiany ciśnienia w pomieszczeniu za pomocą dodatkowego aparatu APR (Ambient Pressure Recorder), wpiętego do macierzy zbierającej dane z pomiarów. Dane rejestrowane były za pomocą oprogramowania Dataquest A.R.T. 4.36 w sposób ciągły i zapisywane jako średnia z 10 s pomiaru. Zebrane w ten sposób dane eksportowane były z oprogramowania Dataquest ART 4.36 do programu Excel w formie 10-minutowych interwałów.

W czasie doświadczenia chronicznego pomiar ciśnienia tętniczego krwi wykonywano w trzech punktach czasowych. Dobową rejestrację ciśnienia tętniczego krwi rozpoczynano zawsze w dniu poprzedzającym obserwację w klatce bytowej i metabolicznej: tj. przed dniem 0, 7-mym i 14-tym i kontynuowano przez kolejne 24 h te same obserwacje.

#### **Dożylna podanie badanych związków**

##### *Przygotowanie chirurgiczne zwierząt*

Przeprowadzano zabiegi chirurgicznie (z zastosowaniem tego samego rodzaju i dawki narkozy, a także tych samych środków przeciwzapalnych i przeciwbólowych po

wykonanych zabiegach jak w przypadku wszczepienia sond telemetrycznych) umożliwiające dostęp do żyły i tętnicy udowej u zwierząt czuwających w fazie przewlekłej doświadczenia. W tym celu do udowej żyły i tętnicy szczura wprowadzano kaniule (Micro-Renathane Tubing, MRE-033 o średnicy: zewnętrznej 0,84 mm i wewnętrznej 0,36 mm; w przypadku szczurów 5-tygodniowych do zakaniulowania tętnicy udowej zastosowano kaniule MRE-025 o średnicy: zewnętrznej 0,64 mm i wewnętrznej 0,30 mm, Bioseb, Canada, USA) których drugi koniec przeprowadzano pod skórą wzdłuż kręgosłupa i wyprowadzano na kark. Usytuowanie takie umożliwiło dożylnie podawanie leku w sposób przewlekły oraz pobieranie próbek krwi tętniczej. Po takim przygotowaniu chirurgicznym i okresie rekonwalescencji rozpoczynano właściwe doświadczenie.

#### *Schemat podawania substancji*

Zwierzętom, które w dniu rozpoczęcia doświadczenia osiągały wiek 16-tygodni (SHR-16) podawano dożylnie (raz dziennie przez 14 dni) w objętości 1 ml odpowiednio: chymostatynę (CH – 2 mg/kg), jej rozpuszczalnik DMSO (0,05 % dimethyl sulfoxide), sól fizjologiczną (S) lub peptydy pochodzące z nasion rzepaku: RIY nazywany także rapakininą (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg) lub VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg) rozpuszczone w 1 ml 0,9% roztworu soli fizjologicznej. W przypadku szczurów 6-tygodniowych doświadczenia przeprowadzano w takim samym układzie badanych związków i dawek, ale podawane objętości wynosiły 0,5 ml.

Hamujące działanie badanych peptydów na aktywność chymazy potwierdzono w doświadczeniach *in vitro*, natomiast wyboru dawek zastosowanych w doświadczeniach *in vivo* dokonano na podstawie piśmiennictwa, pokazującego ich działanie hipotensyjne po jednorazowym podaniu dożołądkowym [53][71][54].

#### **Dożołądkowe podanie badanych związków**

Szczurom otrzymującym dożołądkowo badane związki na tydzień przed rozpoczęciem eksperymentu do aorty wprowadzano sondę telemetryczną umożliwiającą rejestrację parametrów ciśnienia krwi tętniczej (według opisanej wcześniej procedury). Zwierzętom wchodzącym w doświadczenie w wieku 6-tygodni (SHR-6) i 16-tygodni (SHR-16) podawano za pomocą odpowiedniej sondy dożołądkowej (raz dziennie przez 14 dni) odpowiednio w objętości 0,5 ml i 1 ml pochodzące z nasion rzepaku peptydy:

RIY (7,5 mg/kg) lub VWIS (12,5 mg/kg) rozpuszczone w 1 ml soli fizjologicznej; grupa kontrolna otrzymywała sam rozpuszczalnik (0,9% sól fizjologiczna). W celu podania badanego związku, szczura chwymano i płynnym ruchem wprowadzano sondę dożołądkową (Dosing Cannula, 75 mm x 16 ga, PY8 34-0316, Harvard Apparatus, Holliston, USA) przez jamę ustną i umieszczano jej koniec w żołądku zwierzęcia.

### **2.3.1. Obserwacje w klatkach metabolicznych**

Przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia zwierzęta przyzwyczajano do przebywania w klatkach metabolicznych. W celu zbadania parametrów metabolicznych szczury przebywały przez 24 godziny w klatce metabolicznej ze swobodnym dostępem do paszy i wody; do odpowiednich naczynek zbierano próbki kału i moczu. Próbki moczu przeznaczone do dalszej analizy zbierano przez 6 godzin w temperaturze 2-8 °C. Pomiar ciśnienia tętniczego krwi, masy ciała oraz obserwacje w klatkach metabolicznych prowadzono w dniu 0 (infuzja soli fizjologicznej), dniu 7 i 14 podawania badanej substancji (w grupach doświadczalnych) lub rozpuszczalnika (w grupach kontrolnych). Dodatkowo pobierano próbki krwi do oznaczeń.

W pomieszczeniu, w którym przebywały zwierzęta w czasie doświadczeń, również w trakcie obserwacji w klatkach metabolicznych zapewniono odpowiednie warunki: sztuczna doba świetlna oraz stała temperatura i wilgotność powietrza. Klatki metaboliczne są wykonane z przezroczystego poliwęglanu, co zapewnia przebywającym w nich zwierzętom kontakt wzrokowy z innymi zwierzętami włączonymi w badania.

Bezpośrednio po podaniu zarówno dożylnym jak i dożołądkowym, raz w tygodniu zwierzęta ważono i umieszczano w klatkach metabolicznych.

### **2.3.2. Obrazowanie nerki metodą rezonansu magnetycznego.**

Na 4-5 dni przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzętom, u których wykonywano obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego wykonano konieczne zabiegi chirurgiczne. W tym celu wprowadzono kaniule do tętnicy i żyły udowej, umożliwiające odpowiednio pobieranie próbek krwi w trakcie doświadczenia chronicznego oraz podawanie badanych substancji, a w tym także podanie kontrastu.

Wykorzystywane kaniule opisano już wcześniej, w części dotyczącej przygotowania chirurgicznego do doświadczeń chronicznych.

W celu wykonania obrazowania zwierzęta umieszczano w pozycji leżącej na specjalnym uchwycie-łóżeczku umożliwiającym właściwe ułożenie szczura, utrzymanie odpowiedniej temperatury ciała, a także utrzymanie zwierzęcia w narkozie wziewnej (izofluran 4% indukcja, 2-1,5% podtrzymanie w mieszaninie z O<sub>2</sub>). Kolejnym krokiem było umieszczenie cewki odbiorczej bezpośrednio nad badaną nerką szczura; cylindryczna cewka o częstotliwości radiowej (wewnętrzna średnica 8,6 cm) przeznaczona jest tylko do odbioru matrycowej cewki powierzchniowej (2 x 2 elementy). Tak przygotowane zwierzę umieszczano w izo-centrum skanera (Bruker Biospec 70/30, Avance III spectrometer, 120-mm diameter bore, 660 mT/m gradient strength insert, Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Germany). Do zlokalizowania nerki zastosowano skan strukturalny o wysokiej rozdzielczości T2, wykorzystując 20 centralnie umieszczonych cięć. Następnie użyto sekwencji do dynamicznego pozyskiwania danych z macierzy 64x64, TR - czas repetycji (ang. *Repetition Time*), TE - czas echa (ang. *Echo Time*) po podaniu kontrastu w infuzji dożylniej. Skany EPI - obrazowanie z wykorzystaniem sekwencji echa planarnego (ang. *Echo Planar Imaging*) były bramkowane sygnałem z oddychania. Szybkość oddychania utrzymywano na poziomie 60-80 oddechów na minutę. Kontrast podawano dożylnie w objętości 0,1 ml (Magnevist 469 mg/ml, Bayer; 0,04 ml/kg w 10-krotnym rozcieńczeniu) następnie podawano bolus 0,3 ml 0,9% roztworu soli fizjologicznej (układ taki został wcześniej ustalony na podstawie badań pilotażowych dla uzyskania wyraźnego obrazu). We wstępnym przetwarzaniu danych uzyskane obrazy przekształcano z formatu obrazu Bruker na NIFTI - format danych NIFTI (ang. *Neuroimaging Informatics Technology Initiative*). Analizy przeprowadzano dla pojedynczo wybranego „plastra nerki” w zestawie narzędziowym DOM-Build MATLAB.

W tym celu manualnie wybierano wycinek ROI - region zainteresowania dla trzech obszarów nerki (ang. *Region of Interests*), w których podjęto próbę określenia tempa perfuzji nerki. Zakreślano obszar kory nerki, a także rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego nerki. Dalej obliczanie funkcji wejściowej kontrastu Gadolin (Gd; łac. *Gadolinum*) ze średniego sygnału we wszystkich woksela w ROI 1 – kora nerki. Program liczy za pomocą znalezienia opóźnienia dla każdego woksela w obrazie.

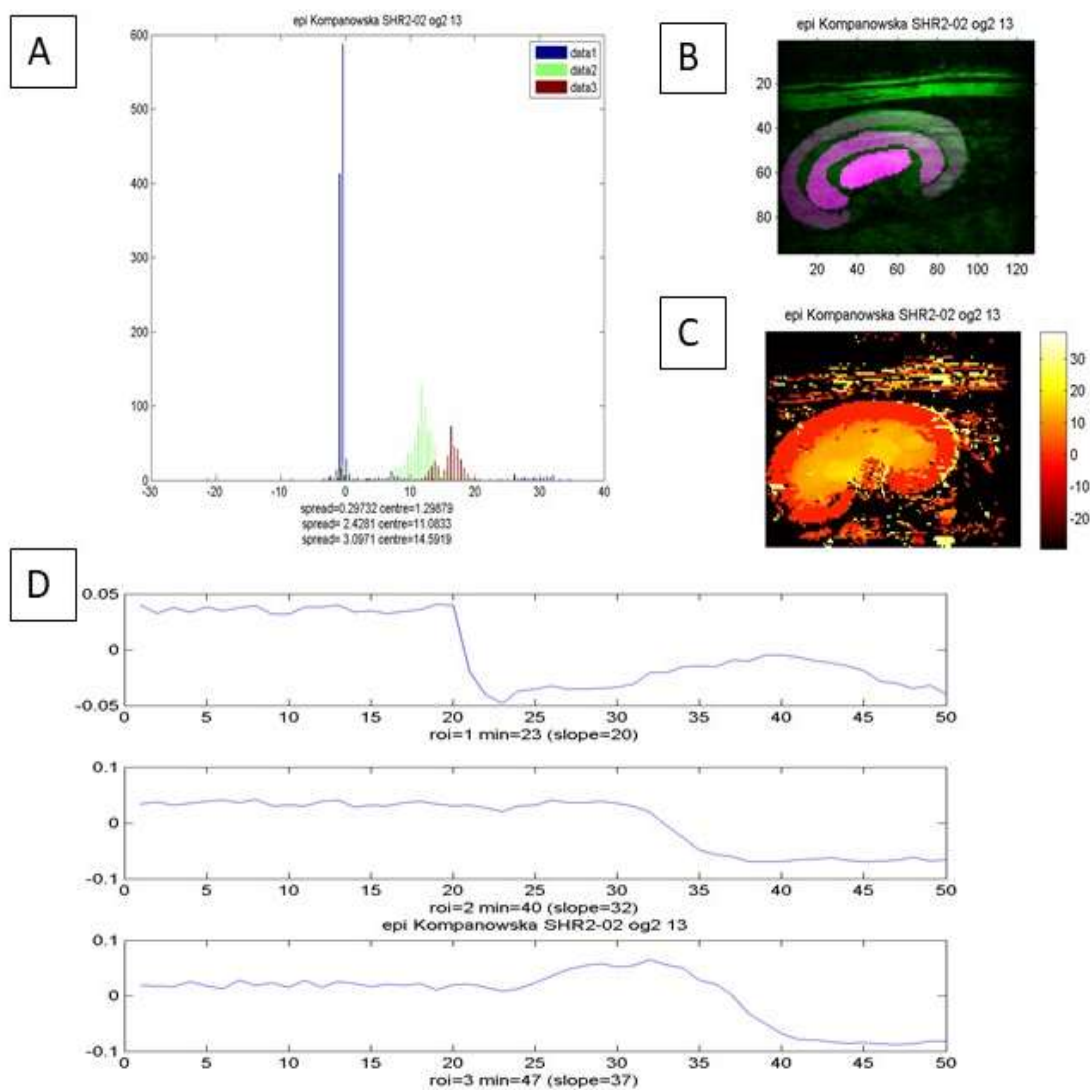


Opóźnienie zdefiniowano jako pozycję maksimum dla funkcji korelacji krzyżowej (kora nerki) i przebiegu czasowego woksela. Wyjście funkcji korelacji zostało interpolowane do TR/10 dla lepszej rozdzielczości czasowej. Dalsze analizy dynamiczne oparto na opóźnieniach w obszarze ROI i wykonano na tej podstawie obliczenia parametru. Obrazy opóźnienia w czasie przebywania w danej strefie podanego kontrastu (Ryc.3 ) zostały sprawdzone wizualnie, aby uniknąć artefaktów MR. Następnie wykreślono sygnał z każdego zwrotu z inwestycji, aby sprawdzić dynamikę sygnału. Na podstawie map opóźnień wyrysowane zostały histogramy w obszarze ROI, a także zdefiniowane zostały parametry takie jak (Ryc.3):

- centre - średni czas opóźnienia w ROI,
- spread - odstęp międzykwartyłowy między wartościami opóźnienia.

Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego wykonywano trzykrotnie w całym cyklu. W dniu zerowym, w którym szczury otrzymywały w infuzji dożylniej 0,9% roztwór soli fizjologicznej (dzień 0), następnie po 7 i 14 dniach podawania badanych związków.

Parametrem opisującym czas przebywania kontrastu w danej warstwie jest spread mierzony w sekundach [s]. Wartość spread jest proporcjonalna do przedziału czasu, w jakim kontrast znajduje się w danej warstwie i jest ona odwrotnie proporcjonalna do tempa perfuzji.



Ryc. 3 Przykładowy histogram (A) opóźnienia przepływu środka kontrastowego (C) przez trzy manualnie wybrane obszary (B): - kory, rdzenia zewnętrznego i rdzenia wewnętrznego. Wartości „spread” i „centre” to odpowiednio IQR i średnia z rozkładu opóźnienia wybranych wokseli względem średniego sygnału z kory nerki. Uśredniona wartość sygnału w wybranych obszarach (D) w czasie [s]. „Slope” - moment największej zmiany sygnału w czasie rozpoczęcia skanowania.

## 2.4. Doświadczenia ostre

### *Przygotowanie chirurgiczne*

Po przeprowadzeniu doświadczenia chronicznego wykonywano doświadczenia ostre. W tym celu szczury usypiano podając dootrzewnowo tiopental sodu (100 mg/kg i.p.; Thiopental sodium, Biochemie GmbH, Wiedeń, Austria) pozwalający na prowadzenie doświadczeń ostrych w pełnym ogólnoustrojowym znieczuleniu. Zastosowana narkoza prowadzi do utraty świadomości, a także unieruchomienia (rozluźnienie mięśni oraz obniżenie przewodnictwa nerwowego). W trakcie prowadzonej obserwacji kontrolowano odruch rogówkowy oraz napięcie mięśni i sztywność ogona w celu weryfikacji prawidłowego uśpienia zwierzęcia.

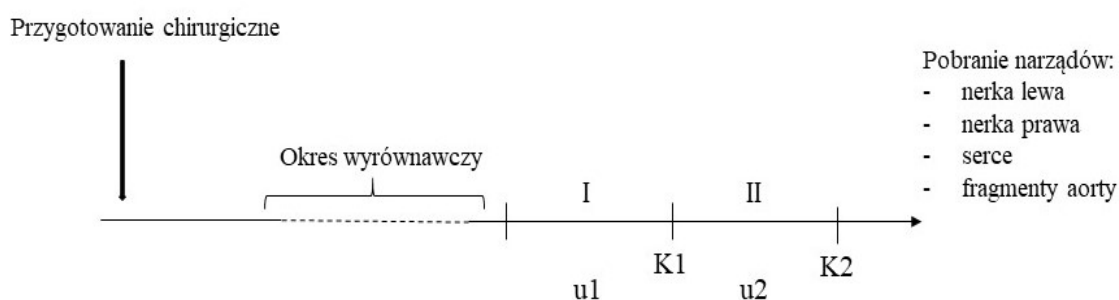
Podczas doświadczenia w narkozie utrzymywano stałą temperaturę ciała szczura na poziomie 37°C przy użyciu automatycznego systemu grzewczego (Fine Science Tools TR-200 21052-00, Animal Temperature Controller, Biodirect Inc, Taunton, Ma, USA). W pierwszym etapie przygotowania chirurgicznego wykonywano tracheotomię, tj. w tchawicy szczura umieszczano rurkę polietylenową pozwalającą na swobodną wentylację płuc. W przypadku szczurów otrzymujących przewlekle drogą dożylną badane związki wykorzystano kaniule uprzednio włożone do naczyń, tj. przed rozpoczęciem części chronicznej doświadczenia (patrz str. 40). W grupach szczurów otrzymujących badane związki drogą dożołądkową wykonano zabiegi chirurgiczne polegające na wprowadzeniu kaniuli do żyły szyjnej szczura, umożliwiającej dożylnie podawanie roztworów podczas doświadczenia w narkozie. W trakcie dalszych zabiegów chirurgicznych podawano w infuzji dożylniej 3% roztwór albuminy bydlęcej (albumina, frakcja V, AppliChem GmbH, Darmstadt, Niemcy) w płynie Ringera (10 ml/kg/h, Baxter Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska).

### *Przebieg właściwego doświadczenia*

Po zakończeniu przygotowania chirurgicznego infuzję albuminy zastępowano infuzją 3% roztworu inuliny (podawanej w tempie 10 ml/kg/h przez 10 min) rozpuszczonej w izotonicznym roztworze soli fizjologicznej (Fresenius Kabi Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska) w celu oznaczenia tempa przesączania kłębuszkowego (GFR, ang. *Glomerular Filtration Rate*). Po podaniu dawki wstępnej (bolusa) 3% inuliny do końca doświadczenia podawano 1,5% roztwór inuliny dla podtrzymania jej stałego poziomu w osoczu. Po okresie stabilizacji przeprowadzano dwa okresy

eksperymentalne (2 x 30 min) w czasie których zbierano próbki moczu i pobierano próbki krwi a także monitorowano wymienione poniżej parametry czynnościowe. Obliczano diurezę minutową (objętość wydalanego moczu w czasie 1 min), mierzono stężenie i wydalanie sodu i potasu ( $U_{Na}$ ,  $U_K$ ,  $U_{NaV}$ ,  $U_{KV}$ ) a także wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osmV}$ ).

W trakcie doświadczenia zaobserwowano wpływ podawanych w fazie przewlekłej substancji (inhibitorów i rozpuszczalników) na czynność serca, nerek, przepływ i opór naczyniowy wybranych obszarów krążenia. Mierzono przepływ krwi przez trzy strefy nerki: korę CBF (*cortical blood flow*), rdzeń zewnętrzny OMBF (*outer medullary BF*), rdzeń wewnętrzny IMBF (*inner medullary BF*), za pomocą sond laser-Doppler (system Periflux 4001, Perimed AB, Jarfalla, Szwecja) i wyrażono go w umownych jednostkach PU (Perfusion Unit). Przed wykonaniem kolejnej serii doświadczeń sondy kalibrowano płynem kalibracyjnym (sygnał pomiarowy swobodnych ruchów Browna = 250 PU) co umożliwiało porównywanie pomiarów pomiędzy różnymi doświadczeniami/zwierzętami. Położenie sond weryfikowano po zakończeniu doświadczenia wykonując cięcie podłużne nerki. Przepływ krwi przez tętnicę nerkową oraz przepływ lokalny przez tętnicę biodrową mierzono nieinwazyjnym czujnikiem ultradźwiękowym połączonym z przepływomierzem (model T106, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA).



Ryc. 4 Schemat przebiegu doświadczenia ostrego. K1, K2 – punkty pobrania próbek krwi; u1, u2 – okres zbiórki moczu.

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

Nerkę rozcinano wzdłuż na dwie połowy. Jedną z nich, przeznaczoną do wykonania preparatów mikroskopowych utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA; Eurochem BGD Sp. z o. o., Tarnów, Polska), natomiast drugą połowę, przeznaczoną do oznaczenia stężenia Ang II mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp.  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pobierano także próbki krwi przeznaczone do oznaczeń jonów sodu, potasu i substancji osmotycznie czynnych, które odwirowywano (2800 g, 10 min). Pozostałą objętość próbek osocza zamrażano w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oraz  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Część krwi przeznaczoną do oznaczenia stężenia Ang II pobierano na koktajl inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich), następnie odwirowano (2800 g, 10 min), utrwalano w ciekłym azocie i przechowywano w temp.  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5. Analiza próbek moczu, osocza i tkanek**

Po określeniu objętości moczu metodą gravimetryczną (zakładając gęstość moczu równą gęstości wody) próbkę wirowano (960 g, 5 min). Krew wirowano (2800 g, 10 min), a osocze przenoszono do nowej probówki. Zawartość substancji osmotycznie czynnych w zebranych próbkach moczu i osocza oznaczano za pomocą osmometru; na podstawie pomiaru obniżenia punktu zamarzania próbki względem wody (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Niemcy). Mierzono stężenie sodu i potasu w osoczu ( $P_{\text{Na}}$ ,  $P_{\text{K}}$ ) oraz w moczu ( $U_{\text{Na}}$ ,  $U_{\text{K}}$ ) przy użyciu fotometru płomieniowego (model PFP7, Jenway, Essex, UK). Pozostałą objętość próbek przechowywano w  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  w celu późniejszego wykorzystania do dalszych oznaczeń biochemicznych.

### **2.5.1. Pomiar tempa przesączania kłębuszkowego**

Na podstawie klirensu inuliny obliczano tempo przesączania kłębuszkowego (GFR). Inulina swobodnie przesącza się w nerkach, nie ulega reabsorpcji ani sekrecji w kanalikach nerkowych, dlatego cały przesączony ładunek inuliny wydziela się do moczu; metoda ta uważana jest za złoty standard w tej dziedzinie [72], [73]. W trakcie doświadczenia ostrego szczury otrzymywały infuzję 1,5% roztworu inuliny (zapewniający stałe jej stężenie we krwi). Zebrane i odpowiednio rozcieńczone próbki osocza i moczu poddawano inkubacji (1 h,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) z roztworem enzymów (1000 U/ml

katalazy i 100 U/ml oksydazy glukozowej) w celu usunięcia endogennej glukozy. Następnie dodawano 50 mM kwasu indolilo-3-octowego (150  $\mu$ l) i 38% kwasu solnego (3 ml) oraz ponownie inkubowano (20 min, 60 °C). Po schłodzeniu próbki nakładano na płytkę 96-dółkową, a następnie dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego (długość fali 490 nm, FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Niemcy). Znając stężenie inuliny w moczu ( $U_{in}$ ) i w osoczu ( $P_{in}$ ), a także mierzoną w trakcie doświadczenia diurezę ( $V$ ) określano wykorzystując wzór ogólny na klirens nerkowy GFR:

$$GFR = \frac{U_{in} \cdot V}{P_{in}}$$

### 2.5.2. Ocena histologiczna nerki

Po zakończeniu eksperymentu ostrego pobierano i utrwalano przez co najmniej tydzień połowę nerki oraz fragment aorty w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA; Eurochem BGD Sp. z o. o., Tarnów, Polska). Prawą nerkę wycinano, ważono, rozcinano wzdłuż i utrwalano w celu późniejszego wykorzystania do sporządzenia preparatów mikroskopowych: jedną połowę nerki utrwalano w 4% (PFA), drugą mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80 °C. Przygotowując nerki do wykonania skrawków, najpierw je odwadniano, a następnie zalewano parafiną. Nerkę zamkniętą w bloczku cięto na skrawki o grubości 5  $\mu$ m, które suszono w 56 °C. Przed barwieniem ze skrawków usuwano parafinę, a następnie je uwadniano. Na tak przygotowanych skrawkach wykonano barwienie hematoksyliną-eozyną (HE) oraz barwienie metodą van Giesona.

Przygotowanie preparatów histologicznych a także ich analizę wykonano w Zakładzie Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej we współpracy z zespołem pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Ewa Matyi (do 2017 była to ścisła współpraca z panią prof. dr hab. n. med. Janiną Rafałowską).

### 2.5.3. Oznaczenia biochemiczne próbek moczu, osocza i tkanek

W zgromadzonych próbkach moczu i osocza oznaczano stężenia biomarkerów wykorzystując testy enzymatyczne ELISA według instrukcji załączonych przez producentów. Oznaczono stężenie pochodnych metabolizmu tlenku azotu (NO) w moczu, wydalanie albuminy (UAE), VEGF-A, stężenie Ang II w tkankach (serce, aorta, nerka) oraz 8-iso-PG (8-isoprostaglandyna) w osoczu.

#### **Przygotowanie materiału biologicznego do oznaczenia stężenia Ang II w zgromadzonym materiale biologicznym.**

W pobranym po zakończeniu doświadczenia ostrego materiale (w tkankach oraz osoczu) wykonano oznaczenie poziomu angiotensyny II. Do oznaczenia wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją (nr kat. EK-002-12, EIA Kit Human, Rat, Mouse, Canine, Phoenix Pharmaceuticals, INC.). Przygotowanie materiału biologicznego oraz oznaczenie wykonano w Zakładzie Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie we współpracy z zespołem kierowanym przez dr hab. n. med. Wojciecha Bika.

#### *Homogenizacja tkanek, przygotowanie próbek do oznaczenia.*

Tkanki gotowano w 0,1 M kwasie octowym w 100 °C przez 20 min w celu unieczynnienia enzymów tkankowych. Serce i nerkę gotowano w objętości 0,75 ml roztworu kwasu octowego natomiast w przypadku aorty zastosowano mniejszą objętość kwasu tj. 0,2 ml. Tkanki gotowano w probówkach o objętości 2 ml, zabezpieczonych parafilmem, które następnie przenoszono na lód. Następnie ugotowaną tkankę wraz z całą zawartością próbki przenoszono do szklanego homogenizatora, w którym mechanicznie homogenizowano tkanki na lodzie. Homogenaty wirowano przez 15 min w temperaturze 4 °C (1200 g). Uzyskany supernatant oczyszczano na kolumnach ekstrakcyjnych SPE (ang. *solid phase extraction*).

Przed wykonaniem testu ELISA przeprowadzano procedurę oczyszczania osocza na kolumnach ekstrakcyjnych (nr kat. 7020, Bond Elut-PH, Baberbond spe Oktadecyl (C18); 3 ml, 200 mg) z wykorzystaniem techniki SPE. Ekstrakcja na kolumnach SPE polega na przepuszczeniu ciekłej próbki przez złożę sorbentu i adsorpcji oznaczonych związków na złożu. Sorbentem wypełniającym kolumnę jest złożę krzemionkowe.

Po takim oczyszczeniu próbek osocza, rozcieńczano je w stosunku 1:1 z buforem ekstrakcyjnym A (nr kat. RK-BA-1, 1% kwas trifluoroctowy, TFA), homogenaty tkanek rozcieńczano w buforze A w stosunku 1:3. Tak przygotowane próbki wirowano przez 20 min w temp. 4 °C (1200 g). Uzyskany w ten sposób supernatant przenoszono na kolumny ekstrakcyjne aktywowane 1 ml buforu ekstrakcyjnego B (nr kat. RK-BB-1, 60% acetonitryl w 1% TFA), które następnie przemywano jeszcze trzykrotnie buforem A w objętości 3 ml. Po nałożeniu na złoża ekstrakcyjne próbek (supernatantu), kolumny ekstrakcyjne ponownie przemywano buforem A (dwukrotnie, w objętości 3 ml). Ostatnim etapem było wymycie Ang II (oznaczanego peptydu) ze złoża poprzez dodanie na kolumny 3 ml buforu B. Pod wpływem buforu B odzyskiwano Ang II ze złoża kolumn do probówek; następnie roztwór buforu B z Ang II poddano odparowywaniu azotem technicznym (6.5 M3, Nord Gaz s.c, Warszawa, Polska) i zamrażano w -80 °C aż do wykonania testu ELISA.

## **2.6. Analiza statystyczna**

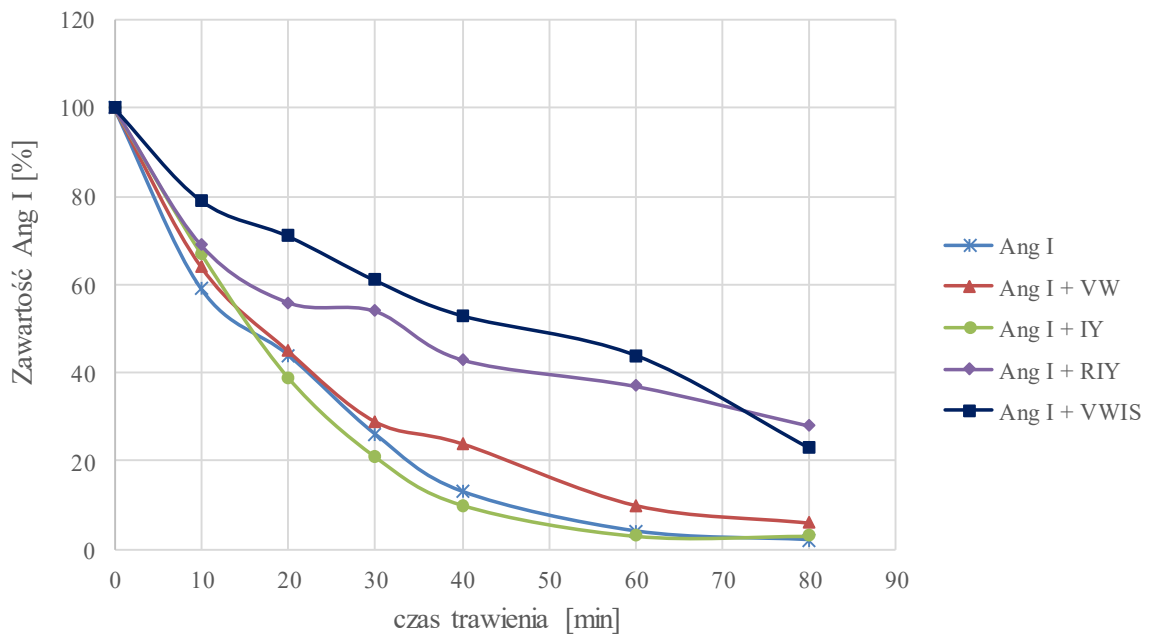
W tekście, tabelach i na rycinach przedstawiono wartości średnie oraz błąd standardowy średniej (SEM) jako miarę rozrzutu danych. Do oceny statystycznej różnic między grupami stosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z powtarzalnymi pomiarami, a następnie test post-hoc Newmana-Keulsa. Do porównania wartości dla indywidualnych punktów w czasie oraz dwutygodniowych zmian w wartościach badanych parametrów stosowano jednoczynnikową analizę ANOVA i ponownie test post-hoc Newmana-Keulsa. Zmianę uznawano za istotną przy  $p < 0,05$ . Obliczenia wykonano w programie STATISTICA (wersja 10.0, StatSoft Inc.).



### 3. Wyniki

#### 3.1. Wpływ peptydów na aktywność chymazy

Uzyskane wyniki wskazały, że dwa z czterech badanych peptydów charakteryzowały się zdolnością do hamowania przekształcenia Ang I do Ang II za pośrednictwem chymazy. Dwa z czterech peptydów wykorzystano w badaniach chronicznych na szczurach SHR w dwóch fazach rozwoju nadciśnienia z zastosowaniem dwóch dróg podawania związków: dożylnie i dożołądkowo (Ryc 5).



Ryc. 5 Aktywność hamująca peptydów w układzie *in vitro*. Stopień degradacji angiotensyny I (w funkcji czasu) w obecności samej chymazy lub z dodatkiem badanych peptydów. Ilość pozostałej po degradacji angiotensyny I określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami.

### 3.2. Doświadczenia chroniczne

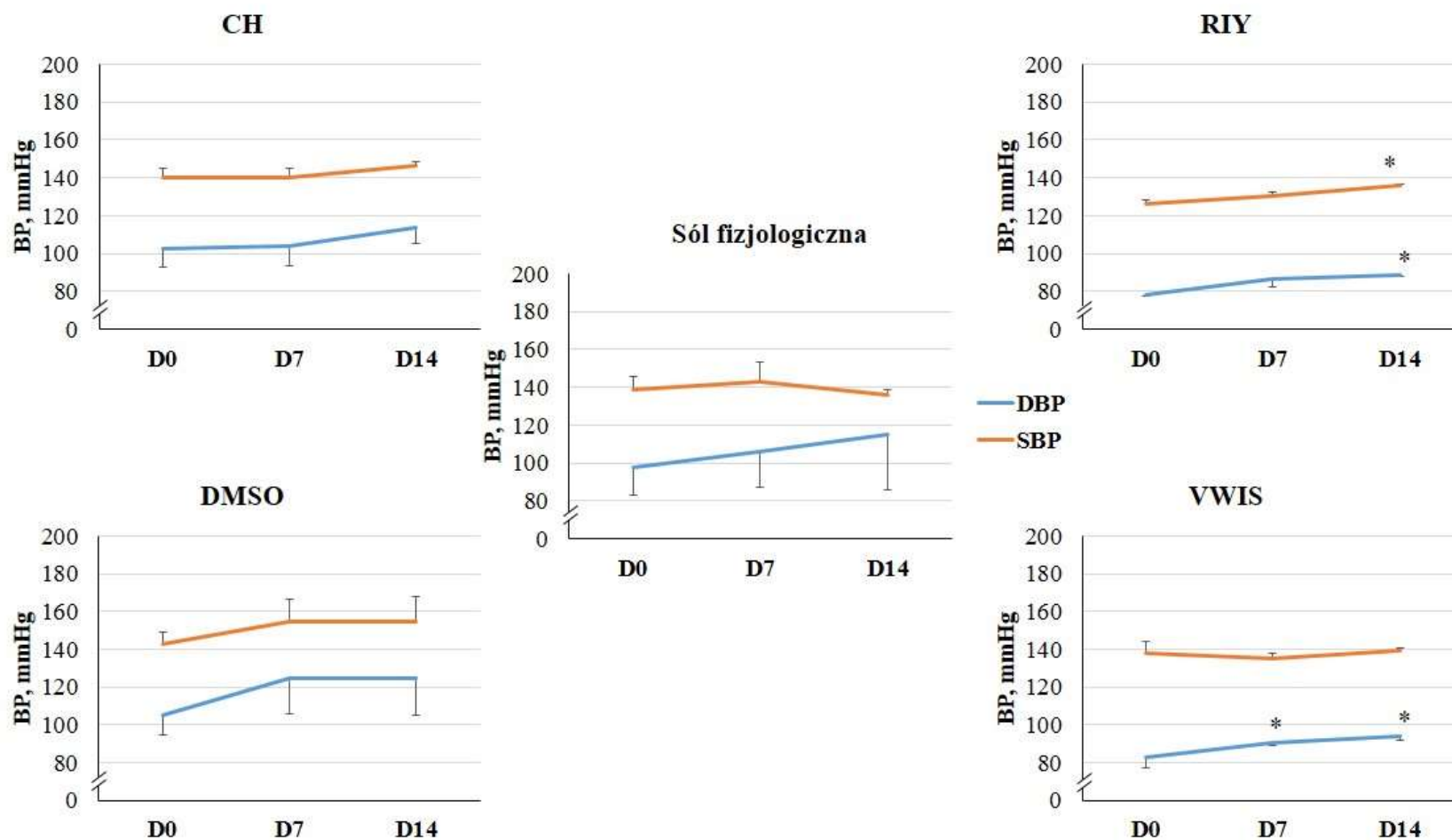
W trakcie dwutygodniowego doświadczenia w żadnej z grup nie zaobserwowano odbiegających od normy oznak dotyczących zdrowia zwierząt, tj. wyglądu, stanu sierści, aktywności, zachowań pielęgnacyjnych czy socjalnych, nie zaobserwowano żadnego wpływu zabiegów chirurgicznych (implantacja sondy telemetrycznej, czy kaniul) oraz badanych substancji na dojrzewanie, wzrost oraz kondycję fizyczną zwierząt.

#### 3.2.1. Wpływ badanych substancji na ciśnienie krwi tętniczej i częstość skurczów serca

Na Ryc. 6 zilustrowano zmiany skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi u młodych (6-tygodniowych) SHR-ów pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni.

Badane substancje osłabiały nieco dynamikę wzrostu ciśnienia rozkurczowego u zwierząt, zwłaszcza po podaniu peptydów, choć to właśnie w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY w stosunku do dnia kontrolnego, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ciśnienia SBP i DBP podczas gdy zamiany BP dla soli fizjologicznej nie były istotne.

W grupie szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia zaobserwowano tendencję do obniżania częstości skurczów serca (HR; bpm) po dożylnym podawaniu chymostatyny po 14 dniach podawania w stosunku do dnia 0 i 7 (CH) D0: 377±8; D7: 367±7; D14:339±8 bpm,  $p=0,06$ . Szczury otrzymujące DMSO charakteryzował znamienne statystycznie obniżenie HR po 14 dniach podawania w stosunku do dnia 0: D0: 379±22; D7: 341±31; D14: 329±26 bpm,  $p<0,05$ . Podobnie w grupie szczurów otrzymujących sól fizjologiczną D0: 372±35; D7: 341±28; D14:308±18 bpm,  $p<0,05$ . Szczury otrzymujące dożylnie peptyd RIY również charakteryzował istotny statystycznie spadek HR (Aneks: TABELA I).

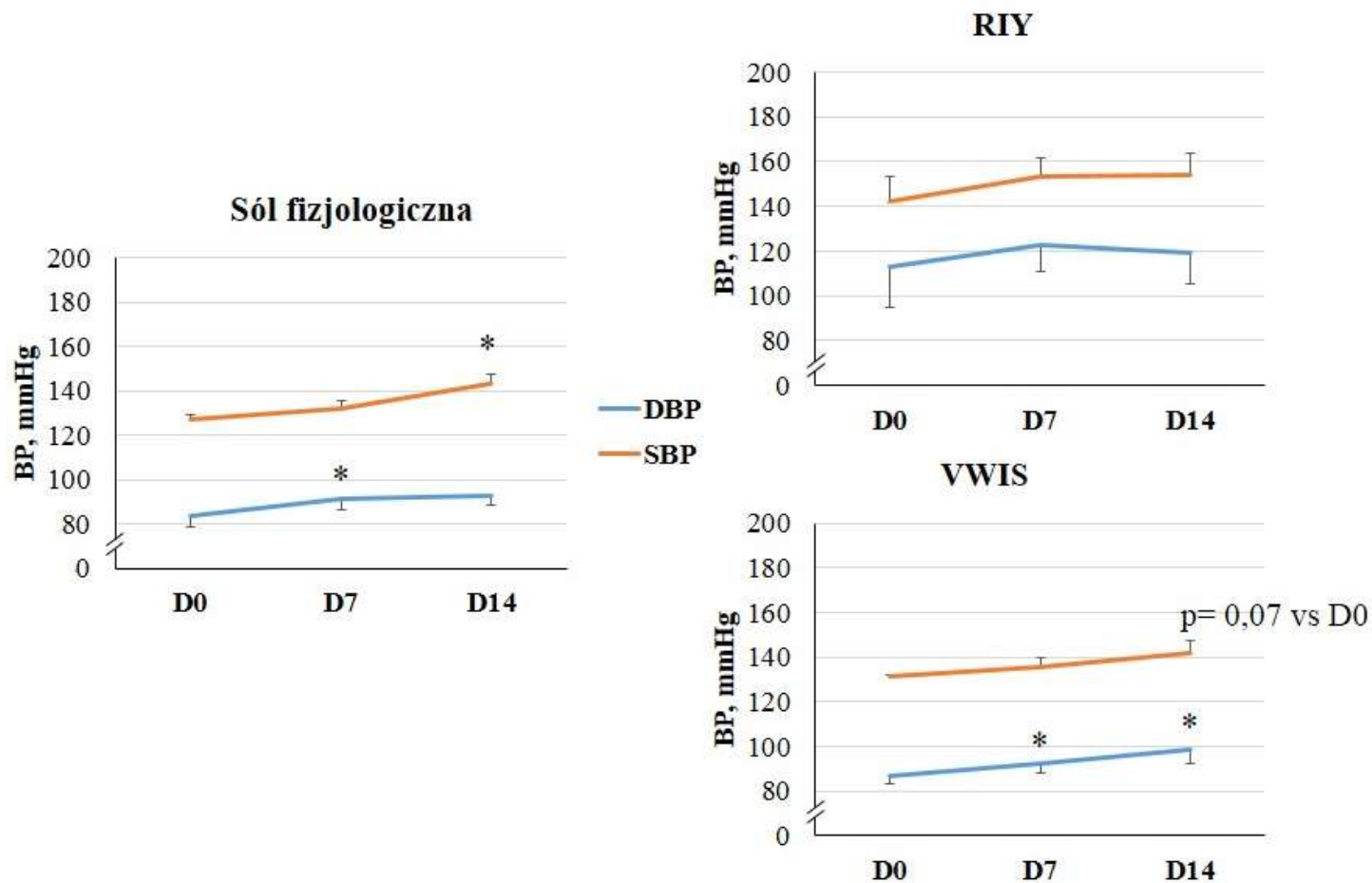


Ryc. 6 Ciśnienie krwi tętniczej w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych, wartość średnia  $\pm$  SEM z godziny przed podaniem dożylnym dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 dniach (D14) traktowania: CH – chymostatyną (2 mg/kg; n=5), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek; n=5), solą fizjologiczną (0,9%; n=5), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=5); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5). DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej; SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej; \* $p < 0,05$  vs D0.

Porównano także średnie z dobowych wartości ciśnienia rozkurczowego i skurczowego krwi tętniczej po dożylnym podaniu badanych związków szczurom będącym we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia. Podobnie jak w opisanej wcześniejszej analizie podstawowej, zaobserwowano wzrost BP (mmHg) we wszystkich grupach zwierząt, zarówno w grupie kontrolnej (S - SBP: D0: 147±4; D7: 147±3; D14: 154±4\*; DBP: D0: 95±3; D7: 102±1\*; D14: 105±2\* mmHg) jak i po podaniu badanych peptydów: RIY (SBP: D0: 142±3; D7: 142±3; D14: 148\*±2; DBP: D0: 93±2; D7: 98±3; D14: 100±2\* mmHg) i VWIS (SBP: D0: 147±1; D7: 147±2; D14: 151±2; DBP: D0: 96±1; D7: 102±1; D14: 104±1\* mmHg; \*p<0,05 vs D0). Wzrost BP (wartość średnia z 24 h) zaobserwowano również po podaniu chymostatyny i jej rozpuszczalnika, ale istotny statystycznie wzrost obserwowano jedynie w przypadku ciśnienia rozkurczowego w grupie szczurów kontrolnych, po 14 dniach podawania (CH - SBP: D0: 148±4; D7: 142±9; D14: 154±5; DBP: D0: 103±1; D7: 99±6; D14: 114±5; DMSO - SBP: D0: 146±3; D7: 152±7; D14: 148±6; DBP: D0: 100±5; D7: 112±9; D14: 110±4\* mmHg; \*p<0,05).

Na Ryc. 7 zilustrowano zmiany skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi u młodych (6-tygodniowych) SHR pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożyłkowo, codziennie przez 14 dni. Szczury otrzymujące sól fizjologiczną charakteryzował statystycznie istotny wzrost ciśnienia tętniczego, natomiast podanie peptydu RIY zapobiegło rozwojowi ciśnienia tętniczego w trakcie chronicznego podawania.

W grupie szczurów będących we wczesnej fazie nadciśnienia zaobserwowano obniżenie częstości skurczów serca (HR) po dożyłkowym podawaniu peptydu VWIS D0: 405±17; D7: 373±14; D14: 355±5\* bpm; \*p<0,05 vs D0. W grupie szczurów otrzymujących rozpuszczalnik (0,9% sól fizjologiczną) uzyskano istotne statystycznie obniżenie HR już po 7 dniach i efekt utrzymał się do końca doświadczenia D0: 375±22; D7: 346±21; D14: 325±18\*# bpm; \*p<0,05 vs D0; #p<0,05 vs D7 (Aneks: TABELA II). Tak więc efekt VWIS był efektem niespecyficznym (Aneks: TABELA II).



Ryc. 7 Ciśnienie krwi tętniczej w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych, wartość średnia  $\pm$  SEM z godziny przed podaniem dożołądkowym dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach traktowania: solą fizjologiczną (0,9%; n=5), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=5); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5). DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej; SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej; \*p<0,05 vs D0.

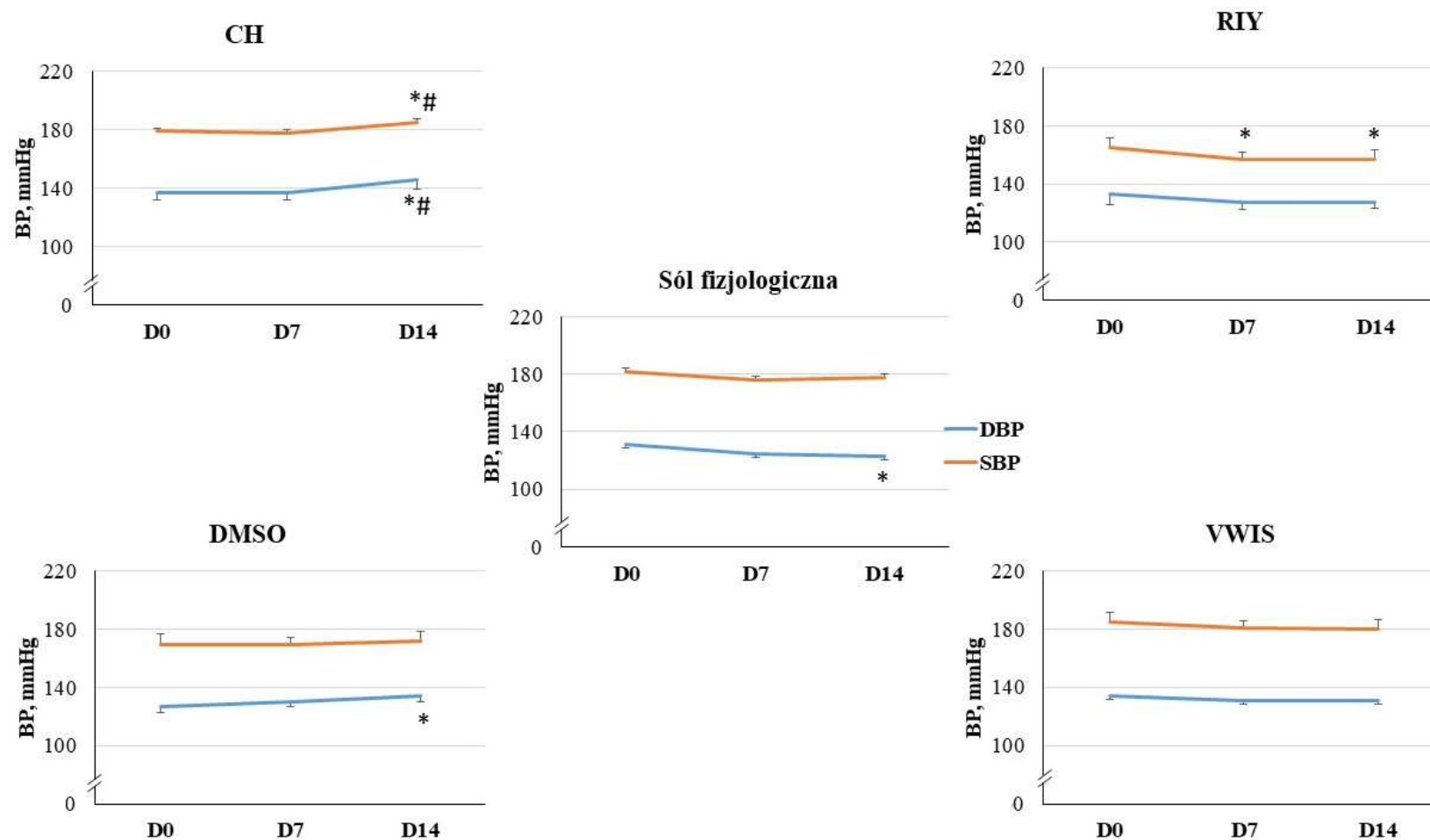
Średnie dobowe ciśnienie krwi tętniczej w grupie szczurów młodych, po dożołądkowym podaniu badanych peptydów, a także w grupie kontrolnej (sól fizjologiczna) wskazały podobnie jak w podstawowej analizie na wzrost BP (S - SBP: D0: 140±2; D7: 146±3; D14: 151±5\*; DBP: D0: 96±3; D7: 105±4\*; D14: 108±3\*; VWIS - SBP: D0: 143±2; D7: 148±3\*; D14: 152±3\*; DBP: D0: 99±2; D7: 106±2\*; D14: 108±2\* mmHg; \*p<0,05). Jedynie w przypadku podania peptydu RIY wzrost ten nie był znamieny statystycznie RIY (SBP: D0: 161±3; D7: 153±3; D14: 164±8; DBP: D0: 112±5; D7: 123±9; D14: 132±10 mmHg; \*p<0,05 vs D0).

Na Ryc. 8 przedstawiono zmiany skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowych) SHR pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. Ze względu na popełniony przez mnie błąd metodyczny na wykresie poniżej przedstawiono wyniki z innego przedziału czasowego tj. opis dobowej średniej wartości ciśnienia krwi tętniczej po podaniu dożylnym. Różnica ta wynika z błędu metodycznego, który wykryto dopiero w trakcie prowadzonych badań, tj. po wykonaniu większości doświadczeń z podawaniem CH i DMSO u szczurów dorosłych. W związku z powyższym nie mamy dostępnych pomiarów telemetrycznych z godziny przed podaniem związku, które w naszej ocenie są pomiarami najmniej zaburzonymi. Po podaniu chymostatyny zaobserwowano istotny wzrost ciśnienia krwi tętniczej w drugim tygodniu jej podawania (SBP: D0: 179±7; D7: 178±7; D14: 185±7\*#; DBP: D0: 137±5; D7: 137±5; D14: 146±7\*# mmHg; \*p<0,05 vs D0; #p<0,05 vs D7). Efektu takiego nie zaobserwowano po podaniu jej rozpuszczalnika DMSO (SBP: D0: 170±7; D7: 169±5; D14: 172±6; DBP: D0: 127±4; D7: 130±3; D14: 134±4 mmHg).

Średnie dobowe SBP było istotnie niższe w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY (SBP: D0: 165±10; D7: 157±8\*; D14: 157±7\* mmHg; \*p<0,05 vs D0), a także niższe choć nieznamiennie, było rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej (DBP: D0: 133±7; D7: 127±5; D14: 128±4 mmHg). W grupie szczurów otrzymujących peptyd VWIS nie zaobserwowano znamienych statystycznie różnic (SBP: D0: 185±8; D7: 181±8; D14: 180±8; DBP: D0: 134±3; D7: 131±3; D14: 131±3 mmHg). Wykonano analizę Anova z wielokrotnymi powtórzeniami dla porównania przebiegu krzywych średnich wartości ciśnienia tętniczego w czasie 6 godzin od podania związku w celu ich porównania pomiędzy badanymi grupami. Uzyskane wyniki wskazały na istotnie statystycznie różny przebieg w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY w

porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych (sól fizjologiczna), ale tylko siódmego dnia podawania ( $F=4,7452$ ;  $p=0,0026$ ; F-wynik wieloczynnikowej analizy wariancji). Po 14 dniach wynik nie był statycznie istotny.

Szczury będące w ustalonej fazie nadciśnienia (SHR 16 tygodniowe) wykazywały jedynie w przypadku dożylnego podawania peptydu RIY wpływ na częstość skurczów serca (dotyczy ciśnienia z ostatniej godziny doby); po 7 dniach obserwowano istotne obniżenie HR: D0:  $360\pm 15$ ; D7:  $327\pm 17^*$ ; D14:  $335\pm 9$  bpm;  $*p<0,05$  vs D0. Po 14 dniach zachowała się tylko tendencja  $p=0,06$  do obniżenia HR (Aneks: TABELA III).

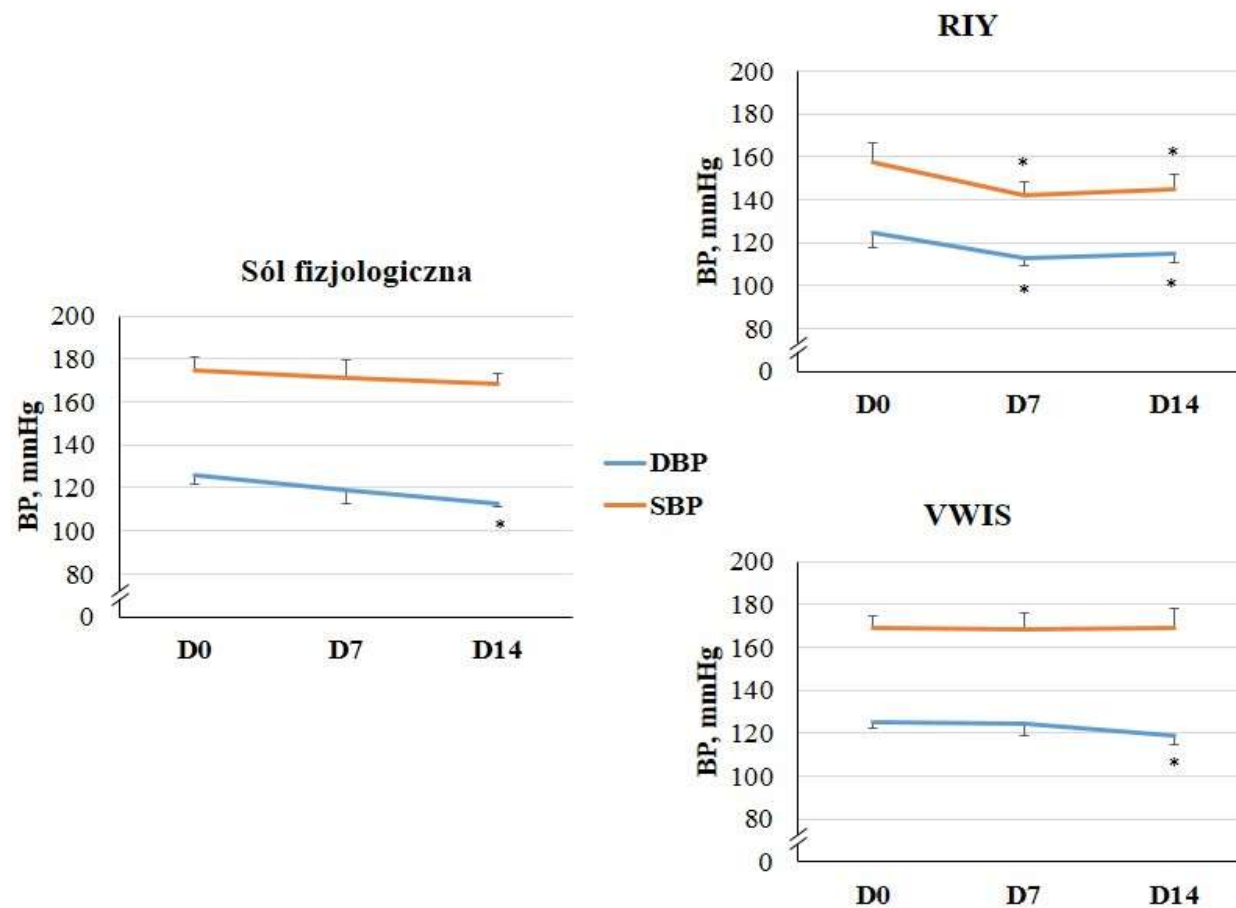


Ryc. 8 Ciśnienie krwi tętniczej w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych, średnia wartość dobowa  $\pm$  SEM po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 dniach (D14): CH – chymostatyny (2 mg/kg; n=8), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek; n=5), soli fizjologicznej (0,9%; n=5), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=5); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5mg/kg; n=6). DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej; SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej; \* $p < 0,05$  vs D0, # $p < 0,05$  vs D7.



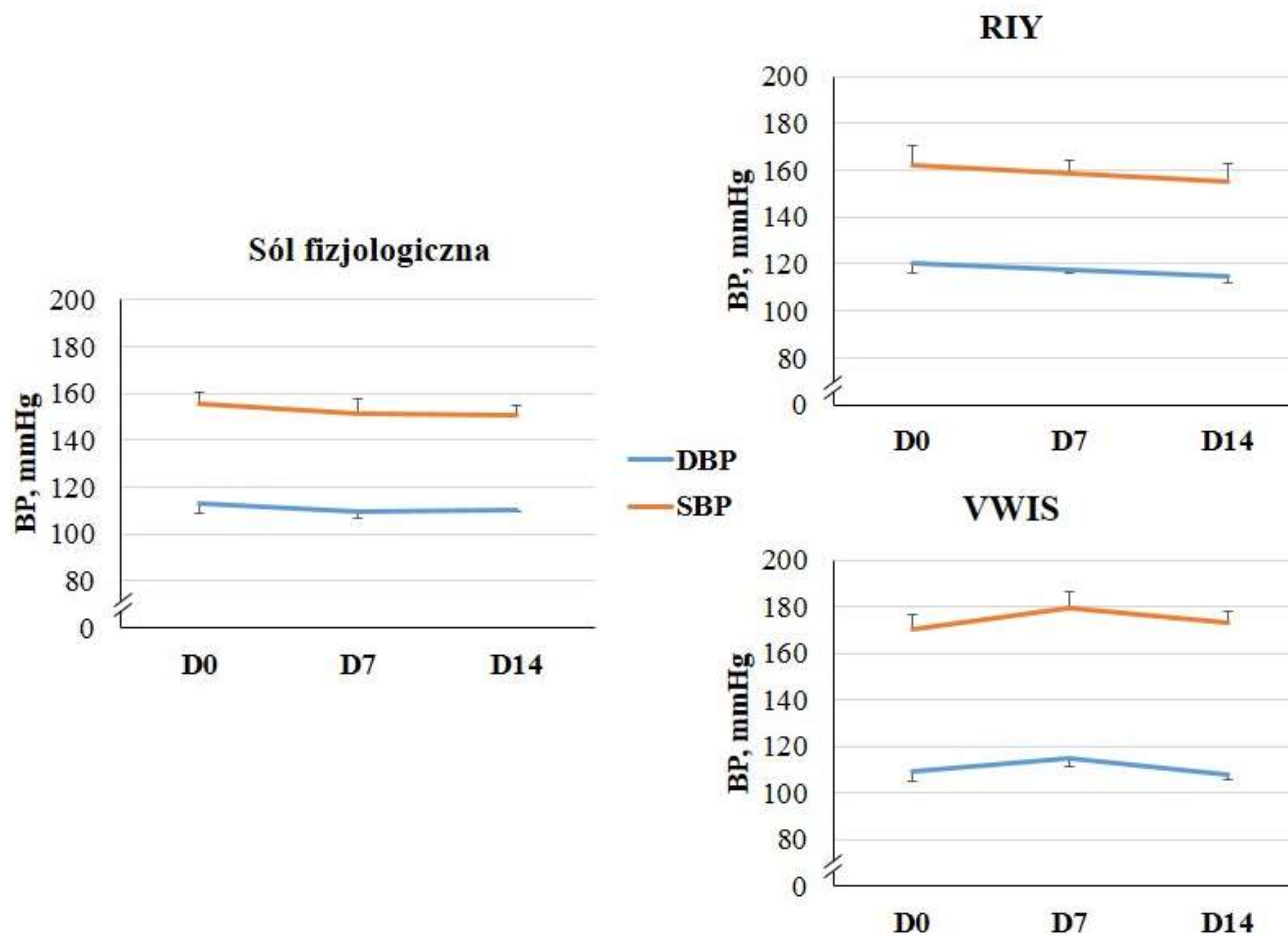
Na Ryc. 9 przedstawiono zmiany skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego 16-tygodniowe (SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalnika podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni z 1h przed podaniem dziennej dawki w układzie analogicznym jak dla szczurów 6-tygodniowych. Podawanie peptydu RIY obniżało ciśnienie tętnicze krwi zarówno skurczowe jak i rozkurczowe i efekt ten był istotny statystycznie. Efekt zaobserwowano już po tygodniu podawania tego peptydu. Takiego efektu nie zaobserwowano po podaniu peptydu VWIS.

Przy takim sposobie pomiaru w tej grupie szczurów zaobserwowano obniżenie częstości skurczów serca pod wpływem RIY. Wynik był znamieny statystycznie po 7 i 14 dniach podawania D0:  $306 \pm 8$ ; D7:  $280 \pm 10^*$ ; D14:  $268 \pm 8^*$  bpm;  $*p < 0,05$  vs D0.



Ryc. 9 Ciśnienie krwi tętniczej w grupie SHR 16-tygodniowych, wartość średnia  $\pm$  SEM z godziny przed podaniem dożylnym dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 dniach (D14): soli fizjologicznej (0,9%; n=5), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=5); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=6). DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej; SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej; \* $p < 0,05$  vs D0.

Na Ryc. 10 zilustrowano zmiany skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalnika podawanych dożołądkowo, codziennie przez 14 dni. Badane substancje podawane w ten sposób nie wpłynęły na ciśnienie krwi tętniczej.



Ryc. 10 Ciśnienie krwi tętniczej w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych, wartość średnia  $\pm$  SEM z godziny przed dożołądkowym podaniem dawki dobowej badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 dniach (D14): soli fizjologicznej (0,9%; n=5), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=6); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5). DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej; SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej.

U zwierząt będących w ustalonej fazie nadciśnienia zaobserwowano obniżenie częstości skurczów serca w grupach szczurów, którym podawano dożołądkowo badane peptydy; w przypadku peptydu RIY: D0: 296±6; D7: 295±9; D14: 286±9\* bpm; \*p<0,05. W przypadku peptydu VWIS znamienność statystyczną zaobserwowano jedynie 7 dnia leczenia w stosunku do dnia 0: D0: 274±4; D7: 293±2\*; D14: 278±21 bpm; \*p<0,05 vs D0.

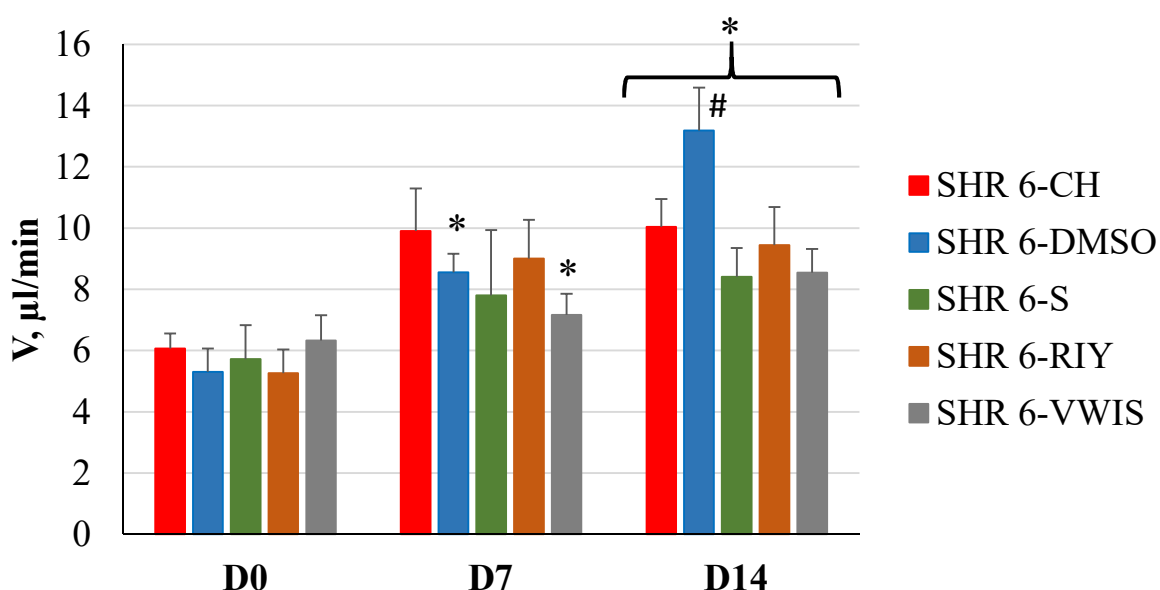
Analiza średnich wartości dobowych dla ciśnienia tętniczego krwi wskazała na brak różnic zarówno dla skurczowego jak i rozkurczowego ciśnienia krwi tętniczej w grupie szczurów dorosłych po dożołądkowym podaniu badanych peptydów (S - SBP: D0: 167±5; D7: 167±5; D14: 168±5; DBP: D0: 125±1; D7: 125±2; D14: 124±1; RIY - SBP: D0: 169±7; D7: 171±6; D14: 172±7; DBP: D0: 129±2; D7: 130±2; D14: 133±2; VWIS - SBP: D0: 183±7; D7: 183±4; D14: 187±5; DBP: D0: 121±5; D7: 119±2; D14: 122±3 mmHg). Wynik ten potwierdza brak hipotensyjnego efektu, który wykazano w analizie podstawowej (powyżej) po dożołądkowym podaniu badanych peptydów w grupie zwierząt dorosłych.

### 3.2.2. Wpływ badanych związków na parametry metaboliczne, wydalnicze i osoczowe

Raz w tygodniu mierzono dobowe spożycie wody i paszy, a także wydalanie moczu i kału (parametry te mierzono również po 6h od podania szczurom badanych związków). Zgromadzone dane zestawiono w Tabelach V-VIII. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w spożyciu paszy i wydalaniu kału w żadnej z badanych grup.

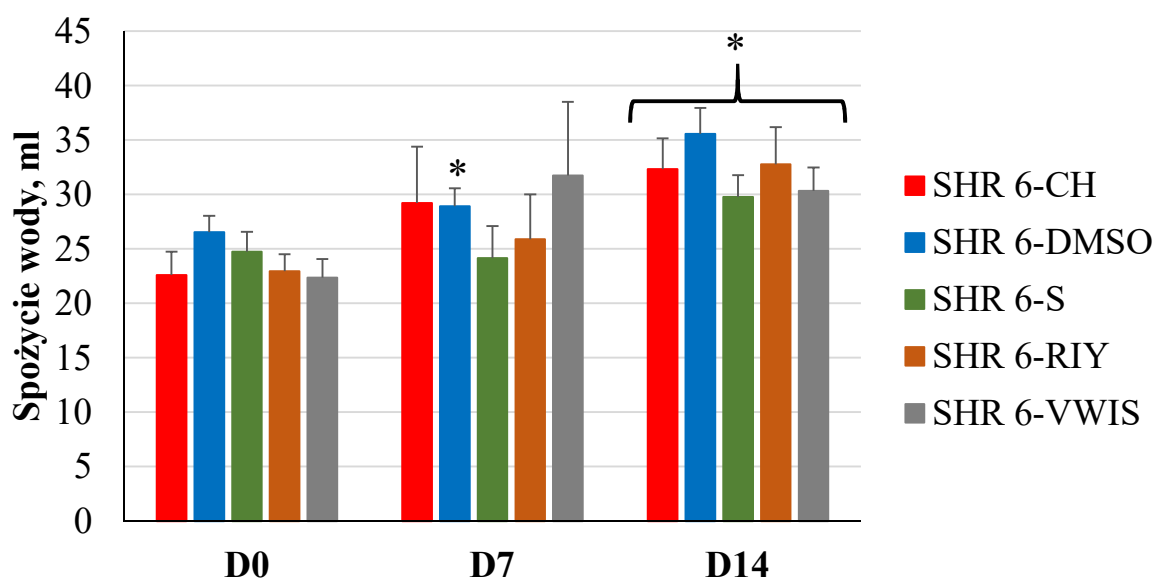
#### SHR 6-tygodniowe po dożylnym podaniu badanych związków

Na Ryc. 11 zilustrowano zmiany w dobowym wydalaniu moczu u szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia tętniczego pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. Po 14 dniach zaobserwowano istotny statystycznie wzrost diurezy w stosunku do dnia 0 we wszystkich grupach zwierząt. Szczury otrzymujące 0,05% roztwór DMSO charakteryzował znacznie większy wzrost diurezy po 7 i 14 dniach w porównaniu do pozostałych grup.



Ryc. 11 Średnie dobowe wydalanie moczu  $\pm$  SEM w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), 7 (D7) i 14 (D14): CH – chymostatyny ( $n=8$ ), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek;  $n=8$ ), soli fizjologicznej (0,9%;  $n=5$ ), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg;  $n=5$ ); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg;  $n=6$ ); \* $p<0,05$  vs D0; #  $p<0,05$  vs D7.

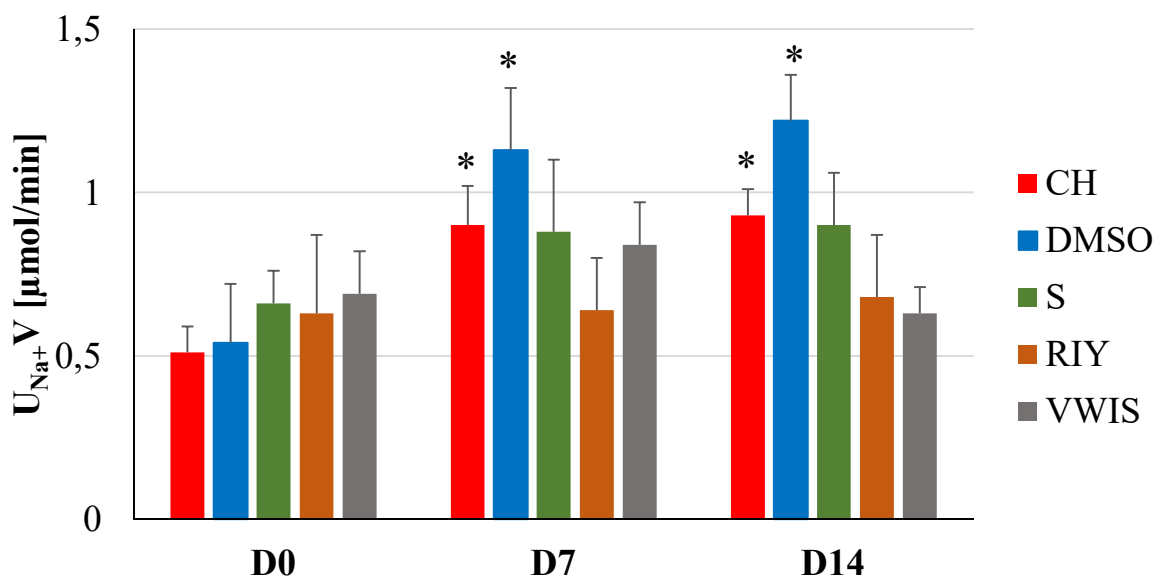
Na Ryc. 12 przedstawiono zmiany w dobowym spożyciu wody u szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia tętniczego (6-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. Po 14 dniach w każdej z badanych grup szczurów zaobserwowano istotny statystycznie wzrost spożycia wody w stosunku do dnia 0. Po 7 dniach podawania istotny statystycznie wzrost spożycia zaobserwowano jedynie po podaniu 0,05% DMSO.



Ryc. 12 Średnie dobowe spożycie wody  $\pm$  SEM w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), 7 (D7) i 14 (D14): CH – chymostatyny ( $n=8$ ), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek;  $n=8$ ), soli fizjologicznej (0,9%;  $n=5$ ), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg;  $n=5$ ); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg;  $n=6$ ); \* $p<0,05$  vs D0.

W grupie szczurów młodych otrzymujących dożylnie chymostatynę i jej rozpuszczalnik jakim jest DMSO obserwowano wzrost wydalania jonów sodu (Ryc. 13) i potasu (CH- D0:  $0,48\pm 0,08$ , D7:  $0,95\pm 0,12^*$ , D14:  $1,01\pm 0,60^*$ ; DMSO- D0:  $0,56\pm 0,17$ , D7:  $1,20\pm 0,16^*$ , D14:  $1,39\pm 0,18^*$ ;  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , \* $p<0,05$  vs D0). Dodatkowo w grupie szczurów otrzymujących chymostatynę obserwowano znamienne wzrost wydalania substancji osmotycznie czynnych (CH- D0:  $2,94\pm 0,68$ , D7:  $6,05\pm 1,16^*$ , D14:  $7,82\pm 0,47^*$   $\mu\text{Osm}/\text{min}$ ; \* $p<0,05$ ). Stężenie jonów potasu w osoczu wzrosło po 7 dniach podawania chymostatyny, w kolejnym tygodniu ich stężenie obniżyło się znamienne w porównaniu z D0 (dane zgromadzone w TABELI V).

Po dwutygodniowym podawaniu peptydu RIY lub VWIS dożylnie, nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w parametrach wydalniczych i osoczowych (Aneks: TABELA V).

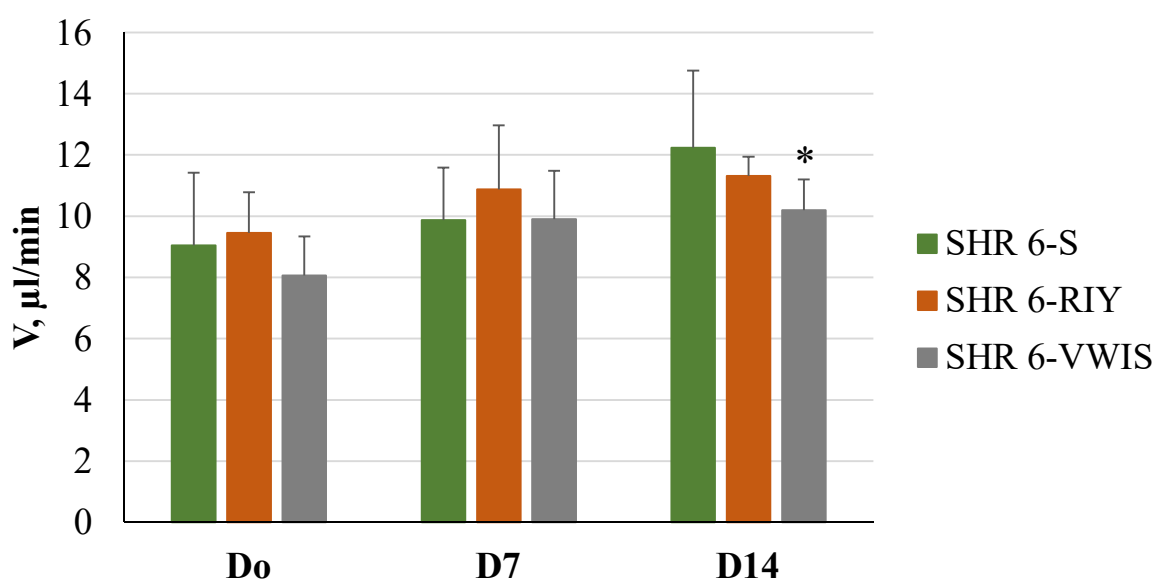


Ryc. 13 Średnie dobowe wydalanie jonów sodu  $\pm$  SEM w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), 7 (D7) i 14 (D14): CH – chymostatyny ( $n=10$ ), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek;  $n=8$ ), soli fizjologicznej (0,9%;  $n=6$ ), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg;  $n=6$ ); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg;  $n=6$ ); \* $p < 0,05$  vs D0.

#### SHR 6-tygodniowe po dożoładkowym podaniu badanych związków

Na Ryc. 14 przedstawiono zmiany w wydalaniu moczu (średnie wydalanie obliczane na podstawie 24h obserwacji w klatce metabolicznej) u szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia tętniczego (6-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. Jedynie w grupie szczurów otrzymujących dożoładkowo peptyd VWIS zaobserwowano wzrost wydalania moczu po 14 dniach w stosunku do dnia 0. Szczury otrzymujące dożoładkowo rozpuszczalnik (0,9% sól fizjologiczną) charakteryzowała wzrostowa tendencja do wydalania moczu w czasie doświadczenia przewlekłego, natomiast nie jest to zmiana statystycznie znamienne.

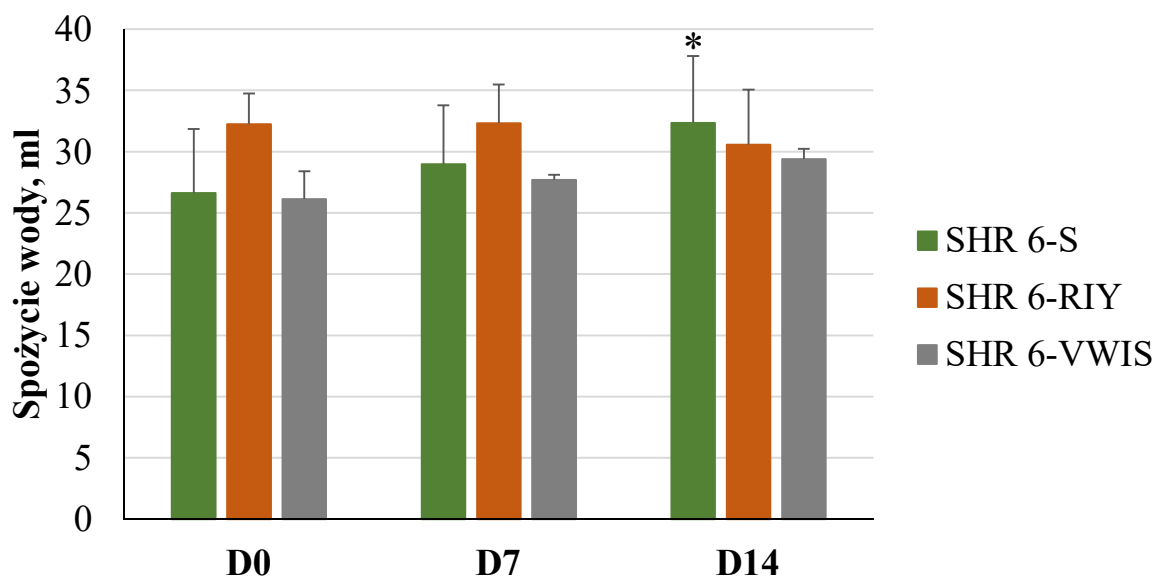




Ryc. 14 Średnie dobowe wydalanie moczu  $\pm$  SEM w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych po dożołądkowym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), 7 (D7) i 14 (D14): S - soli fizjologicznej (0,9%; n=6), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=6); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5); \* $p < 0,05$  vs D0.

Na Ryc. 15 pokazano zmiany w dobowym spożyciu wody u szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia tętniczego (6-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalnika podawanego dożołądkowo, codziennie przez 14 dni. Istotny statystycznie wzrost spożycia wody zaobserwowano tylko w grupie szczurów kontrolnych po 14 dniach podawania w stosunku do dnia 0.

Zaobserwowano tendencję wzrostową spożycia wody w grupie szczurów otrzymujących dożołądkowo peptyd VWIS w czasie 6 godzin od podania peptydu (D0:3 $\pm$ 1; D7:4 $\pm$ 1; D14:5 $\pm$ 1\*; \* $p=0,068$  D14 vs D0).

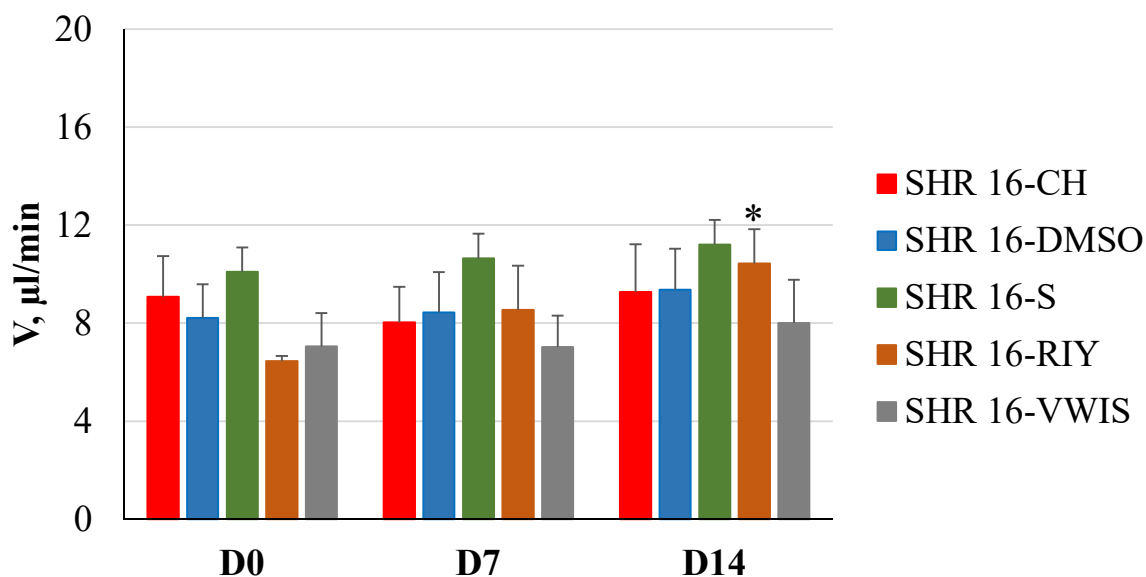


Ryc. 15 Dobowe spożycie wody  $\pm$  SEM w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych po dożołądkowym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14): soli fizjologicznej (0,9%; n=5), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=5); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5); \*p<0,05 vs D0.

Istotny statystycznie wzrost wydalania substancji osmotycznie czynnych obserwowano w grupach szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia po dożołądkowym podaniu badanych peptydów (RIY- D14:  $9,74 \pm 0,72$  vs D0:  $5,36 \pm 0,56$ ; VWIS- D14:  $10,14 \pm 0,45$  vs D0:  $6,49 \pm 0,45$   $\mu$ Osm/min; p<0,05). Istotne obniżenie stężenia jonów potasu w osoczu obserwowano w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY (D0:  $5,18 \pm 0,25$ ; D7:  $4,84 \pm 0,09^*$ ; D14:  $4,15 \pm 0,13^*$  mmol/l; \*p<0,05 vs D0); w grupie szczurów kontrolnych (D0:  $5,21 \pm 0,16$ ; D7:  $4,02 \pm 0,72$ ; D14:  $4,19 \pm 0,17^{\#}$  mmol/l;  $\#p<0,07$ ) obserwowano tendencję w tym samym kierunku (Aneks: TABELA VI).

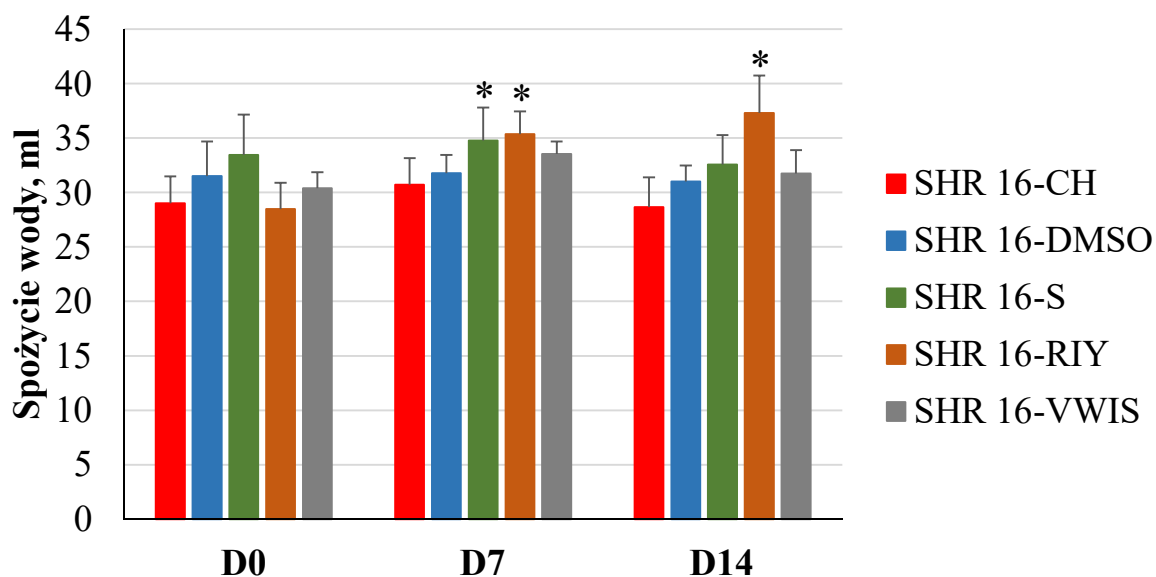
### SHR 16-tygodniowe po dożylnym podaniu badanych związków

Na Ryc. 16 przedstawiono zmiany w wydalaniu moczu u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. W grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY zaobserwowano statystycznie istotny wzrost wydalania moczu po 14 dniach podawania w porównaniu do dnia 0.



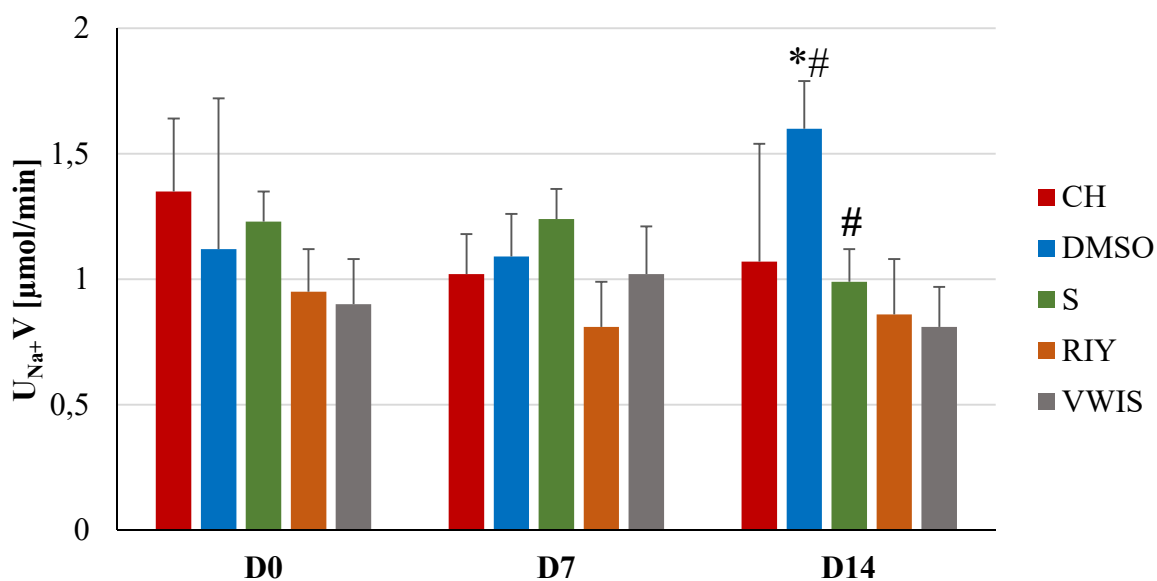
Ryc. 16 Średnie dobowe wydalanie moczu  $\pm$  SEM w grupie SHR 16-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i po 14 (D14) dniach traktowania: CH – chymostatyną (n=13), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek; n=10), solą fizjologiczną (0,9%; n=9), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=6); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=6); \* $p < 0,05$  vs D0.

Na Ryc. 17 przedstawiono zmiany w dobowym spożyciu wody u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. W grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY zaobserwowano istotny statystycznie wzrost spożycia wody zarówno po 7 jak i po 14 dniach podawania. Znamienne statystycznie wzrost spożycia wody zanotowano również po 7 dniach podawania 0,9% soli fizjologicznej w porównaniu z dniem 0.



Ryc. 17 Średnie dobowe spożycie wody  $\pm$  SEM w grupie szczurów (SHR 16-tygodniowych) po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków: CH – chymostatyny ( $n=12$ ), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek;  $n=9$ ), soli fizjologicznej (0,9%;  $n=7$ ), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg;  $n=6$ ); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg;  $n=6$ ); D0 – dzień 0; D7 – dzień 7; D14 – dzień 14; \* $p<0,05$  vs D0.

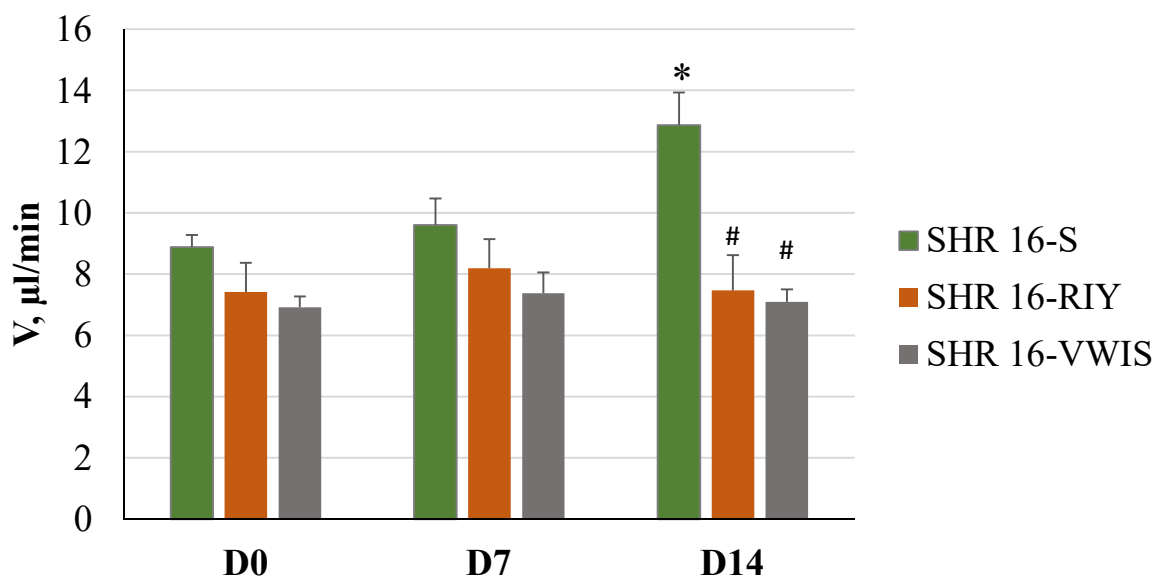
W grupie szczurów dorosłych obserwowano obniżenie stężenia substancji osmotycznie czynnych w osoczu po dożylnym podaniu chymostatyny (D0:  $307\pm 1$ ; D7:  $302\pm 2$ ; D14:  $297\pm 3^*$  mmol/l; \* $p<0,05$  vs D0), peptydu RIY (D0:  $306\pm 4$ ; D7:  $304\pm 1$ ; D14:  $302\pm 296^*$  mmol/l; \* $p<0,05$  vs D0) i VWIS (D0:  $313\pm 1$ ; D7:  $308\pm 1$ ; D14:  $302\pm 2^*\#$  mmol/l; \* $p<0,05$  vs D0; # $p<0,05$  vs D7). Szczury otrzymujące w infuzji dożylniej chymostatynę i jej rozpuszczalnik charakteryzował niższy poziom sodu w osoczu po 14 dniach ich podawania w porównaniu do dnia. Podanie peptydu VWIS spowodowało wzrost  $P_{Na}$  w tej grupie wiekowej, natomiast RIY pozostał bez wpływu na parametry osocza (Aneks: TABELA VII). Wydalanie jonów sodu w moczu istotnie wzrosło po DMSO będącym kontrolą dla chymostatyny (Ryc. 18; Aneks: TABELA VIII). W grupie szczurów otrzymujących sól fizjologiczną wystąpiła tendencja do obniżenia wydalania jonów potasu (wynik nieznamienny statystycznie).



Ryc. 18 Średnie dobowe wydalanie jonów sodu  $\pm$  SEM w grupie SHR 16-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i po 14 (D14) dniach traktowania: CH – chymostatyną ( $n=13$ ), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek;  $n=10$ ), solą fizjologiczną (0,9%;  $n=9$ ), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg;  $n=6$ ); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg;  $n=6$ ); \* $p < 0,05$  vs D0; # $p < 0,05$  vs D7.

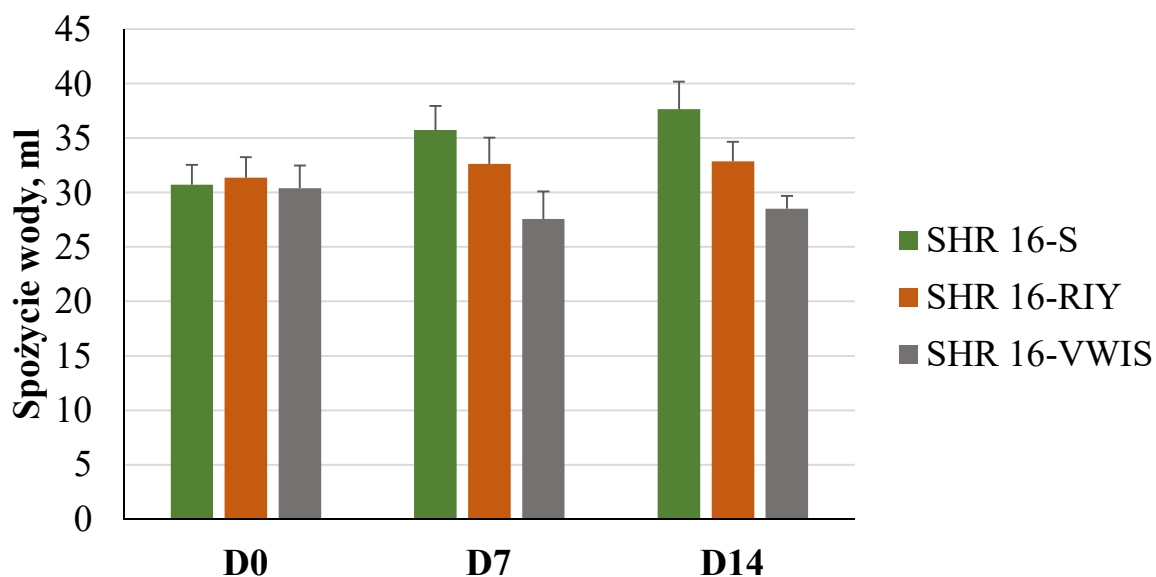
### SHR 16-tygodniowe po dożoładkowym podaniu badanych związków

Na Ryc. 19 przedstawiono średnią diurezę dobową u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalnika podawanych dożoładkowo, codziennie przez 14 dni. W tym przypadku zaobserwowano znamiennej statystycznie wzrost wydalania moczu po 14 dniach podawania dożoładkowo soli fizjologicznej w porównaniu do dnia 0. W dniu 14 zaobserwowano istotnie niższe średnie dobowe wydalanie moczu w grupie szczurów otrzymujących badane peptydy w porównaniu do grupy kontrolnej.



Ryc. 19 Średnie dobowe wydalanie moczu  $\pm$  SEM, w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków: S - soli fizjologicznej (0,9%; n=6), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=6); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5); D0 – dzień 0; D7 – dzień 7; D14 – dzień 14; \* $p < 0,05$  vs D0, # $p < 0,05$  vs S.

Na Ryc. 20 pokazano zmiany w dobowym spożyciu wody u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowe SHR) pod wpływem badanych związków lub ich rozpuszczalników podawanych dożołądkowo, codziennie przez 14 dni. Nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic w trakcie chronicznego podawania.



Ryc. 20 Dobowe spożycie wody (średnia  $\pm$  SEM) w grupie szczurów 16-tygodniowych po dożołądkowym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach traktowania: solą fizjologiczną (0,9%; n=6), RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=6); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna-12,5 mg/kg; n=5).

Wydalenie substancji osmotycznie czynnych wzrosło statystycznie istotnie w każdej z grup (S- D0:  $8,4 \pm 2,6$ ; D7:  $11,3 \pm 1,8$ ; D14:  $9,9 \pm 1,0^*$ ; RIY- D0:  $7,9 \pm 1,7$ ; D7:  $11,4 \pm 1,0$ ; D14:  $11,2 \pm 1,6^*$ ; VWIS- D0:  $6,0 \pm 0,7$ ; D7:  $9,8 \pm 2,5$ ; D14:  $9,9 \pm 1,3^*$   $\mu\text{Osm}/\text{min}$ ;  $*p < 0,05$  vs D0). Tylko w grupie szczurów kontrolnych tj. otrzymujących sól fizjologiczną wzrosło wydalenie jonów sodu ( $p = 0,07$ ) i jonów potasu (D0:  $0,85 \pm 0,27$ ; D7:  $1,22 \pm 0,08$ ; D14:  $1,59 \pm 0,29^*$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;  $*p < 0,05$  vs D0). W tej samej grupie szczurów obserwowano także istotne obniżenie stężenia jonów sodu (D0:  $152,50 \pm 6,18$ ; D7:  $150,75 \pm 2,50$ ; D14:  $139,25 \pm 1,65^*$   $\text{mmol}/\text{l}$ ;  $*p < 0,05$  vs D0) i potasu (D0:  $4,54 \pm 0,15$ ; D7:  $4,36 \pm 0,14$ ; D14:  $3,64 \pm 0,18^*$   $\text{mmol}/\text{l}$ ;  $*p < 0,05$  vs D0) w osoczu. Tendencję do obniżania się stężenia jonów potasu w osoczu już po 7 dniach obserwowano w grupie szczurów otrzymujących dożołądkowo peptyd VWIS; ta tendencja utrzymywała się do końca doświadczenia.

### 3.2.3. Wpływ badanych związków na tempo wydalania azotanów i azotynów

W Tabeli 1 przedstawiono dane dotyczące tempa wydalania azotanów i azotynów w grupie szczurów we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia otrzymujących dożylnie badane związki w doświadczeniu chronicznym. W grupie szczurów otrzymujących DMSO zaobserwowano wyższe tempo wydalania azotanów i azotynów w porównaniu do dnia 0; zmiana ta była bliska istotności statystycznej ( $p=0,06$ ). W pozostałych grupach nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic. Warto podkreślić, że w dniu 0 (wszystkie szczury otrzymywały sól fizjologiczną) wartość tempa wydalania azotanów i azotynów była podobna.

Tabela 1 Tempo wydalania azotanów i azotynów ( $\text{NO}_x$ ) w grupie szczurów 6-tygodniowych po dożylnym podaniu badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach traktowania.

		<b>CH (n=6)</b>	<b>DMSO (n=6)</b>	<b>S (n=5)</b>	<b>RIY (n=5)</b>	<b>VWIS (n=5)</b>
<b>NO<sub>x</sub> [mmol/min]</b>	D0	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01
	D7	0,06±0,01	0,07±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
	D14	0,06±0,01	0,08±0,02#	0,04±0,01	0,05±0,01	0,03±0,01

*CH* – chymostatyna; *DMSO* – dimetylosulfotlenek; *S* – sól fizjologiczna; *RIY* – Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; *VWIS* – Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; # $p=0,06$  vs D0.

W Tabeli 2 przedstawiono dane dotyczące tempa wydalania azotanów i azotynów w grupie szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia po dożylnym podaniu badanych związków w doświadczeniu chronicznym. W grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY zaobserwowano istotnie wyższe tempo wydalania azotanów i azotynów.



Tabela 2 Tempo wydalania azotanów i azotynów (NO<sub>x</sub>) w grupie szczurów 16-tygodniowych po dożylnym podaniu badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach traktowania.

		<b>CH (n=8)</b>	<b>DMSO (n=5)</b>	<b>S (n=4)</b>	<b>RIY (n=5)</b>	<b>VWIS (n=5)</b>
<b>NO<sub>x</sub> [mmol/min]</b>	D0	0,04±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01
	D7	0,03±0,01	0,04±0,02	0,05±0,01	0,06±0,02	0,04±0,0
	D14	0,04±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01	0,12±0,02*#	0,05±0,01

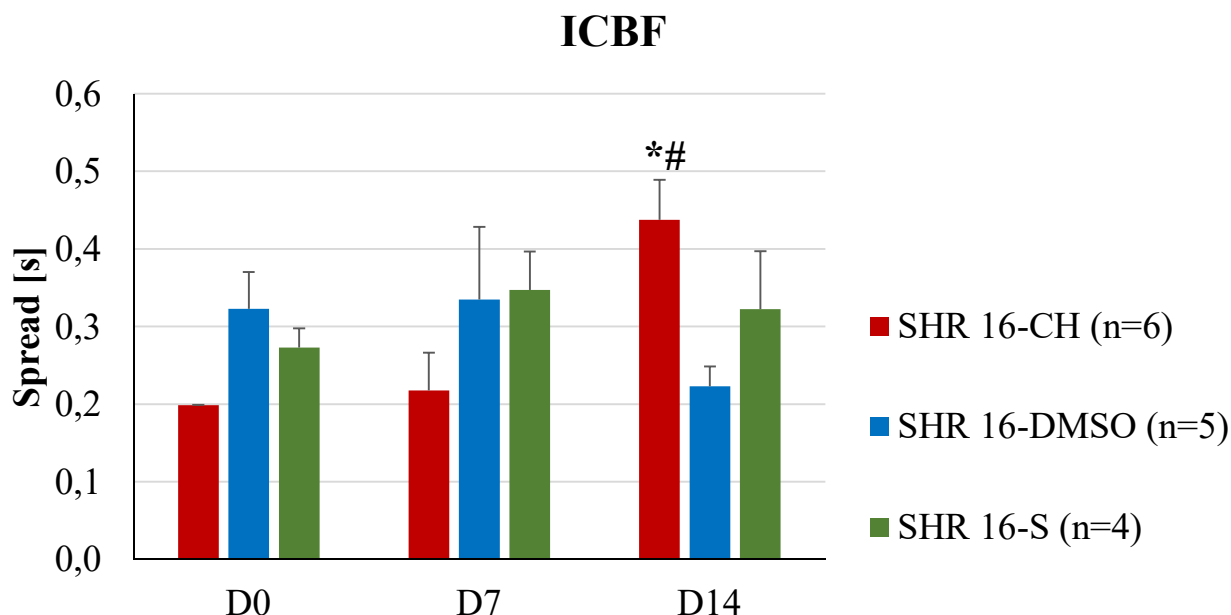
*CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; S – sól fizjologiczna; RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; VWIS - Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; \*p<0,05 vs D0 #p<0,05.*

#### 3.2.4. Wyniki obrazowania nerki metodą rezonansu magnetycznego

Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego to nieinwazyjna metoda pomiaru przepływu krwi przez warstwy nerki w trakcie trwającego doświadczenia chronicznego. Podjęto próbę opisanie tempa perfuzji nerki za pomocą opracowanej w Środowiskowym Laboratorium Rezonansu Magnetycznego Małych Zwierząt (Centrum Medycyny Doświadczalnej CePT) metody, w której zdefiniowano i opisano parametr spread (mierzony w sekundach, s). Spread to parametr opisujący czas przebywania kontrastu w danej warstwie nerki (kora, rdzeń zewnętrzny i rdzeń wewnętrzny). Należy interpretować go w ten sposób, że: wyższa wartość parametru oznacza dłuższy czas przebywania kontrastu w danej warstwie a tym samym mniejszy przepływ krwi w danej warstwie nerki. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego wykonano wyłącznie w grupie szczurów będących w ustalonej fazie rozwoju nadciśnienia tętniczego. Podjęto próbę ustalenia metody dla szczurów będących we wczesnej fazie jego rozwoju, jednak uzyskanie wyraźnych obrazów ze skanowania nerki okazało się być trudnym zadaniem, co uniemożliwiło wiarygodną analizę otrzymanych wyników. Brak znaczących zmian w ciśnieniu tętniczym krwi w tej grupie zwierząt, a także duże koszty związane z realizacją tej części badań przemówiły za rezygnacją z badań na tym etapie pracy.

Na Ryc. 21 przedstawiono zmiany w przepływie krwi przez korę nerki u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego 16-tygodniowe SHR pod wpływem chymostatyny (CH), jej rozpuszczalnika (0,05% DMSO) i soli fizjologicznej

(S) podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. Zaobserwowano istotnie statystycznie mniejszy przepływ krwi w korze nerki w grupie szczurów otrzymujących dożylnie chymostatynę. Nie zaobserwowano wpływu podawanych związków na przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF).

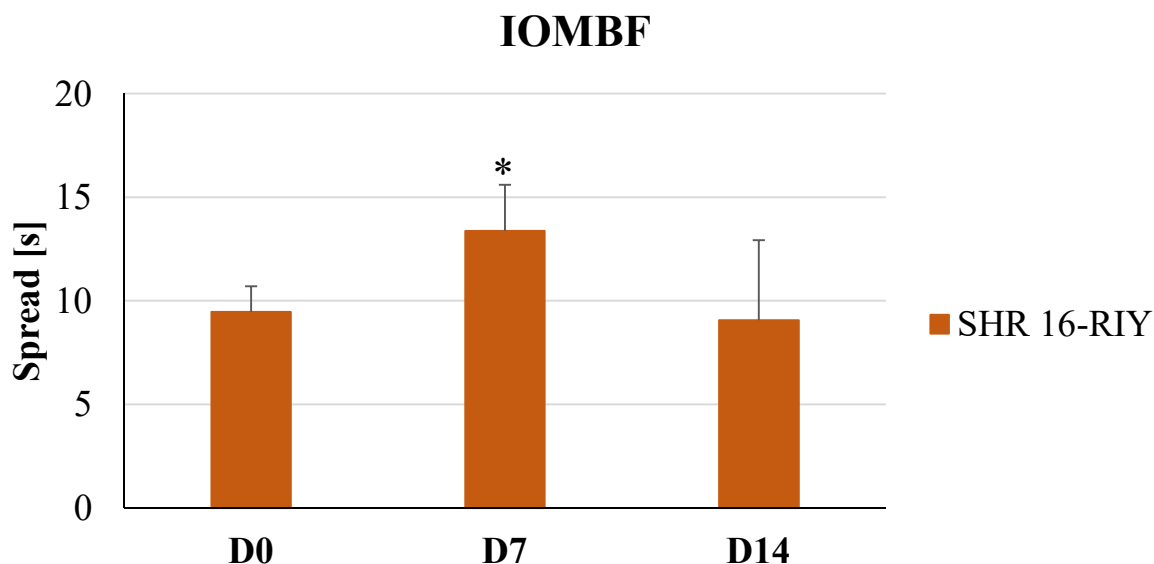


Ryc. 21 Indeks przepływu krwi przez korę nerki (ICBF; wartość średnia  $\pm$  SEM) w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki badanych związków w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach traktowania: CH – chymostatyną (2 mg/kg), DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek), solą fizjologiczną (0,9%). \* $p=0,009$  dzień 14 vs dzień 0; # $p=0,011$  CH vs DMSO.

Na Ryc. 22 przedstawiono zmiany w przepływie krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego (16-tygodniowe SHR) pod wpływem podawanego dożylnie, codziennie przez 14 dni peptydu RIY. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego zdecydowano się wykonać jedynie w grupie szczurów otrzymujących dożylnie peptyd RIY, ponieważ tylko w tej grupie zwierząt obserwowano efekt obniżenia ciśnienia tętniczego krwi.

Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki po 7 dniach podawania peptydu. Po 14 dniach leczenia przepływ nie różnił się od poziomu rejestrowanego w dniu kontrolnym (D0). Do wykonania obrazowania w tej grupie zwierząt zdecydowano się na wydłużenie czasu skanowania w rezonansie magnetycznym. Krok ten postawił nam pewne ograniczenia, przez co

możliwe jest interpretowanie wyników tylko w obrębie grupy. Należy pamiętać, że w dniu 0 szczury otrzymywały infuzję dożylną 0,9% roztworu soli fizjologicznej co pozwala na ocenę wpływu podawania peptydu na przepływ krwi w nerce, w czasie, w obrębie tej grupy).

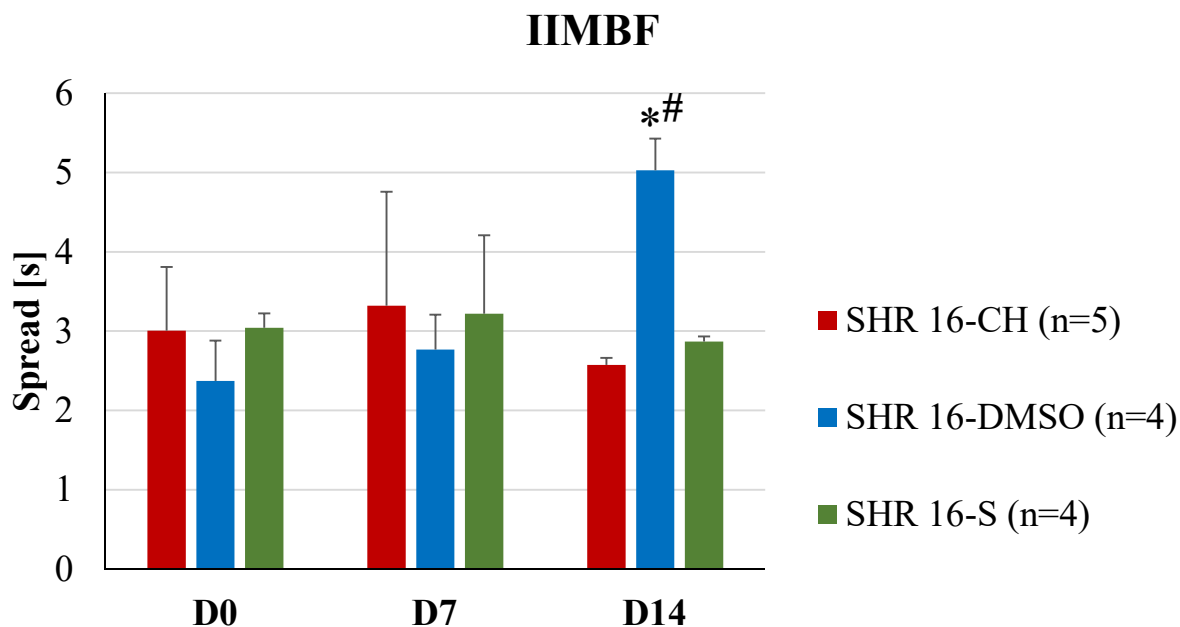


Ryc. 22 Indeks przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (IOMBF; wartość średnia  $\pm$  SEM) w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki peptydu RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg; n=6) w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach traktowania; \* $p < 0,05$  D14 vs D0.

Na Ryc. 23 przedstawiono zmiany przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego 16-tygodniowe SHR pod wpływem: chymostatyny (CH), jej rozpuszczalnika (0,05% DMSO) i 0,9% soli fizjologicznej (S) podawanych dożylnie, codziennie przez 14 dni. Po 14 dniach zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie przepływu krwi w rdzeniu wewnętrznym nerki (wzrost wartości spread) w grupie szczurów otrzymujących DMSO w porównaniu do grupy szczurów otrzymujących sól fizjologiczną.

W przewlekłej fazie doświadczeń, zaobserwowano obniżenie przepływu krwi w rdzeniu wewnętrznym nerki po podaniu roztworu DMSO (rozpuszczalnika chymostatyny); D0:  $2,372 \pm 0,507$ ; D7:  $2,769 \pm 0,437$ ; D14:  $5,028 \pm 0,397^*$ ; \* $p < 0,05$  vs D0. W dniu 14 podawania badanych związków, przepływ krwi w tej części nerki był niższy także pomiędzy grupami CH:  $2,572 \pm 0,089$ ; DMSO:  $5,028 \pm 0,397\#$ ; S:  $2,869 \pm 0,063$ ;  $\#p < 0,05$  vs CH i S. Takiej zmiany nie obserwowano u szczurów otrzymujących chymostatynę w tym samym rozpuszczalniku co pośrednio może

wskazywać, że zablokowanie chymazy ma korzystny wpływ na ukrwienie rdzenia wewnętrznego nerki.



Ryc. 23 Indeks przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki (IIMBF; wartość średnia  $\pm$  SEM) w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych po dożylnym podaniu dobowej dawki w dniu 0 (D0), po 7 (D7) i 14 (D14) dniach: CH - chymostatyny (12,5 mg/kg); DMSO (0,05 % dimetylosulfotlenek) i 0,9 % soli fizjologicznej. \* $p < 0,05$  D14 vs D0.

W Tabeli 3 zestawiono wszystkie wyniki perfuzji nerek (w trzech warstwach nerki) uzyskane po obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego dla małych zwierząt u szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia tętniczego po dożylnym podaniu związków: chymostatyny (CH), jej rozpuszczalnika (0,05% DMSO) i 0,9% soli fizjologicznej (S) oraz peptydu RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna – 7,5 mg/kg), codziennie przez 14 dni.

Tabela 3 Indeks przepływu krwi przez poszczególne warstwy nerki.

Parametr	Dzień doświadczenia	SHR-16 CH	SHR-16 DMSO	SHR-16 S	SHR-16 RIY
ICBF [spread, s]	D0	0,20 ± 0,01 (n=5)	0,32 ± 0,05 (n=4)	0,28 ± 0,03 (n=4)	0,2 ± 0,1 (n=6)
	D7	0,22 ± 0,05 (n=5)	0,34 ± 0,09 (n=4)	0,35 ± 0,05 (n=4)	0,2 ± 0,1 (n=6)
	D14	0,44 ± 0,05 (n=5) *#	0,22 ± 0,03 (n=4)	0,32 ± 0,08 (n=4)	0,2 ± 0,1 (n=6)
IOMBF [spread,s]	D0	4,57 ± 1,84 (n=5)	3,46 ± 0,46 (n=4)	3,29 ± 0,73 (n=4)	9,5 ± 1,2 (n=6)
	D7	5,42 ± 1,20 (n=5)	5,91 ± 1,48 (n=4)	7,26 ± 2,28 (n=4)	13,4 ± 2,2 (n=6) *
	D14	4,97 ± 0,61 (n=5)	5,52 ± 0,43 (n=4)	9,25 ± 3,32 (n=4)	9,1 ± 3,9 (n=6)
IIMBF [spread, s]	D0	3,01 ± 0,80 (n=5)	2,37 ± 0,51 (n=4)	3,04 ± 0,18 (n=4)	13,1 ± 0,8 (n=6)
	D7	3,32 ± 1,44 (n=5)	2,77 ± 0,44 (n=4)	3,22 ± 0,99 (n=4)	13,0 ± 2,9 (n=6)
	D14	2,57 ± 0,09 (n=5) ###	5,03 ± 0,40 (n=4) *	2,87 ± 0,06 (n=4)	14,6 ± 2,2 (n=6)

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SEM; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; S - sól fizjologiczna; RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; ICBF (indeks przepływu krwi przez korę nerki); IOMBF (indeks przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki); IIMBF (indeks przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki); D0 – dzień 0; D7 – dzień 7; D14 – dzień 14; \* $p < 0,05$  D14 vs D0; # $p < 0,05$  CH vs DMSO; ### $p < 0,05$  CH vs S i DMSO.

### 3.2.5. Wyniki oznaczenia biomarkerów w osoczu i moczu (Testy ELISA)

Oznaczenie stężenia biomarkerów w moczu i osoczu wykonano według instrukcji załączonych przez producentów. Napotkano na duże trudności w ich oznaczeniu spowodowane użyciem testów, które nie spełniały deklarowanych przez producenta parametrów, koniecznością wykonywania wielokrotnych powtórzeń oznaczenia dla tych samych badanych próbek, dużą rozbieżnością w uzyskiwanych wynikach oznaczenia. W grupie szczurów młodych spowodowało to bardzo duże utrudnienie przede wszystkim ze względu na małą ilość dostępnego osocza w tej grupie wiekowej i w konsekwencji utratą materiału (zarówno osocza jak i moczu) z powodu

wielokrotnych powtórzeń. Podjęto próbę oznaczenia wydalania albuminy (UAE) i VEGF oraz stężenia 8-iso-PG (8-isoprostaglandyna) w osoczu; przedstawiono jedynie wyniki w wybranych grupach badanych (uznane za wiarygodne).

W Tabeli 4 zgromadzono wyniki dla wydalania albuminy w grupie szczurów w ustalonej fazie nadciśnienia po dożylnym podaniu wybranych związków. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w oznaczanym parametrze.

Tabela 4 Wydalanie albuminy w grupie szczurów 16-tygodniowych, po dożylnym podaniu badanych związków.

		<b>SHR-16 CH (n=6)</b>	<b>SHR-16 DMSO (n=5)</b>	<b>SHR-16 S (n=5)</b>
<b>UAE [µg/min]</b>	D0	0,12±0,01	0,19±0,09	0,27±0,09
	D7	0,10±0,01	0,19±0,05	0,21±0,05
	D14	0,16±0,01	0,27±0,07	0,28±0,06

*Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SEM; UAE wydalanie albumin; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlene; S – sól fizjologiczna; D0 – dzień 0; D7 – dzień 7; D14 – dzień 14.*

W Tabeli 5 przedstawiono wyniki oznaczenia 8-izoprostanu w osoczu. Nie zaobserwowano istotnych zmian w jego stężeniu w osoczu.

Tabela 5 Stężenie 8-izoprostanu (8-iso-PG) w osoczu w grupie szczurów 16-tygodniowych, po dożylnym podaniu badanych związków.

<b>Osocze</b>		<b>SHR 16 CH (n=5)</b>	<b>SHR 16 DMSO (n=5)</b>	<b>SHR 16 S (n=3)</b>
<b>8-iso-PG [pg/ml]</b>	D0	96,9±1,4	88,3±6,4	98,0±6,2
	D7	103,1±8,7	97,5±8,0	92,6±3,8
	D14	96,0±3,7	90,2±3,2	87,8±6,6

*Przedstawiono wartości średnie ± SEM; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; S – sól fizjologiczna; D0 – dzień 0; D7 – dzień 7; D14 – dzień 14.*

W Tabeli 6 zestawiono dane stężenia VEGF w osoczu w grupie szczurów dorosłych. Jedynie w przypadku soli fizjologicznej zaobserwowano najniższy poziom VEGF w siódmym dniu doświadczenia. Obniżenie nie było jednak trwałe i po 14 dniach obserwowano ponowny wzrost, bliski wartości z dnia 0.

Tabela 6 Stężenie VEGF w osoczu w grupie szczurów 16-tygodniowych, po dożylnym podaniu badanych związków.

<b>Osocze</b>		<b>SHR-16 CH (n=5)</b>	<b>SHR-16 DMSO (n=5)</b>	<b>SHR-16 S (n=3)</b>
<b>VEGF [ng/l]</b>	D0	262,6±14,3	286,7±7,3	293,2±1,3
	D7	274,5±12,6	285,2±22,7	265,1±7,6*#
	D14	288,4±9,8	296,6±11,6	286,7±11,3

*Wartość średnia ± SEM; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; S – sól fizjologiczna; D0 – dzień 0; D7 - dzień 7; D14 – dzień 14; \*p<0,05 vs D0; #p<0,05 vs D14.*

Wydalenie VEGF przedstawiono w Tabeli 7. Zaobserwowano istotne obniżenie wydalania VEGF w grupie szczurów kontrolnych już po siedmiu dniach doświadczenia i wartość ta utrzymywała się do końca eksperymentu. Szczury otrzymujące peptyd RIY (szczury w utrwalonej fazie rozwoju nadciśnienia) charakteryzował istotny statystycznie wzrost wydalania VEGF w czasie trwania dwutygodniowego doświadczenia.

Tabela 7 Wydalenie VEGF w grupie szczurów 16-tygodniowych, po dożylnym podaniu badanych związków.

		<b>SHR-16 CH (n=8)</b>	<b>SHR-16 DMSO (n=5)</b>	<b>SHR-16 S (n=3)</b>	<b>SHR-16 RIY (n=5)</b>	<b>SHR-16 VWIS (n=5)</b>
<b>VEGF [ng/min]</b>	D0	2,8±0,8	2,8±0,8	5,3±0,2	3,5±0,5	4,6±1,0
	D7	2,3±1,1	4,5±2,3	2,5±0,3*	4,9±1,4	4,2±0,9
	D14	2,8±1,1	5,1±2,9	2,2±0,6*	8,2±0,4*	4,3±1,2

*Wartość średnia ± SEM; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; S – sól fizjologiczna; RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; VWIS - Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; D0 – dzień 0; D7 - dzień 7; D14 – dzień 14; \*p<0,05 vs D0.*

W Tabeli nr 8 przedstawiono wyniki stężenia Ang II w osoczu i wybranych tkankach pobranych od szczurów młodych (we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia). W sercu szczurów otrzymujących dożylnie peptyd RIY obserwuje się wyższy poziom Ang II w porównaniu do zwierząt otrzymujących roztwór soli fizjologicznej. Podobną odpowiedź wywołało dożylnie podawanie peptydu VWIS i w tej grupie obserwowano wyższe stężenie Ang II w stosunku do kontroli (była to wartość bliska granicy znamienności statystycznej  $p=0,07$ ). W grupie szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia obserwuje się wysoki poziom Ang II w nerce (znacznie wyższy w porównaniu do grupy szczurów dorosłych).

Tabela 8 Stężenie Ang II w osoczu i wybranych tkankach u szczurów 6-tygodniowych otrzymujących badane związki dożylnie.

Parametr	SHR-6 CH	SHR-6 DMSO	SHR-6 S	SHR-6 RIY	SHR-6 VWIS
Ang II (osocze) [ng/ml]	0,38 ± 0,06 (n=5)	0,36 ± 0,07 (n=5)	0,39 ± 0,09 (n=5)	0,55 ± 0,10 (n=5)	0,48 ± 0,04 (n=6)
Ang II (aorta) [ng/g]	22,42 ± 7,04 (n=4)	22,18 ± 7,74 (n=4)	11,72 ± 2,35 (n=4)	23,34 ± 4,74 (n=5)	22,10 ± 3,92 (n=5)
Ang II (serce) [ng/g]	0,16 ± 0,01 (n=5)	0,15 ± 0,01 (n=5)	0,16 ± 0,06 (n=5)	0,25 ± 0,04 (n=5) <b>p=0,055 vs S</b>	0,28 ± 0,05 (n=5) <b>p=0,070 vs S</b>
Ang II (nerka) [ng/g]	20,35 ± 6,05 (n=4)	16,86 ± 7,21 (n=4)	17,51 ± 6,67 (n=4)	25,42 ± 5,90 (n=5)	14,09 ± 5,11 (n=5)

Wartość średnia ± SEM; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosylfotlenek; S - sól fizjologiczna; RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; VWIS - Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna.



W Tabeli 9 przedstawiono wyniki stężenia Ang II w osoczu i wybranych tkankach pobranych od szczurów w ustalonej fazie nadciśnienia (SHR 16-tygodniowe) otrzymujących badane związki dożylnie. W grupie zwierząt otrzymujących przewlekle chymostatynę zaobserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie Ang II w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej dożylnie roztwór DMSO. W przypadku szczurów otrzymujących dożylnie przez 14 dni peptyd RIY stężenie Ang II w osoczu było istotnie niższe w porównaniu do grupy stanowiącej dla nich kontrolę tj. otrzymujących sól fizjologiczną; w tej grupie wartości stężenia Ang II dla serca były również wyraźnie niższe niż w pozostałych. Zaobserwowano także, że w grupach szczurów, którym podawano dożylnie peptydy, stężenie Ang II w aorcie było znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej czy po leczeniu CH (wynik statystycznie istotny w porównaniu do kontroli zanotowano jedynie w przypadku grupy, która otrzymywała peptyd VWIS; w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY stężenie Ang II w aorcie było wyższe, choć nieznamienne statystycznie). Stężenie Ang II w nerce w grupach szczurów chronicznie otrzymujących badane peptydy było istotnie niższe w porównaniu do grupy szczurów kontrolnych (wynik istotny statystycznie) natomiast u zwierząt otrzymujących chymostatynę poziom ten był znamienne wyższy.

Tabela 9 Stężenie Ang II w osoczu i wybranych tkankach u szczurów 16-tygodniowych otrzymujących badane związki dożylnie.

Parametr	SHR-16 CH	SHR-16 DMSO	SHR-16 S	SHR-16 RIY	SHR-16 VWIS
<b>Ang II (osocze) [ng/ml]</b>	0,50 ± 0,07 (n=5) #	0,26 ± 0,04 (n=5)	0,39 ± 0,06 (n=5)	0,34 ± 0,03 (n=5) **	0,47 ± 0,03 (n=5)
<b>Ang II (aorta) [ng/g]</b>	11,86 ± 1,18 (n=7)	15,58 ± 4,34 (n=6)	12,08 ± 1,82 (n=6)	46,16 ± 19,68 (n=5)	62,86 ± 14,55 (n=5) *
<b>Ang II (serce) [ng/g]</b>	0,21 ± 0,03 (n=6)	0,18 ± 0,02 (n=6)	0,13 ± 0,02 (n=6)	0,10 ± 0,01 (n=6) **	0,14 ± 0,01 (n=6)
<b>Ang II (nerka) [ng/g]</b>	1,60 ± 0,34 (n=5) #	1,05 ± 0,06 (n=6)	1,32 ± 0,09 (n=5)	0,93 ± 0,07 (n=6) *	0,76 ± 0,06 (n=6) *

Wartość średnia ± SEM; CH-chymostatyna; DMSO – dimetylosulfotlenek; S - sól fizjologiczna; RIY - Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; VWIS - Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; \* $p < 0,05$  vs S; # $p < 0,05$  vs DMSO; \*\* $p < 0,05$  vs VWIS.

### **3.3. Doświadczenia ostre**

#### **3.3.1. Wpływ podawanych substancji na ciśnienie krwi tętniczej i parametry hemodynamiczne nerek**

W każdej z grup szczurów po zakończeniu doświadczenia chronicznego część zwierząt poddawano obserwacji w doświadczeniu ostrym (terminalnym). W trakcie takiej obserwacji rejestrowano parametry krążeniowe nerki, ciśnienie krwi tętniczej oraz wydalanie nerkowe. Po analizie zgromadzonych danych zdecydowano się na przedstawienie wyników z pierwszego okresu (30 min) właściwego pomiaru.

W grupie szczurów będących we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w mierzonych parametrach u zwierząt, które otrzymywały w doświadczeniu chronicznym badane związki w infuzji dożylniej (Tabela 10). Niestety z powodów technicznych liczebności dotyczące pomiaru niektórych parametrów (przede wszystkim pomiaru przepływu krwi przez kończynę dolną) są na tyle niskie, że utrudniają rzetelną interpretację uzyskanych wyników. Z powodu odmiennego pomiaru ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt w doświadczeniu ostrym, wpływu narkozy oraz możliwej różnej wrażliwości zwierząt na narkozę nie podjęto się porównania wartości MBP uzyskanego w tych doświadczeniach z wartościami uzyskanymi w 14 dniu doświadczenia chronicznego u zwierząt czuwających.

W grupie szczurów otrzymujących chymostatynę zaobserwowano istotnie statystycznie niższy przepływ krwi przez korę nerki (CBF) w porównaniu do grupy kontrolnej. Przepływ krwi w tym obszarze nerki był najniższy spośród wszystkich grup zwierząt we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia po dożylnym podaniu badanych związków.

*Tabela 10 Ciśnienie krwi tętniczej i przepływ krwi przez poszczególne warstwy nerki po dożylnym podaniu badanych związków szczurom we wczesnej fazie rozwoju nadciśnienia.*

<b>Parametr</b>	<b>SHR-6 CH</b>	<b>SHR-6 DMSO</b>	<b>SHR-6 S</b>	<b>SHR-6 RIY</b>	<b>SHR-6 VWIS</b>
<b>MBP [mmHg]</b>	148 ± 6 (n=9)	164 ± 5 (n=4)	153 ± 10 (n=4)	167 ± 5 (n=4)	151 ± 8 (n=5)
<b>HR [bpm]</b>	377 ± 21 (n=9)	393 ± 21 (n=4)	379 ± 17 (n=4)	385 ± 26 (n=4)	395 ± 14 (n=5)
<b>IBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	3,1 ± 0,7 (n=3)	3,7 ± 0,3 (n=2)	3,0 ± 1,7 (n=3)	3,2 ± 0,3 (n=4)	2,7 ± 0,5 (n=5)
<b>RBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	4,0 ± 0,3 (n=9)	4,1 ± 1,0 (n=4)	4,0 ± 0,8 (n=4)	4,2 ± 0,7 (n=4)	3,8 ± 0,8 (n=5)
<b>CBF [PU]</b>	461 ± 22 * (n=9)	528 ± 52 (n=4)	655 ± 79 (n=4)	617 ± 33 (n=4)	491 ± 42 (n=5)
<b>OMBF [PU]</b>	166 ± 15 (n=9)	193 ± 41 (n=4)	181 ± 46 (n=4)	228 ± 64 (n=4)	154 ± 11 (n=5)
<b>IMBF [PU]</b>	100 ± 18 (n=9)	105 ± 16 (n=4)	152 ± 16 (n=4)	109 ± 39 (n=4)	117 ± 36 (n=5)

*Wartość średnia ± SEM; MBP (średnie ciśnienie krwi tętniczej); HR (częstość skurczów serca); IBF (przepływ krwi przez tętnicę biodrową); RBF (przepływ krwi przez tętnicę nerkową); CBF (przepływ krwi przez korę nerki); OMBF (przepływ krwi przez rdzeń zewnątrznerki); IMBF (przepływ krwi przez rdzeń wewnątrznerki); \*p<0,05 vs S.*

W Tabeli 11 przedstawiono wyniki z doświadczeń ostrych wykonanych u szczurów po chronicznym doświadczeniu, w którym szczury 6-tygodniowe otrzymywały przez 14 dni badane związki drogą dożylną. W tej grupie zwierząt również nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w mierzonych parametrach.

*Tabela 11 Ciśnienie krwi tętniczej i przepływ krwi przez warstwy nerki po dożołądkowym podaniu badanych związków u szczurów będących w fazie przednadciśnieniowej.*

<b>Parametr</b>	<b>SHR-6 S</b>	<b>SHR-6 RIY</b>	<b>SHR-6 VWIS</b>
<b>MBP [mmHg]</b>	164 ± 6 (n=3)	187 ± 12 (n=3)	163 ± 7 (n=5)
<b>HR [bpm]</b>	376 ± 21 (n=3)	402 ± 35 (n=3)	346 ± 62 (n=5)
<b>IBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	2,4 ± 0,5 (n=3)	2,4 ± 0,6 (n=3)	2,2 ± 0,3 (n=5)
<b>RBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	4,4 ± 0,4 (n=3)	4,2 ± 0,7 (n=3)	4,2 ± 0,5 (n=5)
<b>CBF [PU]</b>	686 ± 60 (n=3)	642 ± 35 (n=3)	680 ± 73 (n=5)
<b>OMBF [PU]</b>	340 ± 90 (n=3)	283 ± 120 (n=3)	216 ± 45 (n=5)
<b>IMBF [PU]</b>	133 ± 28 (n=3)	103 ± 13 (n=3)	90 ± 17 (n=5)

*Wartość średnia ± SEM; MBP (średnie ciśnienie krwi tętniczej); HR (częstość skurczów serca); IBF (przepływ krwi przez tętnicę biodrową); RBF (przepływ krwi przez tętnicę nerkową); CBF (przepływ krwi przez korę nerki); OMBF (przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki); IMBF (przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki).*

W Tabeli 12 przedstawiono wyniki z doświadczeń ostrych wykonanych u szczurów po chronicznym doświadczeniu, w którym szczury 16-tygodniowe otrzymywały przez 14 dni badane związki drogą dożylną. W tej grupie zwierząt również nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w mierzonych parametrach. Po dożylnym podaniu badanych peptydów zaobserwowano wyższy przepływ krwi przez korę nerki w porównaniu do szczurów kontrolnych; z kolei w grupie otrzymującej VWIS zarówno OMBF jak i IMBF były najniższe, choć zmiany te nie były statystycznie istotne. Zaobserwowano silną tendencję ( $p=0,07$ ) do obniżenia przez chymostatynę przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki w porównaniu do kontroli (DMSO).

Tabela 12 Ciśnienie krwi tętniczej i przepływ krwi przez warstwy nerki po dożylnym podaniu badanych związków szczurom w ustalonej fazie nadciśnienia (SHR 16).

Parametr	SHR-16 CH	SHR-16 DMSO	SHR-16 S	SHR-16 RIY	SHR-16 VWIS
<b>MBP [mmHg]</b>	165 ± 8 (n=12)	165 ± 5 (n=10)	179 ± 10 (n=6)	181 ± 12 (n=6)	186 ± 6 (n=6)
<b>HR [bpm]</b>	378 ± 22 (n=11)	347 ± 18 (n=10)	356 ± 12 (n=6)	317 ± 37 (n=6)	333 ± 23 (n=6)
<b>IBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	3,4 ± 0,3 (n=10)	3,4 ± 0,4 (n=10)	2,9 ± 0,4 (n=7)	2,9 ± 1,0 (n=6)	2,8 ± 0,2 (n=6)
<b>RBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	7,8 ± 0,7 (n=12)	8,0 ± 0,8 (n=10)	7,6 ± 0,8 (n=7)	7,4 ± 1,0 (n=6)	8,2 ± 1,0 (n=6)
<b>CBF [PU]</b>	469 ± 66 (n=6)	485 ± 42 (n=3)	409 ± 37 (n=4)	505 ± 46 (n=6)	549 ± 72 (n=6)
<b>OMBF [PU]</b>	195 ± 14 (n=11)	210 ± 29 (n=7)	220 ± 27 (n=7)	211 ± 46 (n=6)	168 ± 30 (n=6)
<b>IMBF [PU]</b>	126 ± 13 (n=7) #	177 ± 22 (n=7)	164 ± 19 (n=7)	176 ± 46 (n=6)	110 ± 27 (n=6)

Wartość średnia ± SEM; MBP (średnie ciśnienie krwi tętniczej); HR (częstość skurczów serca); IBF (przepływ krwi przez tętnicę biodrową); RBF (przepływ krwi przez tętnicę nerkową); CBF (przepływ krwi przez korę nerki); OMBF (przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki); IMBF (przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki); #p=0,07vs DMSO.

W Tabeli 13 przedstawiono wyniki z doświadczeń ostrych wykonanych u szczurów 16-tygodniowych po dożoładkowym podawaniu badanych związków. Szczury otrzymujące dożoładkowo peptyd RIY charakteryzował istotnie wyższy poziom ciśnienia tętniczego krwi w porównaniu do szczurów kontrolnych. Szczury tej grupy charakteryzował również istotnie większy przepływ krwi przez tętnicę nerkową oraz przez rdzeń wewnętrzny nerki w porównaniu do zwierząt otrzymujących peptyd VWIS. W przypadku szczurów otrzymujących chronicznie przez 14 dni peptyd VWIS wartość ciśnienia tętniczego krwi była także wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej,

ale wynik ten nie był istotny statystycznie. Wydaje się, że peptyd RIY ma bardziej korzystny wpływ na ukrwienie nerki niż peptyd VWIS. Grupa szczurów otrzymująca ten tetrapeptyd charakteryzowała się dużo niższym przepływem krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki także w stosunku do grupy kontrolnej, choć brak jest tutaj znamienności statystycznej.

*Tabela 13 Ciśnienie krwi tętniczej i przepływ krwi przez warstwy nerki po dożołądkowym podaniu badanych związków szczurom w ustalonej fazie nadciśnienia (SHR 16).*

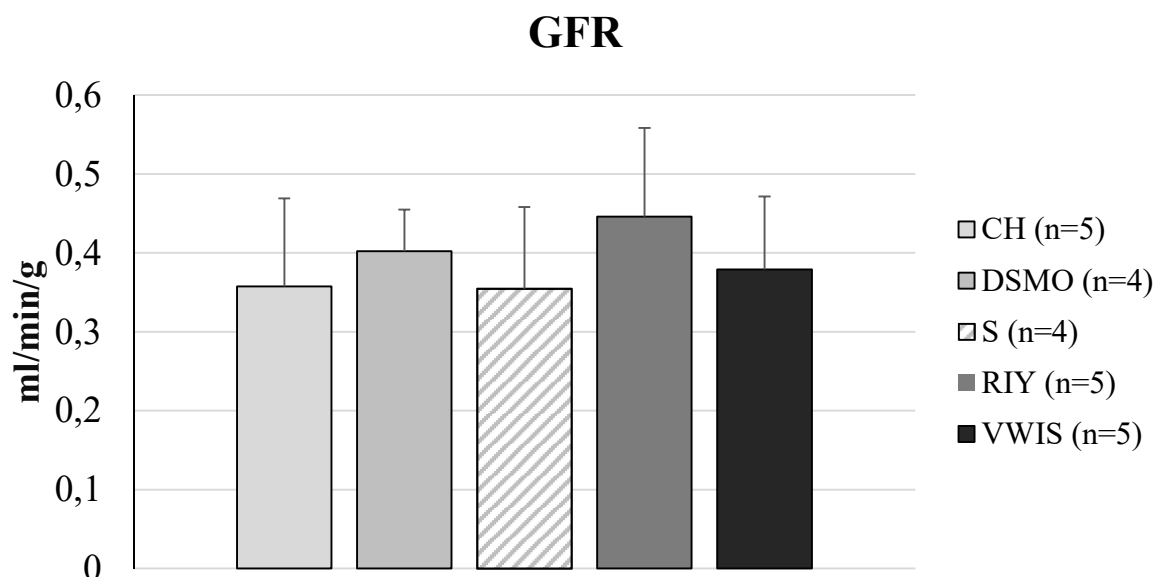
<b>Parametr</b>	<b>SHR-16 S</b>	<b>SHR-16 RIY</b>	<b>SHR-16 VWIS</b>
<b>MBP [mmHg]</b>	156 ± 10 (n=5)	195 ± 6 (n=6) *	175 ± 10 (n=4)
<b>HR [bpm]</b>	340 ± 23 (n=5)	353 ± 26 (n=6)	292 ± 29 (n=4)
<b>IBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	3,7 ± 0,9 (n=4)	3,3 ± 0,7 (n=6)	3,0 ± 0,3 (n=4)
<b>RBF [ml min<sup>-1</sup>]</b>	6,8 ± 0,5 (n=5)	8,2 ± 0,7 (n=6) #	5,2 ± 1,5 (n=4)
<b>CBF [PU]</b>	645 ± 91 (n=5)	617 ± 96 (n=5)	482 ± 100 (n=4)
<b>OMBF [PU]</b>	173 ± 10 (n=5)	197 ± 36 (n=6)	143 ± 20 (n=4)
<b>IMBF [PU]</b>	130 ± 21 (n=5)	148 ± 19 (n=6) ##	75 ± 14 (n=4)

*Wartość średnia ± SEM; MBP (średnie ciśnienie krwi tętniczej); HR (częstość skurczów serca); IBF (przepływ krwi przez tętnicę biodrową); RBF (przepływ krwi przez tętnicę nerkową); CBF (przepływ krwi przez korę nerki); OMBF (przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki); IMBF (przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki); \* $p < 0,05$  vs S; # $p = 0,07$  vs VWIS; ## $p < 0,05$  vs VWIS.*

### 3.3.2. Wpływ podawanych substancji na tempo filtracji kłębuszkowej

We wszystkich badanych grupach tempo filtracji kłębuszkowej wyrażano w przeliczeniu na gram nerki by możliwe było porównanie absolutnych wartości tego parametru u zwierząt w różnym wieku (SHR-6 i SHR-16).

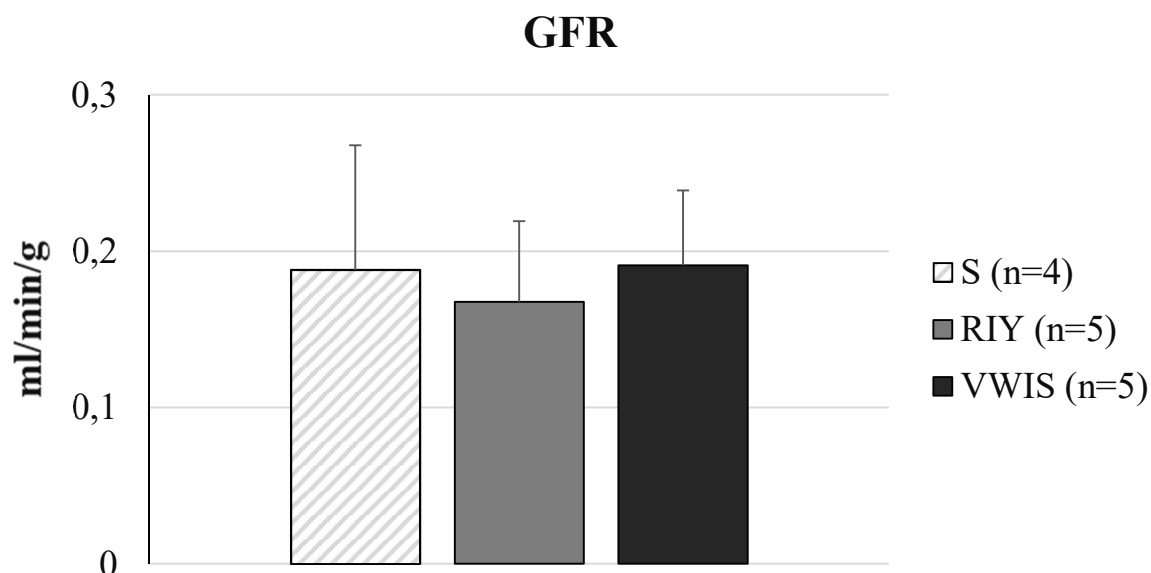
Na Ryc. 24 przedstawiono tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) mierzone w doświadczeniach ostrych w grupach szczurów 6-tygodniowych, otrzymujących w chronicznym doświadczeniu dożylnie przez 14 dni badane związki. W tej grupie zwierząt nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w mierzonych parametrach.



Ryc. 24 Tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych (średnia  $\pm$  SEM) otrzymujących dożylnie w trakcie doświadczenia chronicznego: CH – chymostatynę (2 mg/kg), DMSO – 0,05% dimetylosulfotlenek, S – sól fizjologiczną, RIY – (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; 7,5 mg/kg); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; 12,5 mg/kg).

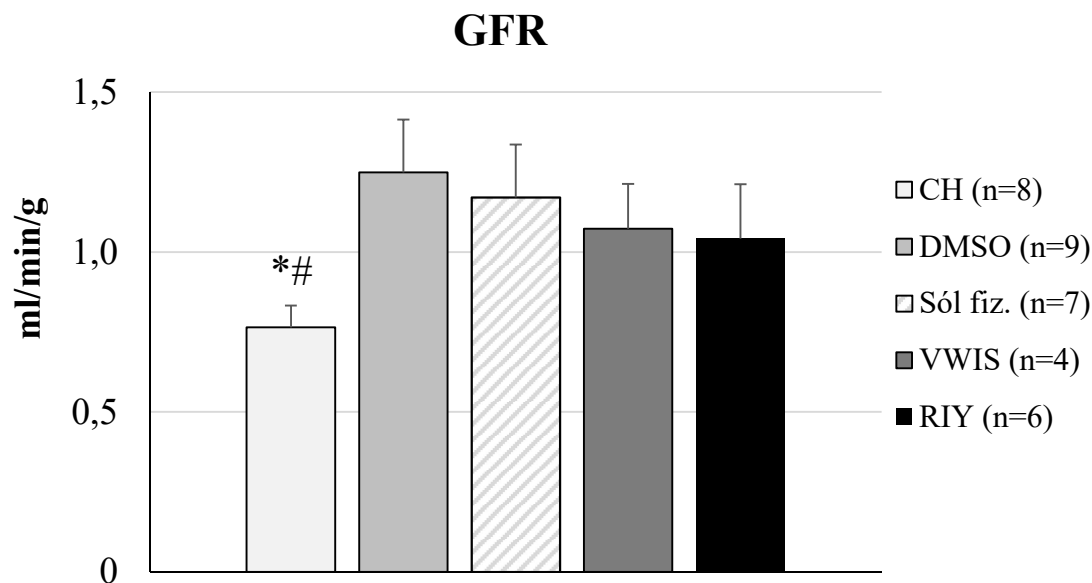


Na Ryc. 25 przedstawiono tempo filtracji kłębuszkowej mierzone w doświadczeniach ostrych w grupach szczurów 6-tygodniowych, które otrzymywały dożołądkowo w chronicznym doświadczeniu (14 dni) badane związki. W tej grupie zwierząt nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w mierzonych parametrach.



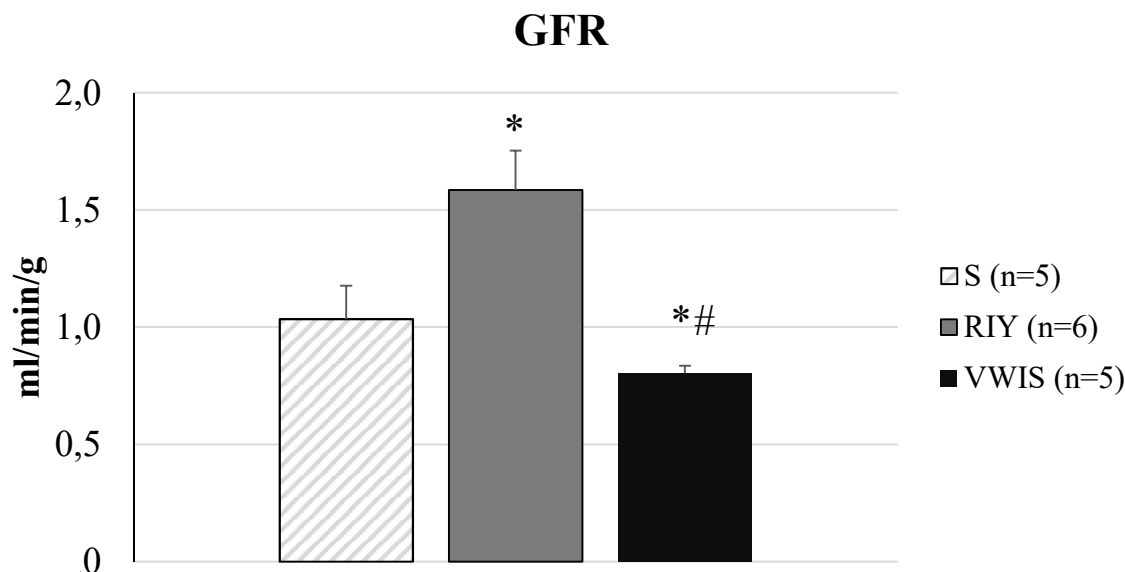
Ryc. 25 Tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) w grupie szczurów SHR 6-tygodniowych (średnia  $\pm$  SEM) otrzymujących dożołądkowo w trakcie doświadczenia chronicznego: S – sól fizjologiczną, RIY – (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; 7,5 mg/kg); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; 12,5 mg/kg).

Na Ryc. 26 przedstawiono tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) mierzone w doświadczeniach ostrych w grupach szczurów 16-tygodniowych SHR, otrzymujących w chronicznym doświadczeniu dożylnie przez 14 dni badane związki. W tej grupie zwierząt zaobserwowano istotnie obniżenie tempa filtracji kłębuszkowej po dożylnym podaniu CH w porównaniu do zwierząt otrzymujących DMSO (kontrola dla chymostatyny) oraz sól fizjologiczną.



Ryc. 26 Tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych (średnia  $\pm$  SEM) otrzymujących dożylnie w trakcie doświadczenia chronicznego: CH – chymostatynę (2 mg/kg), DMSO – 0,05% dimetylosulfotlenek, S – sól fizjologiczną, RIY – (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; 7,5 mg/kg); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; 12,5 mg/kg); \* $p < 0,05$  vs S; # $p < 0,05$  vs DMSO.

Na Ryc. 27 przedstawiono tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) mierzone w doświadczeniach ostrych w grupach szczurów 16-tygodniowych, otrzymujących w chronicznym doświadczeniu dożołądkowo przez 14 dni badane związki. Zaobserwowano istotnie statystycznie wyższe tempo filtracji kłębuszkowej po podaniu peptydu RIY w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie zwierząt otrzymującej drugi z badanych peptydów (VWIS) obserwowano istotnie niższe tempo filtracji kłębuszkowej w porównaniu z kontrolą, a także peptydem RIY.



Ryc. 27 Tempo filtracji kłębuszkowej (GFR) w grupie szczurów SHR 16-tygodniowych, (średnia  $\pm$  SEM) otrzymujących dożołądkowo w trakcie doświadczenia chronicznego: S – sól fizjologiczną, RIY – (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna; 7,5 mg/kg); VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna; 12,5 mg/kg); \* $p < 0,05$  vs S; # $p < 0,05$  vs RIY.

### 3.3.3. Wpływ podawanych substancji na morfologię nerek

Ocenę morfologii nerek przeprowadzono na podstawie preparatów (nerki) wybarwionych hematoksyliną i eozyną oraz barwnikiem van Giesona. Nie zaobserwowano wyraźnych różnic w obrazie mikroskopowym nerek pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Z łatwością dało się wyróżnić trzy warstwy nerki: korę oraz rdzeń zewnętrzny i wewnętrzny.

Kora nerki szczurów SHR charakteryzowała się prawidłowo uporządkowaną strukturą z nielicznymi ubytkami tkanki w grupie szczurów młodych oraz częściej występującymi przerzedzeniami w grupie szczurów dorosłych. Kanaliki nerkowe w tym obszarze wydawały się być lekko poszerzone w każdej z badanych grup. Pojedynczo w grupach szczurów dorosłych pojawiły się mocno uszkodzone struktury kory nerki (w jednym przypadku po dożylnym podaniu roztworu DMSO zaobserwowano liczne uszkodzone kanaliki z lokalnymi ubytkami komórek; w dwóch przypadkach po dożylnym podaniu soli fizjologicznej zaobserwowano liczne uszkodzenia kanalików lub ich poszerzenie, a także liczne uszkodzenia kłębuszków nerkowych; w dwóch przypadkach w grupie szczurów otrzymujących dożołądkowo peptyd RIY widoczne

były liczne uszkodzenia kłębuszków, ubytki tkanki śródmiąższu oraz poszerzone kanaliki).

Rdzeń nerki wykazywał uporządkowaną strukturę w każdej z omawianych grup. Kanaliki nerkowe oraz naczynia przebiegały w nim równolegle, zbiegając w dół do brodawki nerkowej, a następnie wracając w regularny sposób w górę, do kory. Wyraźne rozgraniczenie pomiędzy zewnętrznym a wewnętrznym obszarem rdzenia było łatwo zauważalne w obrazie mikroskopowym. Ściany grubych odcinków kanalików złożonych z komórek o morfologii zbliżonej do korowych odcinków kanalików (komórki sześciennie z centralnie położonym okrągłym jądrem). Cienkie odcinki kanalików charakteryzowały komórki o objętości znacznie mniejszej niż komórki ścian grubego odcinka, z położonym peryferyjnie jądrem o kształcie lekko wydłużonym, przypominającym w przekroju spłaszczone koło.

Zdecydowano się również na oszacowanie indeksu uszkodzenia kłębuszków [74], które wykonano wykorzystując skrawki nerek wybarwione hematoksyliną i eozyną. Na preparacie każdej nerki wybrano losowo pięćdziesiąt kłębuszków, które następnie zostały oszacowane pod mikroskopem świetlnym (obrazy w powiększeniu 200x, fluorescencyjny mikroskop odwrócony Axiovert 25 z kamerą cyfrową AxioCam MRc 5 i oprogramowaniem Axio Vision w wersji 4.8.2; Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA) wg półilościowej skali uszkodzenia: stopień 0 – cały kłębuszek prawidłowy, 1 – uszkodzone do 25% powierzchni kłębuszka, 2 – uszkodzenie w granicach 25-50% powierzchni kłębuszka, 3 – uszkodzenie w granicach 50-75% powierzchni kłębuszka, 4 – uszkodzone 75-100% kłębuszka. Indeks uszkodzenia kłębuszków (GSI) policzono według wzoru:

$$GSI = [(1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4),$$

gdzie  $n_x$  jest liczbą kłębuszków w każdym ze stopni zniszczenia.

Analiza zebranych wyników (Tabela 14) wykazała, że uszkodzenie kłębuszków w grupie szczurów dorosłych otrzymujących dożylnie DMSO było większe w porównaniu do zwierząt otrzymujących chymostatynę. Dorosłe szczury otrzymujące dożylnie peptyd RIY charakteryzował niższy GSI w porównaniu do kontroli (sól fizjologiczna). Podobną tendencję zaobserwowano po dożylnym podaniu peptydu VWIS w grupie szczurów dorosłych.

Tabela 14 Indeks uszkodzenia kłębuszków po dożylnym podaniu badanych związków.

	<b>CH</b>	<b>DMSO</b>	<b>S</b>	<b>RIY</b>	<b>VWIS</b>
<b>SHR-6</b>	0,51±0,07 (n=6)	0,36±0,06 (n=5)	0,48±0,04 (n=5)	0,29±0,05 (n=4)*	0,47±0,11 (n=5)
<b>SHR-16</b>	0,50±0,07 (n=5)#	0,75±0,05 (n=5)	1,04±0,23 (n=5)	0,56±0,09 (n=5) p=0,08vs S	0,55±0,09 (n=5) p=0,08vs S

Wartości średnie ± SEM; CH – chymostatyna; DMSO – dimetylosulfofenek; S – sól fizjologiczna; RIY – (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna); VWIS – (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna); \*p<0,05 vs S; #p<0,05 vs DMSO.

#### 4. Dyskusja

##### **Wpływ badanych substancji na ciśnienie tętnicze krwi i częstość skurczów serca u zwierząt czuwających.**

Układ renina-angiotensyna-aldosteron odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi tętniczej poprzez wiele złożonych mechanizmów. Wzrost aktywności RAAS prowadzi do wzrostu stężenia angiotensyny II w osoczu, a w konsekwencji do rozwoju nadciśnienia. Głównym źródłem powstawania naczyniokurczącej Ang II jest przekształcanie Ang I za pośrednictwem enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) [75]. Stosowana terapia inhibitorami ACE przyczynia się do obniżenia osoczowego poziomu Ang II i aldosteronu, ale jednocześnie następuje podwyższenie osoczowej aktywności reniny i poziomu Ang I przyczyniając się do powstawania Ang II drogą niezależną od ACE [76].

Wiele badań eksperymentalnych, jak i również klinicznych z inhibitorami konwertazy angiotensyny i antagonistami receptora AT<sub>1</sub> wykazało centralną rolę nerkowego RAAS w regulacji BP. Naturalne jest zatem rozważanie jaki jest związek między RAAS zlokalizowanym w nerce a całkowitą kontrolą BP. Dyskusja ta nieuchronnie dotyka tematu lokalnej i systemowej/osoczowej generacji angiotensyny II.

W ostatnich latach pojawiły się istotne doniesienia wskazujące na funkcjonalną rolę wytwarzanej lokalnie angiotensyny II, głównie w mózgu, sercu i nerkach [77]–[81]. Badania z zakresu farmakologii i genetyki, szczególnie te wykorzystujące różnorodne zwierzęta transgeniczne i umożliwiające manipulowanie poziomami kluczowych elementów w obrębie RAAS, pozwoliły ustalić ważną rolę wewnątrznerkowego RAAS w nadciśnieniu tętniczym [79]–[81]. Cechą charakterystyczną wewnątrznerkowego RAAS jest wysoki poziom Ang II, obserwowany w tkance w stężeniu wyższym niż w osoczu [82], [83]. Istnieją obecnie twarde dowody na istnienie wszystkich elementów niezbędnych do wytwarzania Ang II przez wewnątrznerkowy RAAS [76].

Udział chymazy i innych enzymów wrażliwych na chymostatynę (np. elastazy-2) w kontroli ciśnienia tętniczego krwi u szczura jest jednak wciąż dyskutowany. Dane literaturowe pochodzące w większości z badań *in vitro* wskazują na jej istotny udział w przebudowie ścian naczyń krwionośnych w nadciśnieniu tętniczym [84]. Istnieją doniesienia poddające w wątpliwość występowanie chymazy u szczurów [85], choć inne wskazują na występowanie różnych jej podtypów w zależności od gatunku [86], [87]. Badania Guo i wsp. [88] potwierdziły występowanie chymazy w mięśniach

gładkich ścian naczyń krwionośnych u szczura oraz wskazywały na jej wysoką homologię z ludzką chymazą. Stwierdzono, że nadekspresja chymazy prowadzi do wytworzenia nadciśnienia tętniczego oraz do przebudowy naczyń krwionośnych u szczurów i transgenicznych myszy [89]; z kolei w badaniach Kirimura i wsp. [90] potwierdzono udział chymazy w przebudowie ścian naczyń krwionośnych, natomiast wykluczono jej rolę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi.

Badania nad udziałem chymazy i innych niezależnych od ACE szlaków konwersji angiotensyny oraz eksperymentalne próby ingerencji w tkankowy szlak enzymatyczny są nieliczne. Ponadto wydaje się, że próba blokowania chymazy w celu leczenia nadciśnienia czy zapobiegania jego rozwojowi z wykorzystaniem zwierzęcego modelu tej choroby (szczury spontanicznie nadciśnieniowe) z pomiarem i analizą szerokiej gamy parametrów u szczurów czuwających jest pierwszym tak zaplanowanym i przeprowadzonym badaniem.

### ***Chymostatyna***

Wyniki moich badań wskazują, że zablokowanie chymazy przez codzienne, dożylnie podawanie chymostatyny u młodych szczurów zapobiegło tak silnej progresji nadciśnienia (wzrost o ok. 20 mmHg w ciągu 2 tygodni) jaką zaobserwowano u szczurów otrzymujących jej rozpuszczalnik (DMSO). Pewną komplikacją w interpretacji otrzymanych wyników jest efekt podawania soli fizjologicznej, która co prawda głównie stanowi kontrolę dla podawanych dożylnie peptydów z nasion rzepaku, ale można rozważać ją także jako grupę z najmniejszą ingerencją w naturalnie rozwijający się proces wzrostu ciśnienia krwi tętniczej u zwierząt młodych z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem. W tym przypadku nie zaobserwowano wyraźnej progresji ciśnienia skurczowego, natomiast wyraźną tendencję do wzrostu (o ok. 20 mmHg) ciśnienia rozkurczowego (DBP); także i w takim porównaniu podawanie chymostatyny zdaje się zapobiegać progresji DBP. Wyniki te mogą wskazywać na rolę tkankowego szlaku konwersji Ang I w rozwoju nadciśnienia u tych zwierząt, choć brakuje danych w obrębie pozostałych mierzonych przez nas parametrów, które jednoznacznie wspierałyby korzystne efekty blokowania chymazy za pomocą CH u zwierząt młodych (patrz niżej).

Nieco inaczej ukształtowały się wyniki dotyczące udziału tkankowych, wrażliwych na chymostatynę enzymów w regulacji ciśnienia u szczurów dorosłych, z już rozwiniętym nadciśnieniem. Należy w tym miejscu podkreślić, że przedstawione na

Ryc. 7 dane zebrano w innym odstępie czasowym, od momentu podawanej codziennie dawki związku (między 23 a 24 godziną od podania), niż w pozostałych grupach. Różnica ta wynika z błędu metodycznego, który ujawnił się dopiero w trakcie prowadzonych badań, tj. po wykonaniu większości doświadczeń z podawaniem CH i DMSO u szczurów dorosłych. W związku z powyższym nie mamy dostępnych pomiarów telemetrycznych z godziny przed podaniem związku, które w naszej ocenie są pomiarami najmniej zaburzonymi (punkt najbardziej oddalony od ostatniej dziennej dawki leku).

Dwutygodniowe podawanie chymostatyny nie obniżyło ani SBP ani DBP. Co zaskakujące po 14 dniach traktowania CH nastąpił wzrost ciśnienia tętniczego krwi szczególnie w porównaniu do efektu obserwowanego u zwierząt otrzymujących jej rozpuszczalnik (po 14 dniach skurczowe ciśnienie u tych zwierząt CH:  $192 \pm 6$  było istotnie wyższe niż u szczurów otrzymujących DMSO:  $145 \pm 14$  mmHg;  $p < 0,05$ ; Ryc. 8). Analiza uśrednionych z całej doby wartości BP potwierdziła efekt wzrostu BP po 14 dniach podania chymostatyny (D0:  $179 \pm 7$ ; D7:  $178 \pm 7$ ; D14:  $185 \pm 7^{*#}$ ;  $*p < 0,05$  vs D0,  $\#p < 0,05$  vs D7). Niekorzystny efekt blokowania chymazy potwierdzają również nasze wyniki dotyczące poziomu Ang II w tkance (więcej w podrozdziale 4.1.4), które łącznie mogą wskazywać na stymulację osoczowego układu RAAS w następstwie hamowania tkankowego RAAS. Wiadomo, że chymostatyna nie posiada właściwości blokujących wobec enzymu konwertującego ACE (informacja zawarta w opisie produktu nr kat. C7268, firma: Sigma-Aldrich; [91]) a więc powstająca endogennie Ang I, niejako powiększona o pulę angiotensyny „niewykorzystanej” w przekształceniach zależnych od chymazy może być dodatkowym źródłem substratu dla szlaków od ACE zależnych.

Z kolei według doniesień Kirimura i wsp. [90] blokowanie szczurzej chymazy nie wpływa na wartości ciśnienia tętniczego krwi w tym modelu nadciśnienia (SHR) pomimo potwierdzonej w badaniach *in vitro* wysokiej aktywności ACE i chymazy w homogenatach aorty tych szczurów. Wykazano, że wytwarzanie Ang II w tkankach u szczurów SHR jest istotnie wyższe niż u szczurów WKY, natomiast proces ten u SHR jest całkowicie hamowany przez inhibitory ACE, nie zaś przez inhibitory chymazy [90]. Co prawda w przytoczonych badaniach zastosowano inny komercyjny inhibitor chymazy, NK3201, podawany szczurom dożołądkowo w jednorazowej dawce 10 mg/kg, a efekty jego działania obserwowano mierząc skurczowe ciśnienie krwi przy użyciu mankietów okluzyjnych zakładanych na ogon (ang. *tail cuff method*). Pomiar ciśnienia krwi techniką mankietów okluzyjnych jest metodą wysoce nieprecyzyjną; jej



zaletami są nieinwazyjność i prostota, natomiast 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 [92]. Co więcej, u szczurów SHR komponent neurogeny związany z wrażliwością na stres jest istotną przyczyną nadciśnienia u tych szczurów [93]. Na tej podstawie nie da się więc jednoznacznie stwierdzić, że chymaza nie ma udziału w kontroli ciśnienia krwi u szczurów SHR.

We wcześniejszych doświadczeniach ostrych prowadzonych w naszym Zakładzie zaobserwowano istotne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi u dorosłych SHR po dożylnym podaniu tej samej dawki CH, w godzinnej infuzji [94]. Pomimo, że obniżenie BP osiągało istotność statystyczną dopiero w 30 minucie po odstawieniu chymostatyny, wynik ten wskazuje na zależność zmian ciśnienia tętniczego od enzymów wchodzących w skład lokalnych szlaków RAAS u szczurów z rozwiniętym nadciśnieniem.

**Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki (brak długotrwałego hipotensyjnego efektu podawania chymostatyny) mogą wskazywać na prawdopodobieństwo uruchomienia mechanizmu przesunięcia szlaku konwersji Ang I w Ang II w stronę metabolizmu zależnego od ACE, w wyniku dłuższej ingerencji w szlak ACE niezależny.**

### ***Peptydy z nasion rzepaku***

Nieco inaczej niż chymostatyna działają stosowane przez nas po raz pierwszy w badaniach *in vivo*; syntetyczne analogi peptydów pochodzących z nasion rzepaku. Peptydy uzyskane syntetycznie, pod względem budowy były identyczne z ich naturalnymi odpowiednikami. Warto w tym miejscu wspomnieć, że istnieją doniesienia wskazujące na fakt, że syntetyczne peptydy są bezpieczniejsze od tych pozyskiwanych z naturalnych źródeł, ze względu na możliwość uzyskania wysokiej czystości chemicznej i mikrobiologicznej, a także uzyskanie dużej stabilności związku [95]. Dodatkowo w badaniach przeprowadzonych we współpracy z Pracownią Peptydów (Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski) wykazano właściwości blokujące peptydów RIY i VWIS w stosunku do chymazy. Wiadomo również, że wspomniane peptydy wykazują słabą aktywność hamującą w stosunku do ACE [53], stąd też można by przypuszczać, że będą bardziej skuteczne w obniżaniu ciśnienia krwi tętniczej,

hamując dwa kluczowe szlaki powstawania Ang II. Tym samym ich podawanie mogłoby zapobiegać efektom tzw. ucieczki spod stosowanych w klinice inhibitorów ACE (patrz Wstęp podrozdział 1.1.1), a w przypadku prowadzonych przeze mnie badań mogą zapobiegać stymulacji szlaków zależnych od ACE po hamowaniu, przez te same peptydy, chymazy, tj. zapobiegać wystąpieniu efektu analogicznego do obserwowanego, jak się wydaje, po podaniu chymostatyny.

W pracy Marczak [53] dokonano klasyfikacji peptydowych inhibitorów ACE na trzy grupy zależne od ich interakcji z ACE. Badane w niniejszej rozprawie peptydy sklasyfikowano do grupy tzw. pro-leków, czyli cząsteczek, które dopiero w reakcji z enzymem konwertującym ACE przekształcane są do aktywnych inhibitorów. W tej samej pracy [53] wykazano, że po inkubacji peptydu VWIS z ACE, peptyd ten rozpada się do dwupeptydu VW, który jest właściwym inhibitorem ACE, ale nie posiadającym aktywności w stosunku do chymazy (zamieszczone w pracy badania *in vitro*). W przypadku peptydu RIY po inkubacji z ACE tylko niewielka część było przekształcana do dwupeptydu IY.

W badaniach Marczak i wsp. [53] wykazano eksperymentalnie w układzie *in vivo* na szczurach SHR, którym jednorazowo, dożołądkowo podano każdy z opisywanych peptydów (VWIS i VW oraz RIY i IY) antyhipertensyjną skuteczność wszystkich badanych związków, mimo ich stosunkowo niskiej aktywności wobec ACE (porównanie ze znanym inhibitorem jakim jest kaptopril) co zainspirowało nas do dalszych badań, będących przedmiotem niniejszej rozprawy, skoncentrowanych na poszukiwaniu innego miejsca uchwytu dla powstawania Ang II. Jako miejsce to wytypowano chymazę.

### ***RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna)***

Analiza zebranych wyników wskazała na istotne różnice w skuteczności badanych peptydów w zależności od wieku szczurów, czyli fazy rozwoju nadciśnienia oraz drogi podania związków. W moich badaniach podawane dożylnie peptydy u młodych zwierząt będących w fazie rozwoju choroby nie zapobiegały wzrostowi BP. Co więcej, po leczeniu peptydem RIY zaobserwowano istotny wzrost ciśnienia krwi tętnicznej. Wydaje się, że dożylnie podany peptyd RIY osłabiał nieco progresję DBP, choć zmiany te nie były statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej. Podanie peptydu RIY dożołądkowo zapobiegało zarówno wzrostowi ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego w porównaniu do grupy kontrolnej, u której

obserwowano istotny statystycznie wzrost SBP po 2 tygodniach i wzrost DBP po pierwszym tygodniu leczenia. Efekt ten był szczególnie widoczny w trakcie drugiego tygodnia podawania RIY.

U zwierząt dorosłych dożylnie podawany RIY istotnie obniżył skurczowe ciśnienie krwi tętniczej już po 7 dniach podawania i efekt ten utrzymał się do końca obserwacji; nieco słabiej obniżyło się DBP. Efekt dożołądkowego podawania RIY u szczurów 16-tygodniowych nie różnił się od efektu dożołądkowo podawanej soli fizjologicznej; peptyd ten jedynie obniżał częstość skurczów serca (istotnie statystycznie).

W badaniach na szczurach SHR wykonanych przez Yamada i wsp. [54], [71] wykazano także skuteczność peptydu RIY w obniżaniu napięcia naczyń krwionośnych u tych zwierząt. Autorzy przeprowadzili serię badań na izolowanych tętnicach krezkowych pobranych od szczurów SHR w celu zidentyfikowania molekularnego mechanizmu działania RIY. Badania wykonane na tętnicach pozbawionych śródbłonna, w których nie zaobserwowano żadnego efektu naczyniorozszerzającego, wskazują na działanie peptydu RIY w sposób zależny od czynników pochodzenia śródbłonkowego. Jednocześnie wykazano, że efekt naczyniorozszerzający peptydu nie jest mediowany poprzez aktywność tlenu azotu czy bradykininę [54]. W kolejnych doświadczeniach autorzy wykazali, że rozkurcz naczyń pod wpływem RIY może odbywać się poprzez prostacyklinę (PGI<sub>2</sub>) i jej receptor (układ PGI<sub>2</sub>-IP), a następnie w sposób zależny od cholecystokininy (CCK) oraz receptora CCK1. Co ciekawe w moich badaniach, w grupie szczurów dorosłych, u których RIY znacząco obniżył ciśnienie krwi po podaniu dożylnym, zaobserwowałam również istotnie wyższe wydalanie azotanów i azotynów (więcej w podrozdziale 4.1.2). Wynik ten wskazuje, że działanie RIY może odbywać się poprzez NO, co stoi niejako w sprzeczności z omówionymi powyżej badaniami. Należy jednak pamiętać, że eksperymenty na izolowanych tkankach, takich jak tętnice krezkowe, różnią się znacząco od badań funkcjonalnych na zwierzętach, w których obserwowany efekt czynnościowy jest zależny od złożonych interakcji wielu fizjologicznych układów regulujących i zmian w różnych obszarach krążeniowych, których regulacja może być odmienna.

Kolejnym elementem układu RAAS, na który warto zwrócić uwagę jest obecność, oprócz angiotensyny I, także innych cząsteczek angiotensynowych, które mogą być przekształcane do Ang II. Wskazuje się wręcz, że angiotensyna 1-12 [Ang(1-12)] jest lepszym substratem dla chymazy niż Ang I u dorosłych szczurów [96].

Dodatkowo dowiedziono, że to właśnie chymaza, a nie ACE, jest głównym źródłem syntezy Ang II z Ang (1-12) w sercu [20], [23], [24], [96]. Jednocześnie coraz więcej wiadomo o istnieniu i roli niektórych elementów RAAS zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo [97]. Wewnątrzkomórkowa Ang II oraz renina mogą zaburzać komunikację między komórkami (*ang. cell-to-cell*), a także przyczyniać się do rozwoju zaburzeń rytmu serca. Te odkrycia mogą wyjaśnić brak skuteczności stosowanych inhibitorów ACE i blokerów receptorów dla angiotensyny (ARB) do hamowania nadaktywności RAAS w chorobach układu sercowo-naczyniowego, ponieważ nie docierają do miejsc wewnątrz komórki, w których może występować biotransformacja Ang (1-12) do Ang II. Jako jedną z proponowanych strategii rozwoju terapii nadciśnienia wskazuje się właśnie poprawę docierania stosowanych leków do wnętrza komórek serca oraz nerki, gdzie mogłyby skutecznie blokować główny enzym odpowiedzialny za syntezę Ang II, czyli chymazę [98]. Co ciekawe zastosowany przez nas peptyd RIY, ze względu na zawartość w swojej strukturze aminokwasu argininy, mógłby potencjalnie pokonywać błonę komórkową i działać również we wnętrzu komórki. Tak zwane peptydy penetrujące komórki (CPPs; *ang. cell-penetrating peptides*) są to małe cząsteczki kilku aminokwasowe, które mogą wnikać do wnętrza komórek, wspomagać pobieranie do jej wnętrza innych peptydów oraz białek, głównie poprzez mechanizm oparty na endocytozie [99]. Wyróżnia się kilka klas CPP, jedną z których stanowią związki zbudowane z pozytywnie naładowanych aminokwasów takich jak arginina wchodząca w skład RIY.

**Prawdopodobne jest więc, że wyższa skuteczność zastosowanego peptydu może wynikać nie tylko z posiadania właściwości hamującej wobec obu głównych enzymów konwertujących Ang I (ACE i chymaza), ale także ze zdolności do wnikania do wnętrza komórek, gdzie peptyd ten mógłby blokować chymazę i syntezę Ang II z Ang (1-12).** Do potwierdzenia tej hipotezy niezbędne są dalsze badania nad właściwościami tego peptydu i jego zdolnością do penetracji błony komórkowej.

#### ***Peptyd VWIS (Walina-Tryptofan-Izoleucyna-Seryna)***

Drugim z włączonych do badań peptydów, był tetrapeptyd VWIS. Jak wspomniano już wcześniej (patrz podrozdział 1.1.6) peptyd ten charakteryzuje większa aktywność względem ACE niż w przypadku peptydu RIY. Co więcej, z badań Marczak

i wsp. [53] wynika, że VWIS jest w znacznym stopniu przekształcany przez ACE do dwupeptydu VW, który jest właściwym inhibitorem ACE.

W badaniach [53] wykazano również, że peptyd VWIS jest mniej skuteczny u szczurów starych w porównaniu do młodszych, co mogłoby potwierdzać jego większą zdolność do blokowania ACE, bez szczególnego wpływu na inne miejsca uchwytu (np. chymaza), w przeciwieństwie do RIY.

W naszych badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurach SHR (wczesna i ustalona faza nadciśnienia) nie zaobserwowano obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, które mogłoby pozwolić na wnioskowanie o hipotensyjnym efekcie peptydu VWIS. Dostępne dane literaturowe tylko w niewielkim stopniu zawierają informacje dotyczące działania tego peptydu. Wiadomo, że VWIS w obecności ACE szybko rozpada się do dwupeptydu VW. W badaniach Marczak i wsp. [53] stosunkowo krótka (8h) obserwacja ciśnienia krwi tętniczej u SHR (po jednorazowym podaniu dożołądkowym) wykazała przejściową, ale istotną skuteczność antyhipertensyjną zarówno VWIS, jak i VW. Najgłębszy efekt hipotensyjny zaobserwowano po 2h od podania, po czym wartość BP wróciły do poziomu wyjściowego [53]. Na podstawie przytoczonych wyników można było przypuszczać, że długotrwałe podawanie (przez dwa tygodnie) pozwoli na otrzymanie stabilnego obniżenia ciśnienia krwi tętniczej u szczurów SHR. Jednakże w naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy znaczącego wpływu badanego peptydu na wielkość BP, co może mieć swoje uzasadnienie w braku równoczesnej blokady wobec ACE i chymazy (patrz wyżej). O ile efekt taki nie był widoczny w krótkotrwałym doświadczeniu, przeprowadzonym w badaniach Marczak i wsp. [53], to przesunięcie substratu na drugi ze szlaków w doświadczeniu chronicznym mógł być w pełni obecny. Zgodnie z przeprowadzonymi na potrzeby projektu badaniami *in vitro*, fragment VW nie wykazywał aktywności blokującej wobec chymazy. **Należy więc uznać za prawdopodobne iż podawany zarówno dożylnie jak i dożołądkowo VWIS uległ rozbiciu na fragmenty, które co najwyżej mogły blokować ACE, ale dużo słabiej niż znane inhibitory (np. kaptopril) pozostając bez wpływu na chymazę.** W tym kontekście nie dziwi istotnie lepsza efektywność RIY, który z dużym prawdopodobieństwem hamuje obydwa kluczowe enzymy dla osoczowej i tkankowej konwersji Ang I w Ang II.

**Zmiany w obrębie parametrów metabolicznych, wydalniczych i osoczowych pod wpływem podawanych związków**

U większości młodych zwierząt w trakcie doświadczenia zaobserwowano istotnie statystyczny wzrost spożycia wody oraz wydalania moczu prawdopodobnie związany z naturalnym rozwojem i dojrzewaniem zwierząt. Warto zwrócić uwagę na fakt, że u szczurów SHR sam rozwój nadciśnienia jest związany z procesem zwiększania diurezy i natriurezy z nadciśnienia (*ang. pressure natriuresis*), którego mechanizm polega na zwiększeniu wydalania wody i jonów sodu w odpowiedzi na podwyższające się ciśnienie krwi tętniczej [100]. Jak się wydaje, zachowanie prawidłowego procesu natriurezy z nadciśnienia nie jest wystarczające, dla utrzymania ciśnienia krwi w fizjologicznych granicach normy w grupie szczurów młodych. Szczury genetycznie rozwijające nadciśnienie charakteryzują się także zaburzeniem mechanizmu *pressure natriuresis*, tzn. przesunięciem w prawo krzywej zależności wydalania sodu i wody w zależności od wartości ciśnienia tętniczego [101], co wyraźnie upośledza proces wydalania wody i sodu w pożądanym stopniu, umożliwiając osiągnięcie równowagi wodno-elektrolitowej dopiero przy wyższych wartościach ciśnienia krwi. Przesunięcie krzywej zależności BP-wydalanie wody i sodu w prawo (w stronę wyższych ciśnień) prowadzi w konsekwencji do utrwalenia nadciśnienia. Podobny mechanizm dotyczy krążenia nerkowego wskazując na przystosowanie krążenia do wzrastającego ciśnienia tętniczego krwi. U tych szczurów zachowanie autoregulacji przepływu oznacza jednocześnie przesunięcie krzywej autoregulacji w kierunku wyższych wartości ciśnienia tętniczego krwi.

W grupie szczurów młodych otrzymujących chymostatynę lub jej rozpuszczalnik obserwowano wzrost wydalania jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ , przy niezmiennym się ich stężeniu w osoczu. Zablokowanie chymazy po podaniu chymostatyny w tej grupie zwierząt zapobiegło silnej progresji nadciśnienia i możliwe jest iż zwiększone wydalanie jonów może być mechanizmem odpowiedzialnym za spowolnienie wzrostu BP. Z drugiej strony obserwacja tego samego efektu po podaniu rozpuszczalnika wskazuje na niespecyficzność efektu CH i skłania raczej do powiązania tego efektu z opisanym powyżej procesem *pressure natriuresis*, ponieważ obserwowano u nich również duży wzrost ciśnienia krwi tętniczej. Pozostałe mierzone parametry pozostawały niezaburzone w czasie dwutygodniowego eksperymentu.

Zarówno dożylnie, jak i dożołądkowo podane peptydy nie wpłynęły na gospodarkę elektrolitową młodych szczurów. Parametry wydalnicze (wydalanie sodu,

potasu i substancji osmotycznie czynnych) oraz osoczowe utrzymywały się w normalnym zakresie dla tych zwierząt.

Zwiększone spożycie wody niezwiązane z większym wydalaniem moczu w grupie kontrolnej, otrzymującej sól fizjologiczną (dożołądkowo) może tłumaczyć wzrost ciśnienia krwi tętniczej i wskazywać pośrednio na upośledzenie mechanizmu diurezy i natriurezy z nadciśnienia, co jest zjawiskiem charakterystycznym dla szczurów SHR w tym wieku [102]–[104]. Należy też podkreślić, że peptyd RIY, niezależnie od drogi podania, nie wpłynął na zwiększenie wydalania sodu z moczem, co mogłoby przyczynić się do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt pozostających w fazie przednadciśnieniowej.

W grupie szczurów dorosłych otrzymujących RIY dożylnie, zarówno spożycie wody jak i wydalanie moczu wzrosły statystycznie istotnie. Wydalanie sodu z moczem było stabilne na przestrzeni dwóch tygodni. Można więc uznać, że bilans przyjmowania i wydalania płynów był niezaburzony. Nie można także w sposób przyczynowy połączyć obniżenia ciśnienia tętniczego krwi ze zwiększonym wydalaniem sodu. Należy w związku z tym przypuszczać, że efekt hipotensyjny zależał od wpływu rozszerzającego na naczynia związanego prawdopodobnie z obniżeniem poziomu krążącej Ang II oraz wzrostem biodostępności NO (omówienie podrozdział 4.1.2). Niższy poziom Ang II w sercu i nerce u SHR-16 po RIY może być także czynnikiem sprzyjającym lepszej funkcji tych narządów, która mogłaby w dłuższej perspektywie (dłuższe niż dwutygodniowe podawanie substancji) wywołać dalsze obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. W celu potwierdzenia tej hipotezy potrzebne jest przeprowadzenie dodatkowych badań z wydłużonym czasem podawania RIY.

W grupie zwierząt dorosłych otrzymujących dożołądkowo badane peptydy nie zaobserwowano znamienych różnic w parametrach metabolicznych, wydalniczych oraz osoczowych poza wydalaniem substancji osmotycznie czynnych, których wzrost charakteryzował wszystkie omawiane grupy. Niespodziewanie najwięcej istotnych zmian w omawianych parametrach zaobserwowano u dorosłych szczurów kontrolnych, otrzymujących sól fizjologiczną dożołądkowo. Zaobserwowano istotnie wyższą diurezę oraz tendencję do zwiększonego wydalania sodu. W tej grupie zwierząt zaobserwowano także zwiększenie stężenia substancji osmotycznie czynnych w osoczu. Zmiana ta może wynikać z faktu, że szczury należące do tej grupy charakteryzowały się większą masą ciała, w porównaniu do szczurów należących do tej samej grupy wiekowej, ale otrzymujących badane związki dożylnie. W grupie zwierząt otrzymujących sól

fizjologiczną obserwowano także obniżenie stężenia sodu i potasu w osoczu. W literaturze wskazuje się na rolę osmoreceptorów w regulacji wydalania sodu po dożołądkowym podaniu soli o różnym stężeniu sodu [105]. W pracy tej wykazano, że stymulacja osmoreceptorów w układzie pokarmowym może powodować wzrost nerkowego wydalania sodu, jednak teoria ta została odrzucona po przeprowadzeniu dokładniejszych badań.

### ***Tempo wydalania azotanów i azotynów***

Tlenek azotu produkowany jest z L-argininy przy udziale kofaktora tetrahydrobiopteryny ( $BH_4$ ) przez trzy różne izoformy syntazy tlenku azotu (endotelialną, eNOS; neuronalną, nNOS oraz indukowalną, iNOS). Związek ten pełni znaczącą rolę w wielu procesach fizjologicznych, wśród nich wymienia się kontrolę napięcia ściany naczyń krwionośnych, ciśnienia krwi tętniczej, hemodynamiki czy wydalania nerkowego [106], [107]. Doniesienia literaturowe wskazują także na jego patofizjologiczną rolę w różnych stanach chorobowych, takich jak szok septyczny, astma czy zespół poreperfuzyjny [108].

Dożylnie podawanie chymostatyny szczurom w fazie przednadcisnieniowej jak i w ustalonym nadciśnieniu nie wywołało zmian w wydalaniu azotanów i azotynów. Co ciekawe tendencję wzrostową w wydalaniu azotanów i azotynów obserwowano u zwierząt młodych, w grupie kontrolnej dla chymostatyny (otrzymującej sam DMSO). Należy przypomnieć, że w tej grupie zwierząt obserwowano dość wyraźny wzrost ciśnienia tętniczego, ale co ważniejsze dużo wyższy wzrost diurezy. Można przypuszczać, że w tym przypadku podwyższenie wydalania metabolitów NO jest w większym stopniu pochodną wzrostu diurezy niż zwiększonej syntezy i biodostępnością NO.

W grupie zwierząt, u których dożylnie podawanie RIY wywołało efekt hipotensyjny (szczury dorosłe) zaobserwowano także istotnie wyższe wydalanie azotanów i azotynów po dwóch tygodniach podawania peptydu. Wydaje się, że efekt działania peptydu może być związany z faktem, iż w skład peptydu wchodzi L-arginina będąca jednocześnie substratem do produkcji tlenku azotu [109]. Przeprowadzone do tej pory badania (w tym też kontrolowane badania kliniczne) nie dają jasnej odpowiedzi, co do roli suplementacji L-argininą [109]. Wskazuje się, że długotrwałe podawanie L-argininy zwiększa syntezę NO oraz łagodzi objawy chorób sercowo-naczyniowych, a jednocześnie inne badania dowodzą braku korzystnego działania tego związku [109].



Istnieje oczywiście prawdopodobieństwo, że zawarta w strukturze RIY arginina mogła w jakimś stopniu przyczynić się do zwiększania puli biodostępnego NO w naszych badaniach, choć wpływ ten wydaje się zanedbywalny.

Ważniejszym skutkiem działania RIY, przekładającym się na zwiększoną ilość NO jest w mojej ocenie blokowanie powstawania Ang II i obniżenie jej poziomu zarówno w osoczu jak i nerkach oraz sercu, w wyniku blokującego działania RIY zarówno na chymazę jak i ACE. Wiadomo, że wysoki poziom angiotensyny II przyczynia się do zależnego od NADPH powstawania wolnych rodników tlenowych (*ang. reactive oxygen species*, ROS) i zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją ROS, a aktywnością układów antyoksydacyjnych, prowadząc m.in. do obniżenia poziomu NO zarówno w wyniku uszkodzenia śródbłonka jak i „zużywania” tej cząsteczki w procesie zmiatania wolnych rodników [110], [111]. Zwiększony stres oksydacyjny jest jedną z cech charakterystycznych dla takich chorób jak nadciśnienie tętnicze [112]–[114]. Należy podkreślić, że tlenek azotu zaangażowany jest w procesy związane nie tylko z przeciwstawianiem się efektom działania Ang II na napięcie naczyń, proliferację komórek czy nerkowe wydalanie sodu, ale także hamuje syntezę ACE i redukuje liczbę receptorów AT<sub>1</sub> [111]. Szczególnie te dwa ostatnie efekty mogą dodatkowo zwiększać hipotensyjne i antyngiotensynogenne działanie RIY, zależne od zwiększonej biodostępności NO. Wynik ten może wskazywać także na poprawę czynności śródbłonka, co miałyby ogromne znaczenie w terapii nadciśnienia i innych chorób sercowo-naczyniowych.

## **Hemodynamika nerek oraz parametry krążeniowe**

### *Ograniczenia metodyczne*

Po zakończeniu doświadczeń chronicznych część zwierząt z każdej grupy poddano badaniom w doświadczeniach w narkozie. Badania te umożliwiały przede wszystkim szczegółową ocenę hemodynamiki nerek oraz wydalania nerkowego uzupełnionego o pomiar filtracji kłębuszkowej (GFR). Należy podkreślić, że wyników pomiaru ukrwienia poszczególnych stref nerki wykonywanych przy użyciu mikroprzepływomierzy typu laser-Doppler nie da się w sposób prosty porównać z wynikami nieinwazyjnych pomiarów prowadzonych w trakcie doświadczenia chronicznego z wykorzystaniem metody obrazowania rezonansu magnetycznego. Te ostatnie pomiary nie wymagają chirurgicznego przygotowania zwierząt, które wiąże się z mobilizacją hormonów naczyniokurczących takich jak noradrenalina czy wazopresyna, czynników parakrynych lub/i neuronalnych a które mogą w istotnym stopniu wpływać na czynność układu krążenia i hemodynamikę nerek, pomimo iż właściwe pomiary zawsze poprzedzone są tzw. okresem wyrównawczym – pozwalającym na stabilizację parametrów układu krążenia i wydalania.

Kolejną trudność stanowi zastosowana narkoza, którą w przypadku pomiarów z wykorzystaniem MRI był izofluran (narkoza wziewna, z której zwierzęta wybudzają się natychmiast po zaprzestaniu jej podawania), natomiast do badań związanych z dość rozległym zabiegiem chirurgicznym konieczna jest narkoza głęboka, umożliwiająca kilkugodzinną obserwację zwierzęcia (thiopental sodu z grupy barbituranów).

Ponadto należy pamiętać, że był to swego rodzaju pomiar punktowy, tzn. obejmował stan organizmu po 14 dniach podawania badanych substancji. Możliwe odniesienia mogą dotyczyć jedynie porównania wyników z doświadczeń ostrych z wynikami z dnia 14 obrazowania (D 14), choć nie będzie ono możliwe dla wszystkich grup badanych, ponieważ nie wszystkie zwierzęta obrazowano metodą MRI (patrz wyżej).

Konieczne trzeba zwrócić uwagę, że w zależności od stanu zwierzęcia np. wyjściowych wartości ciśnienia tętniczego krwi (nieleczone nadciśnienie), różnego poziomu krążących hormonów, stanu nawodnienia etc. wrażliwość na narkozę może być bardzo zróżnicowana. Zróżnicowana wrażliwość odbija się także na wartościach ciśnienia krwi mierzonych w doświadczeniach ostrych. Biorąc pod uwagę szereg w/w ograniczeń nie zdecydowano się na jakiegokolwiek porównania ciśnienia tętniczego krwi

mierzonych u szczurów w narkozie z wartościami uzyskanymi w badaniach u zwierząt czuwających.

Z kolei atutem tego rodzaju badań jest możliwość wnikliwej analizy uzyskanych wyników i ich porównania z ogromnym materiałem zgromadzonym w naszym Zakładzie w wyniku prowadzonych przez wiele lat badań z wykorzystaniem tych metod [115]–[117]. Dotyczą one wielu najróżniejszych aspektów związanych z hemodynamiką i funkcją wydalniczą nerek w stanach fizjologicznych i patologii, z wykorzystaniem szerokiej gamy zwierzęcych modeli nadciśnienia i co ważniejsze tę samą metodologię zastosowano do przebadania zarówno chymostatyny jak i peptydów RIY i VWIS [94], [116] w krótkotrwałej infuzji dożylniej.

W chronicznej części doświadczeń, w wybranych grupach zwierząt wykonano obrazowanie nerek szczurów metodą rezonansu magnetycznego. Badanie wykonano w grupie szczurów dorosłych po dożylnym podaniu tylko wybranych związków. Ze względu na duże trudności metodyczne związane zarówno z właściwym przygotowaniem i ułożeniem zwierzęcia dla uzyskania odpowiedniego, wyraźnego obrazu a także kłopoty z dopracowaniem metody liczenia/szacowania wielkości przepływu przez poszczególne strefy nerki i ogromny koszt badania, zdecydowano się wykonać obrazowanie rezonansem magnetycznym tylko w grupie szczurów dorosłych po dożylnym podaniu chymostatyny, jej rozpuszczalnika oraz soli fizjologicznej. Badanie wykonano także w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY, jednak dokonano zmiany metody obrazowania związanej z wydłużeniem czasu skanowania pojedynczego zwierzęcia, co daje nam pewne ograniczenie nie pozwalając na porównanie mierzonych parametrów pomiędzy grupami. Należy jednak pamiętać, że doświadczenia zaplanowano tak, żeby móc dokonać porównań także w obrębie każdej grupy, z tego względu w dniu 0 każdy szczur otrzymał sól fizjologiczną (dzień kontrolny).

Uzyskane wyniki wskazują na rolę chymazy w kształtowaniu przepływu krwi w korze nerki. Zablockowanie chymazy przez chymostatynę spowodowało obniżenie przepływu krwi w tym obszarze nerki. Wynik ten różni się od tego uzyskanego w doświadczeniu ostrym, podczas którego zaobserwowano niewielki wzrost przepływu krwi w korze nerki w doświadczeniu terminalnym. W tym miejscu należy przypomnieć, że różnica w uzyskanych wynikach z MRI i przepływach uzyskanych w obserwacji z doświadczeń ostrych (w głębokiej narkozie) może wynikać z różnicy zastosowanej

narkozy (patrz wyżej: Ograniczenia metodyczne). Z kolei w grupie szczurów stanowiących kontrolę dla chymostatyny (DMSO) zaobserwowano istotne obniżenie przepływu krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki. Co ciekawe efekt ten nie wystąpił w grupie szczurów otrzymujących chymostatynę (rozpuszczoną w roztworze DMSO), co pośrednio może wskazywać na korzystny efekt działania chymostatyny (blokowania chymazy) na przepływ w tym obszarze nerki, aczkolwiek potwierdzenie tej sugestii wymagałoby dalszych badań.

Odmienne wyniki otrzymano w grupie szczurów otrzymujących peptyd RIY, gdzie zaobserwowano wzrost przepływu krwi w rdzeniu zewnętrznym nerki po siedmiu dniach podawania, jednak po 14 dniach przepływ w tym obszarze ponownie się obniżył do wartości zbliżonej do wartości kontrolnych, w którym szczury otrzymywały sól fizjologiczną. Istotne jest, że ten peptyd w żaden sposób nie upośledzał krążenia nerkowego, co również potwierdzają badania przepływomierzem laser-Doppler (patrz niżej) jak i inne parametry świadczące o poprawie czynności i struktury nerek (obniżony wskaźnik uszkodzenia kłębuszków).

Po zakończeniu chronicznej części doświadczeń zwierzęta poddano obserwacji w doświadczeniu prowadzonym w narkozie (doświadczenia terminalne) w trakcie, którego sprawdzano wpływ podawanych przez dwa tygodnie związków na przepływy wewnątrznerkowe, całkowite ukrwienie nerki, krążenie w tętnicy biodrowej, a także tempo filtracji kłębuszkowej.

Hamowanie chymazy poprzez dożylnie podawanie CH szczurom młodym spowodowało, że ukrwienie kory nerki było u nich istotnie niższe w porównaniu z grupą otrzymującą rozpuszczalnik. Podobny efekt, z tym, że stowarzyszony z tendencją do obniżenia także przepływu przez rdzeń zewnętrzny nerki obserwowano po podaniu VWIS. Należy zwrócić uwagę, że rdzeń zewnętrzny nerki, który jak się przypuszcza pełni istotną rolę w kontroli ciśnienia tętniczego krwi [118] jest obszarem zaangażowanym w intensywny kanalikowy transport elektrolitów i szczególnie wrażliwym na lokalne niedotlenienie. Obniżenie ukrwienia nerki po CH może więc być wynikiem sugerowanego przez nas wzrostu aktywności osoczowego RAAS, po wyłączeniu tkankowego szlaku powstawania Ang II. Dodatkowo zwiększona dostępność Ang I – substratu dla kluczowego w osoczowym RAAS enzymu konwertującego (ACE) może przyczyniać się do tego efektu. Warto też przypomnieć, że u szczurów SHR aktywność ACE jest zwiększona [119].

Podobny efekt obserwowano u szczurów dorosłych po dożylnym podaniu CH. Co ważne w tej grupie zwierząt tempo filtracji kłębuszkowej było istotnie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej, co może wskazywać na niekorzystne efekty wynikające z przesunięcia szlaku konwersji Ang I w stronę przemian zależnych od ACE.

Istotne wydają się zmiany w hemodynamice nerek zaobserwowane u dorosłych szczurów po podaniu dożołądkowym RIY. Pomimo braku jego wpływu na ciśnienie krwi tętniczej u tych szczurów, zaobserwowano wyraźny i istotny statystycznie wzrost tempa filtracji kłębuszkowej (GFR) oraz silną tendencję wzrostową w całkowitym przepływie krwi przez nerkę (RBF). Blokowanie niezależnych szlaków powstawania Ang II po dożylnym podaniu peptydu RIY wydaje się mieć znaczenie dla nerkowej regulacji przepływu krwi tętniczej i ma korzystny wpływ na tempo filtracji kłębuszkowej (Ryc. 27).

Dożołądkowe podanie peptydu VWIS wywołało dość wyraźne upośledzenie hemodynamiki nerek w grupie szczurów dorosłych; w tym przypadku ukrwienie wszystkich warstw nerki było wyraźnie niższe. Dodatkowo tempo filtracji kłębuszkowej w tej grupie zwierząt również było istotnie niższe.

Korzystnie na hemodynamikę nerek i GFR wpływało natomiast podanie peptydu RIY u szczurów dorosłych. Szczególnie duży był wzrost GFR po podaniu dożołądkowym. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tych korzystnych zmian w hemodynamice nerek po podaniu dożylnym jest obniżone stężenie Ang II w nerce i zwiększona produkcja NO.

### **Angiotensyna II w osoczu i tkankach**

Wyniki dotyczące poziomu Ang II u młodych szczurów pokazują na znacznie wyższe jej stężenie w nerce we wszystkich grupach zwierząt (Tabela 8). Może wskazywać to na duży udział nerki w rozwoju nadciśnienia u szczurów młodych z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (wczesna faza rozwoju nadciśnienia). U szczurów młodych otrzymujących peptyd RIY zaobserwowano wzrost stężenia Ang II we wszystkich tkankach a także w osoczu co jest dość zaskakujące (podwyższenie poziomu nie było jednak istotne statystycznie względem pozostałych grup prawdopodobnie ze względu na ich małą liczebność i duży rozrzut danych). Jedynie w przypadku serca wynik pozostawał na granicy istotności statystycznej ( $p=0,05$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej sól fizjologiczną. W przypadku peptydu

VWIS stężenie Ang II było niższe w sercu w porównaniu do grupy kontrolnej (szczury otrzymujące sól fizjologiczną). Zmiana nie była znamienna statystycznie, ale zaobserwowano wyraźną tendencję w tym kierunku ( $p=0,07$ ). W literaturze opisywano znaczący udział powstającej w sercu Ang II w rozwoju nadciśnienia (poprzez działanie szlaków ACE-niezależnych przede wszystkim chymazy).

W wyniku działania chymostatyny w grupie szczurów w ustalonej fazie nadciśnienia obserwowano istotnie wyższy poziom Ang II w osoczu w porównaniu do grupy kontrolnej. U tych samych zwierząt obserwowano także wyższe stężenie Ang II w nerce, co dodatkowo wzmacnia naszą sugestię, że w tej grupie zwierząt doszło do przesunięcia substratu (Ang I nieprzekształcanej przez chymazę) na szlak przemian zależnych od ACE i mobilizacji osoczowego RAAS.

W przypadku szczurów otrzymujących dożylnie przez 14 dni peptyd RIY stężenie Ang II w osoczu jest istotnie niższe w porównaniu do grupy stanowiącej dla nich kontrolę tj. otrzymujących sól fizjologiczną. Zaobserwowano także, że w grupach szczurów którym podawano dożylnie peptydy, stężenie Ang II w aorcie jest znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej czy po leczeniu CH (wynik statystycznie istotny jedynie w przypadku grupy, która otrzymywała peptyd VWIS, i różnił się choć nieznamiennie statystycznie od grupy zwierząt kontrolnych). Stężenie Ang II w nerce w grupach szczurów chronicznie otrzymujących badane peptydy jest istotnie niższe w porównaniu do grupy szczurów kontrolnych (wynik istotny statystycznie) natomiast u zwierząt otrzymujących chymostatynę poziom ten był znamiennie wyższy.

Należy także pamiętać, że znieczulenie zwiększa poziom Ang II w osoczu i nerkach na co wskazują badania przeprowadzone na różnych modelach nadciśnienia zależnego od Ang II [120]. Autorzy pracy w swoich badaniach wykazali, że poziom Ang II u zwierząt znieczulonych i czuwających różnił się, dlatego wyniki badań wykorzystujących znieczulone należy interpretować z pewną ostrożnością. Niemniej jednak z powodu jednakowego schematu pobierania osocza i tkanek oraz jednolitego traktowania próbek uprawnione jest porównywanie otrzymanych wyników pomiędzy grupami.

## **Biomarkery**

W związku z przytoczonymi powyżej trudnościami (rozdział Wyniki) jakie napotkano w oznaczaniu biomarkerów tj. wykorzystaniem testów, które nie spełniały parametrów (czułość, zakres) deklarowanych przez producenta (czego nie można było

przewidzieć przed zakupem wybranych zestawów). Wiązało się to z koniecznością wykonywania wielokrotnych powtórzeń oznaczenia w tych samych próbkach, co nie zawsze było możliwe ze względu na brak materiału. Dotyczy to przede wszystkim młodych szczurów, u których istnieje ograniczona objętość krwi którą można pobrać w odstępach tygodniowych, tak aby nie wpłynąć negatywnie na pozostałe mierzone parametry i dobrostan zwierząt. Jednocześnie pobranie krwi od młodych szczurów stanowi dużo trudniejszą procedurę ze względu na rozmiar zwierząt, a także ich większą wrażliwość na temperaturę i stres związany z unieruchomieniem. Także w przypadku co tygodniowej zbiórki moczu w klatkach metabolicznych często objętość dostępnego moczu była bardzo mała i niewystarczająca do przeprowadzania wszystkich analiz wraz z powtórzeniami. Z tego względu udało się uzyskać precyzyjnego i pełnego obrazu pozwalającego na powiązanie przebiegu/rozwoju nadciśnienia z oznaczanymi w płynach ustrojowych parametrami. Należy także podkreślić, że dwutygodniowy, tj. stosunkowo krótki czas obserwacji był dodatkowym czynnikiem limitującym osiągnięcie tak postawionego celu.

Niemniej jednak oznaczenie wydalania albuminy (UAE) i VEGF oraz stężenia 8-iso-PG (8-isoprostaglandyny) w osoczu, choć tylko w wybranych grupach pozwala wesprzeć interpretację opartą na pozostałych uzyskanych wynikach.

Wyniki dotyczące wydalania VEGF-A w grupie szczurów dorosłych po dożylnym podaniu badanych związków wskazują na jego wzrost po 14 dniach podawania peptydu RIY. Wyniki uzyskane w grupie szczurów kontrolnych wskazujące na obniżenie tego czynnika prawdopodobnie są mało wiarygodne, przy zbyt małej liczebności grupy (n=3) i wymagają dalszych badań aby móc ostatecznie stwierdzić jaki kierunek zmian jest korzystny i może wskazywać na poprawę czynności nerek. Z doniesień naukowych wynika, że stężenie tego czynnika w moczu, natomiast nie w osoczu, wzrasta na długo przed pojawieniem się mikroalbuminurii [121], [122]. VEGF występujący w moczu produkowany jest przede wszystkim przez komórki kłębuszków nerkowych [123] oraz kanalików [121]. Dotychczasowe prace nie zgłębiły jednak problemu na tyle, by ostatecznie określić użyteczność VEGF jako wskaźnika uszkodzenia błony filtracyjnej w praktyce klinicznej. W moich badaniach wszystkie pozostałe parametry czynności nerek wskazują na istotną poprawę ich czynności, co pozostawałoby w sprzeczności z uznaniem zwiększonego wydalania VEGF jako czynnika prognozującego uszkodzenie nerek. Z drugiej strony w badaniach

Olszyńskiego (praca doktorska) [124] uzyskano wyraźną korelację pomiędzy uszkodzeniem kłębuszków nerkowych a wydalaniem VEGF zarówno u szczurów SHR jak i u szczurów, u których wzrost ciśnienia tętniczego krwi był zależny od wysokiego spożycia sodu. Trzeba jednak zauważyć, że wydalanie VEGF we wspomnianych badaniach oparte było na przeliczeniu stężenia VEGF w oparciu o osmolalność moczu, ponieważ brak było dostępnych danych z bezpośredniego pomiaru diurezy minutowej. Ten fakt utrudnia bezpośrednie odniesienie się do wyników uzyskanych przeze mnie w niniejszej pracy.

Kolejnym utrudnieniem jest brak danych z wydalania albumin w tej grupie szczurów, które mogłoby potwierdzić lub zaprzeczyć powiązaniu obydwu parametrów. Pewną tendencję wzrostową w UAE i wydalaniu VEGF zaobserwowano w grupie szczurów dorosłych otrzymujących DMSO. Pamiętamy, że w tej grupie szczurów zaobserwowano najwyższe ciśnienie krwi tętniczej po 14 dniach, co może wskazywać na największą progresję nadciśnienia u tych zwierząt. Nie można jednak pominąć faktu, że w tej grupie zwierząt doszło także do bardzo istotnego wzrostu diurezy, która mogła zaważyć na tempie wydalania tych biomarkerów.

#### *Indeks uszkodzenia kłębuszków*

Indeks uszkodzenia kłębuszków, oszacowany u szczurów będących w fazie rozwoju nadciśnienia wskazywał, że dożylnie podawany peptyd RIY działał nefroprotekcynie – najmniejsze uszkodzenie struktur nerki w tej grupie zwierząt. Szczury będące w ustalonej fazie nadciśnienia, po dożylnym podaniu soli fizjologicznej charakteryzował najwyższy stopień uszkodzenia kłębuszków. Poprawę kondycji kłębuszków zaobserwowano we wszystkich grupach zwierząt, którym podawano związki blokujące powstawanie Ang II. U zwierząt młodych nie stwierdzono takiej zależności.

Indeks uszkodzenia kłębuszków okazuje się być dobrym biomarkerem, u szczurów z utrwalonym nadciśnieniem obniżenie GSI może wskazywać na osłabienie stopnia nadciśnienia i jego następstw z tym, że do jego wykorzystania w klinice konieczna byłaby biopsja nerek, co oczywiście ogranicza możliwość jego szerszego wykorzystania.





#### 4.1. Podsumowanie najważniejszych wyników

Uzyskane wyniki wskazują na zablokowanie chymazy przez codzienne (14 dni), dożylnie podawanie chymostatyny u szczurów w fazie przednadciśnieniowej (szczurów młodych); nie obserwowano u nich silnej progresji nadciśnienia, którą obserwowano u szczurów otrzymujących jej rozpuszczalnik (DMSO). Wynik ten może wskazywać na potencjalną rolę tkankowego szlaku powstawania Ang II w rozwoju nadciśnienia.

Chroniczne, dożylnie podawanie badanych peptydów u zwierząt będących w fazie przednadciśnieniowej nie zapobiegało wzrostowi skurczowego ciśnienia krwi tętniczej (SBP) a nawet w przypadku podania peptydu RIY zaobserwowano istotny wzrost ciśnienia, którego nie zarejestrowano po podaniu jego rozpuszczalnika. Peptydy te osłabiały natomiast progresję rozkurczowego ciśnienia krwi tętniczej (DBP), choć zmiany te nie były statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej. Dożołądkowe podanie peptydu RIY zapobiegało zarówno wzrostowi ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego w porównaniu do grupy kontrolnej, u której obserwowano istotny statystycznie wzrost SBP po 2 tygodniach i wzrost DBP już po pierwszym tygodniu traktowania. Efekt ten był szczególnie widoczny w trakcie drugiego tygodnia podawania RIY. Peptyd VWIS nie wpłynął na kształt krzywych opisujących zmiany ciśnienia tętniczego krwi; były one podobne do tych obserwowanych w grupie otrzymującej rozpuszczalnik.

Wyniki oznaczenia poziomu Ang II u szczurów młodych wskazują na znacznie wyższe jej stężenie w nerce we wszystkich grupach zwierząt leczonych i kontrolnych, co może wskazywać na pierwotny, zależny od nadmiernego powstawania Ang II, udział nerki w rozwoju nadciśnienia genetycznie uwarunkowanego. Po dożylnym podaniu obu peptydów zaobserwowano dość silną tendencję do wzrostu stężenia Ang II w sercu, co jest zmianą niekorzystną.

Codzienne, dożylnie podawanie CH u zwierząt pozostających w utrwalonej fazie nadciśnienia nie obniżyło ciśnienia tętniczego krwi. Dwutygodniowe podawanie peptydu VWIS (dożylnie i dożołądkowe) także nie wpłynęło na wielkość ciśnienia tętniczego krwi. Z kolei dożylnie podawanie peptydu RIY obniżyło istotnie zarówno skurczowe jak i rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej; istotne obniżenie po leczeniu peptydem RIY obserwowano już po tygodniu podawania (ok. 10% dla SBP) i ten hipotensyjny efekt utrzymał się przez cały okres obserwacji.

W grupie szczurów młodych obserwowano wzrost spożycia wody i wydalania moczu we wszystkich grupach niezależnie od stosowanego „leczenia”, co prawdopodobnie związane było z toczącym się procesem rozwoju i dojrzewania zwierząt. Istotny statystycznie wzrost wydalania sodu i wody zanotowano również w grupie otrzymującej dożylnie chymostatynę, co może być związane z wyższym, niż w innych grupach ciśnieniem krwi tętniczej i uruchomieniem tzw. mechanizmu pressure diuresis. Po podaniu dożołądkowym badanych peptydów i ich rozpuszczalnika obserwowano tendencję do wzrostu wydalania moczu i wydalania substancji osmotycznie czynnych. Podwyższone przyjmowanie wody niezwiązane z wyższym wydalaniem moczu w grupie otrzymującej 0.9% NaCl mogło przyczynić się do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej w tej grupie. Reasumując, podawanie peptydów zarówno dożylnie jak i dożołądkowo nie wpłynęło na zwiększenie wydalania sodu z moczem, co mogłoby przyczynić się do zahamowania progresji ciśnienia tętniczego krwi u zwierząt pozostających w fazie nadciśnieniowej.

W grupach szczurów bilans przyjmowania i wydalania płynów był niezaburzony. Nie stwierdzono też żadnych zmian w wydalaniu wody i sodu, które mogłyby odpowiadać za efekty hipotensyjne badanych związków.

Wyniki obrazowania metodą rezonansu magnetycznego wykonano tylko dla szczurów będących w ustalonej fazie nadciśnienia, po dożylnym podaniu badanych związków. Zaobserwowano izolowane obniżenie przepływu krwi w korze nerki po 14 dniach podawania chymostatyny. W tej samej grupie szczurów, będących w utrwalonej fazie nadciśnienia i otrzymujących CH, obserwowano także najniższą filtrację kłębuszkową (mierzoną po 14 dniach w doświadczeniach ostrych, w narkozie) jak i o ok. 50% ( $p < 0,05$ ) wyższe stężenie Ang II w nerce. Doszło także do wzrostu stężenia tego hormonu w osoczu. Obserwowano także pewną tendencję do zwiększonego wydalania albuminy z moczem ale zmiana ta nie była statystycznie istotna. Podsumowując wydaje się, że zablokowanie chymazy w grupie szczurów dorosłych prowadzi do pobudzenia osoczowego układu RAAS i wytwarzania Ang II drogą zależną od ACE.

Chroniczne podawanie zwierzętom dorosłym peptydu RIY drogą dożylną obniżyło przepływ krwi w rdzeniu zewnętrznym nerki (obrazowanie rezonansem) ale wywołało też szereg efektów pozytywnych; odnotowano wzrost wydalania azotanów i azotynów (po 14 dniach) wskazujący na poprawę czynności śródbłonna, obniżenie

stężenia Ang II w nerce ( $p < 0,05$ ) oraz wyraźny trend do obniżenia jej poziomu także w osoczu i w sercu. Zaobserwowano wyraźny trend do poprawy ukrwienia kory nerki i obniżenia stopnia uszkodzenia kłębuszków (GSI,  $p = 0,08$ ).

U zwierząt otrzymujących ten sam peptyd drogą dożołądkową również zaobserwowano szereg korzystnych zmian, choć jak wspomniano nie doszło u nich do istotnego obniżenia ciśnienia krwi tętniczej. Po 14 dniach podawania związku obserwowano wzrost hemodynamiki nerek, ok. 50% wzrost GFR oraz istotne obniżenie wskaźnika uszkodzenia kłębuszków. Większość uzyskanych wyników wskazuje, że efekty uzyskane po RIY zależą od zmian hemodynamicznych w układzie krążenia i wydalania, natomiast nie od wpływu na transport kanalikowy.

**Opierając się na badaniach *in vitro*, przedstawionych w niniejsze dysertacji, które wykazały właściwości blokujące peptydu RIY w stosunku do chymazy, a także na danych literaturowych wskazujących na niewielkie powinowactwo do blokowania ACE można sugerować, że korzystne efekty podawania RIY są następstwem, przynajmniej częściowego blokowania obu kluczowych szlaków wytwarzania Ang II.**

Podobnych zmian nie obserwowano po drugim z badanych peptydów VWIS; przeciwnie u zwierząt młodych, zarówno po podaniu dożylnym jak i dożołądkowym, dochodziło do wzrostu ciśnienia rozkurczowego, pewnego upośledzenia hemodynamiki nerek i wzrostu stężenia Ang II w sercu (tylko po podaniu i.v.). Nie zmieniał się też wskaźnik uszkodzenia kłębuszków. Z kolei u zwierząt dorosłych po dożylnym podaniu VWIS obserwowano obniżenie GSI i tendencję do poprawy ukrwienia kory nerki. Podanie dożołądkowe wywołało upośledzenie hemodynamiki nerek i obniżenie GFR (pomiar w doświadczeniach ostrych, w narkozie).

Wydaje się, że brak zakładanej (i zbliżonej do RIY) skuteczności pochodzącego z nasion rzepaku peptydu VWIS wynika z jego rozpadu w układzie pokarmowym i krwionośnym do fragmentów, z których VW jest co prawda słabym blokerem ACE (dane literaturowe) ale nie posiada takich właściwości wobec chymazy (pokazane w dysertacji badania *in vitro*). W związku z powyższym wydaje się, że blokowanie tylko jednego ze szlaków, może w układzie przewlekłym prowadzić do uruchomienia alternatywnego szlaku konwersji angiotensyny, tj. szlaku zależnego od chymazy. Co więcej, w założonej przez nas hipotezie to właśnie tkankowe powstawanie Ang II w warunkach patologicznych ma kluczowe znaczenie dla uszkodzenia narządów i dalszej progresji nadciśnienia.

Przebadany przez nas po raz pierwszy w doświadczeniach chronicznych peptyd RIY wydaje się być związkiem bardzo obiecującym w prewencji nadciśnienia, szczególnie, że jego efekt protekcyjny widoczny był u zwierząt młodych po podaniu dożołądkowym. Ta sama dawka leku skutecznie obniżała też ciśnienie tętnicze krwi u szczurów będących w utrwalonej fazie nadciśnienia, z tym, że efekt ten był obserwowany wyłącznie po podaniu dożylnym. Można przypuszczać, że zwiększenie dożołądkowej dawki u 16-tyg SHR lub/i wydłużenie czasu „leczenia” skutkowałoby także efektem hipotensyjnym u zwierząt z utrwalonym nadciśnieniem. Przesłanką wspierającą takie wnioski są również wyniki dotyczące zmniejszenia uszkodzenia kłębuszków, wydalania metabolitów NO i poziomu Ang II w tkankach, które łącznie wskazywać mogą na korzystny wpływ na narządy zależny od obniżenia poziomu tkankowej Ang II, zarówno w nerce jak i w sercu. Należy podkreślić, że po dożylnym podaniu RIY obserwowano także najniższy poziom Ang II w osoczu, co dodatkowo wspiera nasze wnioski o korzystnym działaniu tego związku w leczeniu i/lub prewencji choroby nadciśnieniowej, której istotnym komponentem sprawczym jest podwyższona aktywność RAAS.

## 4.2. Wnioski

1. Brak długotrwałego hipotensyjnego efektu podawania chymostatyny oraz wzrost osoczkowego poziomu Ang II może wskazywać na prawdopodobieństwo uruchomienia mechanizmu przesunięcia szlaku konwersji Ang I w Ang II w stronę metabolizmu zależnego od ACE, w wyniku dłuższej ingerencji w szlak ACE niezależny (izolowane blokowanie chymazy).
2. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na rolę tkankowego szlaku konwersji Ang I oraz na istotny udział nerki, zależny od nadmiernej ilości wytwarzanej Ang II w tym narządzie, w rozwoju nadciśnienia o podłożu genetycznym..
3. Wyższa skuteczność RIY wydaje się wynikać nie tylko z posiadania właściwości hamującej wobec obu głównych enzymów konwertujących Ang I (ACE i chymaza), ale także, wynikających z jego budowy, zdolności do wnikania do wnętrza komórek, gdzie peptyd ten mógłby blokować chymazę i syntezę Ang II z Ang (1-12).
4. Korzystne efekty blokowania procesu powstawania Ang II po RIY nie zależały od wpływu na czynność wydalniczą nerek, natomiast zależały od zmian hemodynamicznych w układzie krążenia i wydalania.
5. Brak długotrwałego hipotensyjnego efektu podawania VWIS jest prawdopodobnie zależny od jego cięcia w układzie krążenia i pokarmowym na fragmenty, które co najwyżej mogły blokować ACE, pozostając bez wpływu na chymazę.
6. Indeks uszkodzenia kłębuszków oraz wydalanie azotanów i azotynów wydają się być dobrymi biomarkerami stopnia rozwoju nadciśnienia

**Wyniki naszych badań wskazują na hipotensyjny i protekcyjny wobec nerki wpływ RIY po podaniu dożylnym. Wydaje się także, że przedłużenie czasu podawania lub/i zwiększenie dożołądkowej dawki tego peptydu mogłoby nie tylko poprawić funkcję narządów ale wywołać mierzalne efekty hipotensyjne. Reasumując uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał peptydu RIY w leczeniu i/lub prewencji choroby nadciśnieniowej w przyszłości.**

## Literatura

- [1] D. I. Feig and R. J. Johnson, "Hyperuricemia in childhood primary hypertension," *Hypertension*, vol. 42, no. 3, pp. 247–252, 2003.
- [2] A. Miembros *i wsp.*, "2013 ESH/ESC Guidelines for the Management of Arterial Hypertension.," *Blood Press.*, vol. 31, no. 7, pp. 1281–1357, 2013.
- [3] J. Ryszka, M. Banach, *Nadciśnienie tętnicze a nerki. Kontrowersje wokół nefropatii nadciśnieniowej*, 1st ed. Poznań: Termedia Wydawnictwo Medyczne, 2012.
- [4] B. Zahorska-Markiewicz, E. Małecka-Tendera, *Patofizjologia kliniczna. Podręcznik dla studentów medycyny*, 2nd ed. Wrocław: Edra Urban & Partner, 2009.
- [5] A. C. Guyton, "Abnormal renal function and autoregulation in essential hypertension.," *Hypertension*, vol. 18, pp. 49-153, 1991.
- [6] R. Lifton, A. Gharavi, D. Geller, "Molecular Mechanisms of Human Hypertension," *Cell*, vol. 104, pp. 545–556, 2001.
- [7] T. M. Coffman, "Under pressure: The search for the essential mechanisms of hypertension," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 11. pp. 1402–1409, 2011.
- [8] K. E. Bernstein, J. F. Giani, X. Z. Shen, R. A. Gonzalez-Villalobos, "Renal angiotensin-converting enzyme and blood pressure control," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 23, no. 2. pp. 106–112, 2014.
- [9] B. M. Koeppen, B. A. Stanton, *Berne & Levy Physiology*. 2010.
- [10] I. Haulica, W. Bild, D. N. Serban, "Angiotensin peptides and their pleiotropic actions," *JRAAS - J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.*, vol. 6, no. 3, pp. 121–131, 2005.
- [11] K. Domińska, A. Lachowicz-Ochędalska, "Zaangażowanie układu renina-angiotensyna (RAS) w proces kancerogenezy," *Postępy bichemii*, vol. 54, no. 3, pp. 294–300, 2008.
- [12] W. Traczyk, *Fizjologia człowieka w zarysie*. 2013.
- [13] H. E. Yim, K. H. Yoo, "Renin-angiotensin system - Considerations for hypertension and kidney," *Electrolyte and Blood Pressure*. 2008.
- [14] S. a Atlas, "The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition.," *J. Manag. Care Pharm.*, vol. 13, no. 8 Suppl B, pp. 9–20, 2007.
- [15] W. Traczyk, A. Trzebski, *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*, III. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
- [16] R. M. Carey, H. M. Siragy, "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation," *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 3, pp. 261–271, 2003.

- [17] M. Miyazaki, S. Takai, “Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase.,” *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, vol. 24, no. 3. pp. 189–93, 2001.
- [18] M. Bader, “Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, pp. 439–465, 2010.
- [19] S. Ahmad *i wsp.*, “Angiotensin-(1-12): A chymase-mediated cellular angiotensin II substrate,” *Current Hypertension Reports*, vol. 16, no. 5. p. 429, 2014.
- [20] S. Nagata *i wsp.*, “Differential expression of the angiotensin-(1-12)/chymase axis in human atrial tissue,” *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.*, vol. 9, no. 4, pp. 168–180, 2015.
- [21] C. M. Ferrario *i wsp.*, “Cardiac Angiotensin-(1-12) Expression and Systemic Hypertension in Rats Expressing the Human Angiotensinogen Gene,” *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 310, no. 8, pp. 995–1002, 2016.
- [22] S. Nagata, J. Kato, K. Sasaki, N. Minamino, T. Eto, K. Kitamura, “Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 350, no. 4, pp. 1026–1031, 2006.
- [23] S. Ahmad, T. Simmons, J. Varagic, N. Moniwa, M. C. Chappell, C. M. Ferrario, “Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue,” *PLoS One*, vol. 6, no. 12, p. e28501, 2011.
- [24] S. Ahmad *i wsp.*, “Chymase mediates angiotensin-(1-12) metabolism in normal human hearts,” *J. Am. Soc. Hypertens.*, vol. 7, no. 2, pp. 128–136, 2013.
- [25] T. Morikawa *i wsp.*, “Mast cell chymase in the ischemic kidney of severe unilateral renovascular hypertension,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 45, no. 3, pp. 437–624, 2006.
- [26] D. T. Dinh, A. G. Frauman, C. I. Johnston, M. E. Fabiani, “Angiotensin receptors: distribution, signalling and function,” *Clin. Sci.*, vol. 100, pp. 481–492, 2001.
- [27] P. Wielgat and J. J. Braszko, “Participation of the angiotensin receptors AT1, AT2 and AT4 in regulation of cognitive processes,” *Regulation*, vol. 2, no. 2, pp. 213–227, 2006.
- [28] A. Januszewicz, W. Januszewicz, W. Rużyłło, *Antagoniści receptora angiotensyny II w leczeniu chorób układu sercowo naczyniowego*, 1st ed. Kraków: Medycyna Praktyczna, 2006.
- [29] C. Dasgupta and L. Zhang, “Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease,” vol. 16, no. 1–2, pp. 22–34, 2011.
- [30] P. Mehta and K. Griendling, “Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system.,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 292, pp. C82–C97, 2007.
- [31] J. H. Oak i H. Cai, “Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice,” *Diabetes*, vol. 56, no. 1,



pp. 118–126, 2007.

- [32] N. Hill-Kapturczak *i wsp.*, “Angiotensin II-stimulated nitric oxide release from porcine pulmonary endothelium is mediated by angiotensin IV.,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 3, pp. 481–91, 1999.
- [33] A. M. Allen, J. Zhuo, F. A. Mendelsohn, “Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999.
- [34] E. Kaschina, T. Unger, “Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signalling and function,” *Blood Press.*, vol. 12, no. 2, pp. 70–88, 2003.
- [35] M. Ruiz-Ortega *i wsp.*, “Angiotensin II: A key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 21, no. 1, pp. 16–20, 2006.
- [36] M. Horiuchi, W. Hayashida, T. Kambe, T. Yamada, V. J. Dzau, “Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 30, pp. 391–396, 1997.
- [37] M. Horiuchi, J. Y. A. Lehtonen, L. Daviet, “Signaling mechanism of the AT2 angiotensin II receptor: Crosstalk between AT1 and AT2 receptors in cell growth,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 10, no. 10, pp. 391–396, 1999.
- [38] M. de Gasparo, K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, T. Unger, “International union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 52, no. 3, pp. 415–72, 2000.
- [39] S. Nakamura, D. B. Averill, M. C. Chappell, D. I. Diz, K. B. Brosnihan, C. M. Ferrario, “Angiotensin receptors contribute to blood pressure homeostasis in salt-depleted SHR.,” *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 284, no. 1, pp. 164–173, 2003.
- [40] G. Wolf, U. Butzmann, U. O. Wenzel, “The renin-angiotensin system and progression of renal disease: From hemodynamics to cell biology,” *Nephron*, vol. 93, no. 11, pp. 3–13, 2003.
- [41] G. Wolf, E. Ritz, “Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: Pathophysiology and indications,” *Kidney Int.*, vol. 67, no. 3, pp. 799–812, 2005.
- [42] J. Nussberger, G. Wuerzner, C. Jensen, H. R. Brunner, “Angiotensin II Suppression in Humans by the Orally Active Renin Inhibitor Aliskiren (SPP100): Comparison With Enalapril,” *Hypertension*, vol. 39, no. 1, pp. 1–8, 2002.
- [43] A. H. Gradman, R. E. Schmieder, R. L. Lins, J. Nussberger, Y. Chiang, M. P. Bedigian, “Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients,” *Circulation*, vol. 111, no. 8, pp. 1012–1018, 2005.
- [44] C. H. Kleinbloesem *i wsp.*, “Hemodynamics, biochemical effects, and pharmacokinetics of the renin inhibitor remikiren in healthy human subjects,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 53, no. 5, pp. 585–592, 1993.
- [45] J. M. Wood *i wsp.*, “Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective

- renin inhibitor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 308, no. 4, pp. 698–705, 2003.
- [46] D. N. Müller, F. C. Luft, “Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage.,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 1, no. 2, pp. 221–228, 2006.
- [47] T. Rywik, P. Leszek, “Inhibitory reniny - Nowe możliwości blokowania układu renina-angiotensyna-aldosteronu,” *Pol. Prz. Kardiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 301–307, 2008.
- [48] H. Krum, R. E. Gilbert, “Novel therapies blocking the renin-angiotensin-aldosterone system in the management of hypertension and related disorders,” *J. Hypertens.*, vol. 25, no. 1, pp. 25–35, 2007.
- [49] J. L. Pool *i wsp.*, “Aliskiren, an Orally Effective Renin Inhibitor, Provides Antihypertensive Efficacy Alone and in Combination With Valsartan,” *Am. J. Hypertens.*, vol. 20, no. 1, pp. 11–20, 2007.
- [50] S. Şen, S. Sabırlı, T. Özyiğit, Y. Üresin, “Aliskiren: Review of efficacy and safety data with focus on past and recent clinical trials,” *Ther. Adv. Chronic Dis.*, vol. 4, no. 5, pp. 232–241, 2013.
- [51] S. D. Solomon *i wsp.*, “Effect of the direct renin inhibitor aliskiren, the angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy,” *Circulation*, vol. 119, no. 4, pp. 530–537, 2009.
- [52] H.-H. Parving, F. Persson, J. B. Lewis, E. J. Lewis, N. K. Hollenberg, “Aliskiren Combined with Losartan in Type 2 Diabetes and Nephropathy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 23, pp. 2433–2446, 2008.
- [53] E. D. Marczak *i wsp.*, “New antihypertensive peptides isolated from rapeseed,” *Peptides*, vol. 24, no. 6, pp. 791–798, 2003.
- [54] Y. Yamada *i wsp.*, “Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK1 receptor,” *Peptides*, vol. 31, no. 5, pp. 909–914, 2010.
- [55] D. Harrison, A. Vinh, H. Lob, M. Madhur, “Role of the Adaptive Immune System in Hypertension,” *Curr Opin Pharmacol.*, vol. 10, no. 2, pp. 203–207, 2011.
- [56] G. B. Ehret, M. J. Caulfield, “Genes for blood pressure: An opportunity to understand hypertension,” *European Heart Journal*, vol. 34, no. 13, pp. 951–961, 2013.
- [57] M. G. Butler, “Genetics of hypertension ??? current status,” *J. Med. Liban.*, vol. 58, no. 3, pp. 175–178, 2010.
- [58] L. L. Woods, D. A. Weeks, R. Rasch, “Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: Role of nephrogenesis,” *Kidney Int.*, vol. 65, no. 4, pp. 1339–1348, 2004.
- [59] R. J. Johnson, D. I. Feig, T. Nakagawa, L. G. Sanchez-Lozada, B. Rodriguez-

- Iturbe, “Pathogenesis of essential hypertension: Historical paradigms and modern insights,” *Journal of Hypertension*, vol. 26, no. 3. pp. 381–391, 2008.
- [60] H. Kobori, Y. Ozawa, Y. Suzaki, A. Nishiyama, “Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 7, pp. 2073–80, 2005.
- [61] K. Okamoto, K. Aoki, “Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats,” *Jpn. Circ. J.*, vol. 27, no. 3, pp. 282–293, 1963.
- [62] M. Pravenec, P. Klír, V. Kren, J. Zicha, J. Kunes, “An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains,” *J. Hypertens.*, vol. 7, no. 3, pp. 217–21, 1989.
- [63] B. Folkow *i wsp.*, “Physiological aspects of primary hypertension,” *Physiol. Rev.*, vol. 62, no. 2, pp. 347–504, 1982.
- [64] N. C. Trippodo, E. D. Frohlich, “Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat,” *Circ. Res.*, vol. 48, no. 3, pp. 309–319, 1981.
- [65] H. Yamamoto *i wsp.*, “Genetic analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 31, no. 5, pp. 1057–1065, 2013.
- [66] M. Hultström, “Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats,” *Journal of Hypertension*, vol. 30, no. 6. pp. 1087–1091, 2012.
- [67] K. Skov, J. R. Nyengaard, N. Korsgaard, M. J. Mulvany, “Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats,” *J. Hypertens.*, vol. 12, no. 12, pp. 1373–1376, 1994.
- [68] V. R. Omar, J. Palomeque, A. Mattiazzi, “Early apoptosis in different models of cardiac hypertrophy induced by high renin-angiotensin system activity involves CaMKII,” *J Appl Physiol*, vol. 112, no. 12, pp. 2110–2120, 2012.
- [69] M. Yoneda *i wsp.*, “Differential effects of angiotensin II type-1 receptor antisense oligonucleotides on renal function in spontaneously hypertensive rats,” *Hypertension*, vol. 46, no. 1, pp. 58–65, 2005.
- [70] I. Gouldsbrough, G. B. M. Lindop, N. Ashton, “Renal renin-angiotensin system activity in naturally reared and cross-fostered spontaneously hypertensive rats,” *Am. J. Hypertens.*, vol. 16, no. 10, pp. 864–869, 2003.
- [71] Y. Yamada, K. Ohinata, A. W. Lipkowski, M. Yoshikawa, “Rapakinin, Arg-Ile-Tyr, derived from rapeseed napin, shows anti-opioid activity via the prostaglandin IP receptor followed by the cholecystokinin CCK2 receptor in mice,” *Peptides*, vol. 32, no. 2, pp. 281–285, 2011.
- [72] L. Dubourg, A. Hadj-Aïssa, B. Ferrier, “Adaptation of an enzymatic polyfructosan assay to clinical practice,” *Anal. Biochem.*, vol. 405, no. 2, pp. 266–268, 2010.
- [73] T. D. Nolin, I. V. Colaizzi, P. M. Palevsky, G. R. Matzke, and R. F. Frye, “Rapid microtiter plate assay for determination of inulin in human plasma and dialysate,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 28, no. 2, pp. 209–215, 2002.
- [74] C. Maric, K. Sandberg, C. Hinojosa-Laborde, “Glomerulosclerosis and

- tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 15, no. 6, pp. 1546–1556, 2004.
- [75] S. Oparil *i wsp.*, “Hypertension,” *Nature Reviews Disease Primers*. 2018.
- [76] L. Te Riet, J. H. M. Van Esch, A. J. M. Roks, A. H. Van Den Meiracker, A. H. J. Danser, “Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations,” *Circulation Research*. p. vol.116, nos. 6, pp 960-975, 2015.
- [77] L. G. Navar, H. Kobori, M. C. Prieto, R. A. Gonzalez-Villalobos, “Intratubular renin-angiotensin system in hypertension,” *Hypertension*, vol. 57, no. 3. pp. 355–362, 2011.
- [78] T. Yang, C. Xu, “Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1040–1049, 2017.
- [79] J. L. Zhuo, F. M. Ferrao, Y. Zheng, X. C. Li, “New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: A critical review of classical and new paradigms,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 4, no. NOV, 2013.
- [80] H. Kobori, M. Nangaku, L. G. Navar, A. Nishiyama, “The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 251–287, 2007.
- [81] L. G. Navar, M. C. Prieto, R. Satou, H. Kobori, “Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 11, no. 2, pp. 180–186, 2011.
- [82] F. Niimura, S. Okubo, A. Fogo, I. Ichikawa, “Temporal and spatial expression pattern of the angiotensinogen gene in mice and rats,” *Am J Physiol*, vol. 272, no. 1 Pt 2, p. R142–7., 1997.
- [83] T. Yang, C. Xu, “Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1040–1049, 2017.
- [84] S. A. Doggrel, J. C. Wanstall, “Vascular chymase: Pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition,” *Cardiovascular Research*, vol. 61, no. 4. pp. 653–662, 2004.
- [85] M. Miyazaki, S. Takai, D. Jin, M. Muramatsu, “Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 112, no. 3. pp. 668–676, 2006.
- [86] M. Ihara *i wsp.*, “Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta,” *Hypertension*, vol. 33, no. 6, pp. 1399–1405, 1999.
- [87] G. H. Caughey, W. W. Raymond, P. J. Wolters, “Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1480, no. 1–2, pp. 245–257, 2000.
- [88] C. Guo, H. Ju, D. Leung, H. Massaeli, M. Shi, M. Rabinovitch, “A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats,” *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 6, pp. 703–715, 2001.
- [89] H. Ju, R. Gros, X. You, S. Tsang, M. Husain, M. Rabinovitch, “Conditional and

- targeted overexpression of vascular chymase causes hypertension in transgenic mice,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 13, pp. 7469–7474, 2001.
- [90] K. Kirimura *i wsp.*, “Role of chymase-dependent angiotensin II formation in regulating blood pressure in spontaneously hypertensive rats.,” *Hypertens. Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 457–464, 2005.
- [91] M. C. Petrie, N. Padmanabhan, J. E. McDonald, C. Hillier, J. M. C. Connell, J. J. V McMurray, “Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 37, no. 4, pp. 1056–1061, 2001.
- [92] E. Wilde *i wsp.*, “Tail-Cuff Technique and Its Influence on Central Blood Pressure in the Mouse,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 6, no. 6, p. e005204, 2017.
- [93] J. P. Henry *i wsp.*, “Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats.,” *Hypertension*, vol. 21, no. 5, pp. 714–723, 1993.
- [94] M. 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,” *Pr. doktorska*, 2015.
- [95] E. Calce, R. M. Vitale, A. Scaloni, P. Amodeo, S. De Luca, “Air oxidation method employed for the disulfide bond formation of natural and synthetic peptides,” *Amino Acids*, vol. 47, no. 8, pp. 1507–1515, 2015.
- [96] S. Ahmad *i wsp.*, “Primacy of cardiac chymase over angiotensin converting enzyme as an angiotensin-(1-12) metabolizing enzyme,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 478, no. 2, pp. 559–564, 2016.
- [97] W. C. De Mello, L. J. Dell’Itallia, J. Varagic, C. M. Ferrario, “Intracellular angiotensin-(1–12) changes the electrical properties of intact cardiac muscle,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 422, no. 1–2, pp. 31–40, 2016.
- [98] C. M. Ferrario, A. E. Mullick, “Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease,” *Pharmacological Research*, vol. 125. pp. 57–71, 2017.
- [99] J. D. Ramsey, N. H. Flynn, “Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 154. pp. 78–86, 2015.
- [100] A. C. Guyton, T. G. Coleman, H. J. Granger, “Circulation: Overall Regulation,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 34, pp. 13–46, 1972.
- [101] M. Komolova, P. Friberg, M. A. Adams, “Altered vascular resistance properties and acute pressure-natriuresis mechanism in neonatal and weaning spontaneously hypertensive rats,” *Hypertension*, vol. 59, no. 5, pp. 979–984, 2012.
- [102] J. R. Ivy, M. A. Bailey, “Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure,” *J. Physiol.*, vol. 592, no. 18, pp. 3955–3967, 2014.
- [103] T. Takenaka, H. Suzuki, Y. Furukawa, Togata, T. Saruta, “Role of intrarenal renin-angiotensin system on pressure-natriuresis in spontaneously hypertensive rats.,” *Clin Exp Hypertens A*, vol. 12, no. 8, pp. 1377–94, 1990.

- [104] H. Ikenaga, H. Suzuki, N. Ishii, H. Itoh, T. Saruta, "Role of NO on pressure-natriuresis in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats," *Kidney Int.*, vol. 43, no. 1, pp. 205–211, 1993.
- [105] L. J. Andersen, T. U. Jensen, M. H. Bestle, P. Bie, "Gastrointestinal osmoreceptors and renal sodium excretion in humans.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 278, no. 2, pp. 287–294, 2000.
- [106] A. Borgonio, K. Witte, R. Stahrenberg, B. Lemmer, "Influence of circadian time, ageing, and hypertension on the urinary excretion of nitric oxide metabolites in rats," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 111, no. 1, pp. 23–37, 1999.
- [107] M. Herrera, J. L. Garvin, "Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney," *Hypertension*, vol. 45, no. 6, pp. 1062–1067, 2005.
- [108] M. S. Kannan, S. Guiang-, D. E. Johnson:, V. Sc, "Nitric Oxide : Biological Role and Clinical Uses," *Basic Behav. Sci. Indian J Pediatr*, vol. 65, no. 3, pp. 333–345, 1998.
- [109] R. H. Böger, "The pharmacodynamics of L-arginine," *Altern. Ther. Health Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 48–54, 2014.
- [110] A. Fortuño *i wsp.*, "Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension," *J. Hypertens.*, vol. 22, no. 11, pp. 2169–2175, 2004.
- [111] J. González, N. Valls, R. Brito, R. Rodrigo, "Essential hypertension and oxidative stress: New insights.," *World J. Cardiol.*, vol. 6, no. 6, pp. 353–366, 2014.
- [112] A. C. Montezano, R. M. Touyz, "Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 1, pp. 164–82, 2014.
- [113] S. I. Dikalov, Z. Ungvari, "Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension," *Am J Physiol Hear. Circ Physiol*, vol. 305, no. 10, pp. H1417-27, 2013.
- [114] S. R. Datla, K. K. Griendling, "Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension," *Hypertension*, vol. 56, no. 3, pp. 325–330, 2010.
- [115] B. Badzyńska, M. Grzelec-Mojzesowicz, L. Dobrowolski, J. Sadowski, "Differential effect of angiotensin II on blood circulation in the renal medulla and cortex of anaesthetised rats.," *J. Physiol.*, vol. 538, no. Pt 1, pp. 159–166, 2002.
- [116] M. M. Roszkowska-Chojacka *i wsp.*, "Effects of chymostatin, a chymase inhibitor, on blood pressure, plasma and tissue angiotensin II, renal haemodynamics and renal excretion in two models of hypertension in the rat," *Exp. Physiol.*, vol. 100, no. 9, pp. 1093–1105, 2015.
- [117] O. Gawrys *i wsp.*, "Cationic derivative of polyprenol, a potential component of liposomal drug carriers, does not alter renal function in rats," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 116, no. 5, pp. 659–662, 2014.
- [118] A. W. Cowley, *Long-term control of arterial blood pressure*. 1992.
- [119] D. J. Campbell, A. M. Duncan, A. Kladis, S. B. Harrap, "Angiotensin peptides in

- spontaneously hypertensive and normotensive Donryu rats,” *Hypertension*, 1995.
- [120] Z. Husková *i wsp.*, “Effects of anesthesia on plasma and kidney ANG II levels in normotensive and ANG II-dependent hypertensive rats,” *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 29, no. 2, pp. 74–83, 2006.
- [121] N. H. Kim *i wsp.*, “Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy,” *Kidney Int.*, vol. 67, no. 1, pp. 167–177, 2005.
- [122] N. H. Kim *i wsp.*, “Plasma and urinary vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy in Type 2 diabetes mellitus,” *Diabet Med*, vol. 21, no. 6, pp. 545–551, 2004.
- [123] D. R. Cha *i wsp.*, “Vascular endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats.,” *J. Endocrinol.*, vol. 183, no. 1, pp. 183–194, 2004.
- [124] K. H. Olszyński, “Modyfikacja czynności i struktury nerki w zależności od wysokiej podaży sodu – udział wybranych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej,” *Pr. doktorska*, 2013.

## **Aneks - Tabele zbiorcze**

Poniżej znajduje się zestawienie wyników w Tabelach zbiorczych. W Tabeli I, II, III, IV zgromadzono dane pokazujące przebieg ciśnienia tętniczego krwi w dniach: 0, 7, 14. Dane reprezentują uśrednione wartości BP z każdej godziny, to jest przed podaniem (godzina -1) i w ciągu kilku godzin od podania badanych związków (od 1 do 6h oraz uśrednionej z 24-tej godziny). W tabeli V, VI, VII, VIII przedstawiono dane parametrów metabolicznych, wydalniczych i osoczowych.