

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



mgr inż. Olga Gawryś

Wykorzystanie amino-prenoli w próbach
zwiększenia efektywności działania leków
modyfikujących czynność nerek u szczurów

*Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Elżbiety Kompanowskiej-Jezierskiej
w Zakładzie Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych*

Warszawa 2015

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej były realizowane w ramach projektu współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka: „Zastosowanie pochodnych poliizoprenoidów jako nośników leków i regulatorów metabolizmu” (UDA-POIG.01.03.01-14-036/09-00).



Część badań sfinansowano ze środków statutowych Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych IMDiK PAN

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana dzięki wsparciu stypendialnemu ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki w ramach realizacji projektu „Wsparcie przedsiębiorczości naukowców bio tech med poprzez stypendia, staże i szkolenia” (UDA POKL.08.02.01-14-041/09).



Część wyników przedstawionych w niniejszej dysertacji została opublikowana w następujących czasopismach:

1. *Pharmacol Rep.* **2014**, 66, 2, 273-278

„Effects of liposomes with polyisoprenoids, potential drug carriers, on the cardiovascular and excretory system in rats”. Gawrys O, Polkowska M, Roszkowska-Chojecka M, Gawarecka K, Chojnacki T, Swiezewska E, Masnyk M, Chmielewski M, Rafałowska J, Kompanowska-Jeziarska E.

2. *Eur J Lipid Sci Tech*, **2014**, 116, 5, 659-662

„Cationic derivative of polyprenol, a potential component of liposomal drug carriers, does not alter renal function in rats”. Gawrys O, Olszyński KH, Gawarecka K, Swiezewska E, Chojnacki T, Masnyk M, Chmielewski M, Kompanowska-Jeziarska E;

*N*iejsza rozprawa doktorska, będąca zwieńczeniem blisko pięciu lat pracy, nie powstałaby bez merytorycznego i emocjonalnego wsparcia wielu osób.

*E*kspertką w dziedzinie fizjologii nerek, bez której projekt ten nie miałby szans realizacji, była moja Promotor, prof. dr hab. Elżbieta Kompanowska-Jezińska. To jej należą się największe podziękowania za nieocenioną pomoc, cierpliwość i wyrozumiałość, a także za ogromne zaangażowanie w moją pracę. Jestem jej wdzięczna również za okazaną serdeczność w wszystkie rozmowy spoza obszaru pracy naukowej.

*R*azem ze mną codzienne dni pracy na siódmym piętrze, pełne trosk i radości, przeżywali inni pracownicy Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, którym także należą się serdeczne podziękowania. W szczególności prof. dr hab. Januszowi Sadowskiemu za nadzór merytoryczny i językowy oraz doktorantkom – Iwonie Baranowskiej oraz Malwinie Roszkowskiej-Chojeckiej za wszelką pomoc i rewelacyjną atmosferę pracy. Dziękuję również Krzysztofowi H. Olszyńskiemu za współpracę i bezcenny humor, pomagający przetrwać najtrudniejsze chwile.

*K*olejne słowa podziękowania kieruję w stronę prof. dr hab. Ewy Świeżewskiej oraz Katarzyny Gawareckiej z Zakładu Biochemii Lipidów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, zarówno za przygotowanie odpowiednich zawiesin liposomowych, jak i za pomoc merytoryczną przy opracowywaniu wyników.

*I*ntensywna współpraca z prof. dr hab. n. med. Janiną Rafałowską zaowocowała głębokim wejrzeniem tam, gdzie wzrok nie sięga, co umożliwiło uzyskanie obrazów histologicznych i ich analizę. Jestem za to wdzięczna zarówno pani profesor, jak i jej współpracownikom z Zakładu Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej.

Mojej Mamie

SPIS TREŚCI

SKRÓTY	3
STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	10
1. WSTĘP	15
1.1 WPROWADZENIE	15
1.2 ALKOHOLE POLIIZOPRENOIDOWE	16
1.2.1 Budowa i występowanie	16
1.2.2 Biosynteza	18
1.2.3 Właściwości i funkcje	19
1.2.4 Amino-prenole	21
1.3 SYSTEMY DOSTARCZANIA LEKÓW	22
1.3.1 Liposomy – budowa i podział	22
1.3.2 Metody otrzymywania liposomów	23
1.3.3 Liposomowe nośniki substancji aktywnych	24
1.3.4 Podsumowanie	28
1.4 NEFROTOKSYCZNOŚĆ	29
1.4.1 Wysoka podatność nerek na działanie toksyczne substancji	29
1.4.2 Biomarkery i ocena uszkodzeń nerek	31
1.4.3 Podsumowanie	38
1.5 CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LEKÓW	39
1.5.1 Desmopresyna	40
1.5.2 Kandesartan	42
2. CELE BADAŃ	43
3. MATERIAŁY I METODY	44
3.1 ZWIERZĘTA	44
3.2 PRZYGOTOWANIE BADANYCH SUBSTANCJI	44
3.2.1 Jodek heptaprenylotrimetyloamoni (APren-7)	44
3.2.2 Zawiesiny liposomowe	44
3.2.3 Roztwory kontrolne	46
3.3 TOKSYCZNOŚĆ APren-7 (ETAP 1)	46
3.3.1 Doświadczenia chroniczne	47
3.3.2 Doświadczenia ostre	48
3.3.3 Pobieranie narządów	49
3.4 EFEKTYWNOŚĆ DESMOPRESYNY ZAMKNIĘTEJ W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 2)	49
3.4.1 Doświadczenia ostre (ETAP 2.1)	49
3.4.2 Farmakokinetyka desmopresyny (ETAP 2.2)	51
3.5 EFEKTYWNOŚĆ KANDESARTANU ZAMKNIĘTEGO W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 3)	52
3.5.1 Doświadczenia chroniczne	52

3.5.2	Doświadczenia ostre	54
3.5.3	Pobieranie narządów	54
3.6	ANALIZA ZEBRANEGO MATERIAŁU	54
3.6.1	Analiza próbek moczu i krwi	54
3.6.2	Pomiar tempa przesączania kłębuszkowego (GFR)	54
3.6.3	Wykonanie barwień i znakowań na skrawkach parafinowych ...	55
3.6.4	Wykonanie testów ELISA w próbkach moczu i osocza	55
3.7	ANALIZA STATYSTYCZNA	56
4.	WYNIKI	57
4.1	TOKSYCZNOŚĆ APren-7 (ETAP 1)	57
4.1.1	Doświadczenia chroniczne	57
4.1.2	Doświadczenia ostre	62
4.1.3	Analiza histologiczna, parametry morfologiczne i morfometryczne	63
4.2	EFEKTYWNOŚĆ DESMOPRESYNY ZAMKNIĘTEJ W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 2)	66
4.2.1	Doświadczenia ostre (ETAP 2.1)	66
4.2.2	Farmakokinetyka desmopresyny (ETAP 2.2)	76
4.3	EFEKTYWNOŚĆ KANDESARTANU ZAMKNIĘTEGO W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 3)	76
4.3.1	Doświadczenia chroniczne	76
4.3.2	Doświadczenia ostre	87
4.3.3	Analiza histopatologiczna, parametry morfologiczne i morfometryczne	88
5.	DYSKUSJA	93
5.1	TOKSYCZNOŚĆ APren-7 (ETAP 1)	93
5.2	EFEKTYWNOŚĆ DESMOPRESYNY ZAMKNIĘTEJ W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7	99
5.3	EFEKTYWNOŚĆ KANDESARTANU ZAMKNIĘTEGO W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7	104
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	110
7.	PERSPEKTYWY	111
8.	PIŚMIENNICTWO	113

SKRÓTY

- ACE – enzym konwertujący angiotensynę (*ang.* Angiotensin Converting Enzyme)
- ADH, AVP – hormon antydiuretyczny (*ang.* Antidiuretic Hormone), wazopresyna (*ang.* Arginine Vasopressin)
- ANG II – angiotensyna II
- AKI – ostre uszkodzenie nerek (*ang.* Acute Kidney Injury)
- APren – kationowa pochodna alkoholu poliizoprenoidowego (inaczej amino-prenol)
- AT₁ – receptor angiotensynowy typu 1
- BW – masa ciała
- cAMP – cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan
- CBF – przepływ krwi przez korę nerki (*ang.* Cortical Blood Flow)
- CDG – wrodzone zaburzenia glikozylacji (*ang.* Congenital Disorder of Glycosylation)
- Cys C – cystatyna C
- dDAVP – desmopresyna, deamino-D-argininowazopresyna
- DBP – rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej (*ang.* Diastolic Blood Pressure)
- DDS – systemy dostarczania leków (*ang.* Drug Delivery Systems)
- DMAPP – difosforan dimetyloallilu
- DOPE - dioleilo-fosfatydylo-etanoloamina
- eNOS - endotelialna syntaza tlenku azotu
- Epac – białko aktywowane cAMP (*ang.* Exchange Protein Directly Activated by cAMP)
- FDA – amerykańska agencja żywności i leków (*ang.* Food and Drug Administration)
- FPP – difosforan farnezyli;
- GFR – współczynnik przesączania kłębuszkowego (*ang.* Glomerular Filtration Rate)
- GGPP – difosforan geranylgeranyli;
- GPI – glikozylofosfatydyloinozytol
- GPP – difosforan geranyli
- Ht – hematokryt
- HW – masa serca (*ang.* Heart Weight)
- IM – rdzeń wewnętrzny nerki (*ang.* inner medulla);
- IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki (*ang.* Inner-Medullary Blood Flow)
- IPP – difosforan izopentyli
- LUV – duże pęcherzyki jednowarstwowe (*ang.* Large Unilamellar Vesicles)
- LV - masa lewej komory serca (*ang.* Left Ventricle Weight)
- LVH - przerost lewej komory serca (*ang.* left ventricular hypertrophy)

- MBP – średnie ciśnienie krwi tętniczej (*ang.* Mean Blood Pressure)
- MEP – szlak fosforanu metyloerytroli
- MLV – pęcherzyki wielowarstwowe (*ang.* Multilamellar Vesicles)
- MPS – układ fagocytarny (*ang.* mononuclear phagocyte system)
- MVA – szlak mewalonowy (*ang.* mevalonic pathway)
- MVV – liposomy wielopęcherzykowe (*ang.* Multivesicular Vesicles)
- NO – tlenek azotu;
- NO_x – metabolity tlenku azotu
- OM – rdzeń zewnętrzny nerki (*ang.* Outer Medulla);
- OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (*ang.* Outer-Medullary Blood Flow)
- P_{Cr} – stężenie kreatyniny w osoczu
- PFA – roztwór paraformaldehydu
- P_K – stężenie jonów potasowych w osoczu
- P_{Na} – stężenie jonów sodowych w osoczu
- P_{osm} – stężenie substancji osmotycznie czynnych w osoczu
- RAA – układ renina-angiotensyna-aldosteron
- RBF – całkowity przepływ krwi przez nerkę (*ang.* Renal Blood Flow)
- SBP – skurczowe ciśnienie krwi tętniczej (*ang.* Systolic Blood Pressure)
- STD – pasza standardowa
- SUV – małe pęcherzyki jednowarstwowe (*ang.* Small Unilamellar Vesicles)
- SHR – szczury spontanicznie nadciśnieniowe (*ang.* Spontaneously Hypertensive Rats)
- T_{1/2} – okres półtrwania
- UAE – wydalanie albuminy z moczem (*ang.* Urinary Albumin Excretion)
- U_{Na}·V – tempo wydalania jonów sodu
- U_{NO_x}·V – tempo wydalania metabolitów tlenku azotu
- U_K·V – tempo wydalania jonów potasu
- U_{osm}·V – tempo wydalania substancji osmotycznie czynnych
- UV – pęcherzyki jednowarstwowe (*ang.* Unilamellar Vesicles)
- V – diureza
- V_{nR} – receptory dla wazopresyny (n=1 naczyniowy, n=2 nerkowy, n=3 przysadkowy)

STRESZCZENIE

Skutki uboczne wielu obecnie stosowanych leków, czy ich niedostateczna biodostępność stanowią poważny problem medyczny, z którym muszą zmagać się lekarze i sami pacjenci. Istnieje wiele substancji o potwierdzonej skuteczności terapeutycznej, ale ze względu na ich niekorzystne właściwości wywołujące skutki uboczne, nie mogą być stosowane w klinice. Jedną z powszechnie używanych strategii ulepszania terapii jest poszukiwanie substancji pomocniczych, takich jak nośniki leków, które modyfikują drogę terapeutyków w organizmie biorcy. W ten sposób można ułatwić dotarcie substancji aktywnej do miejsca działania, opóźnić jej metabolizm, czy ochronić przed szybkim usuwaniem przez nerki. Wszystkie te działania mogą umożliwić obniżenie dawki substancji aktywnej i tym samym zmniejszenie lub wyeliminowanie niekorzystnych efektów ubocznych leków. Nośniki liposomowe zyskały na przestrzeni ostatnich lat ogromne zainteresowanie ze względu na swoje lipofekcyjne właściwości i szerokie spektrum zastosowań. Skład liposomów, ich wielkość, ładunek oraz strukturę powierzchni można dowolnie modyfikować, tak aby biodystrybucja i działanie niesionego leku w organizmie było optymalne.

Ostatnie badania wykazały, że półsyntetyczne, kationowe pochodne alkoholi poliizoprenoidowych (dalej zwane amino-prenolami lub APren) posiadają lipofekcyjne właściwości – ułatwiają przenoszenie materiału genetycznego do komórek.

Alkohole poliizoprenoidowe stanowią szeroką grupę hydrofobowych polimerów, które występują we wszystkich żywych organizmach, poczynając od bakterii, aż do ssaków. Te liniowe cząsteczki zbudowane są z 5-150 jednostek izoprenowych z grupą hydroksylową (-OH) na końcu alfa (α) i atomem wodoru na końcu omega (ω). Poliizoprenoidy pełnią wiele funkcji w komórkach ale przede wszystkim jako komponenty błon biologicznych wpływają na ich właściwości.

W badaniach biofizycznych potwierdzono, że dzięki zdolności alkoholi-poliizoprenoidowych do tworzenia w błonach domen o strukturze fazy heksagonalnej II, odgrywają one rolę modulatorów błon modelowych, wpływając na ich przepuszczalność i płynność. Amino-prenole zostały uzyskane przez chemiczne przekształcenie grupy wodorotlenowej znajdującej się na końcu α cząsteczki do czwartorzędowej grupy amoniowej, co nadało im specyficzne właściwości, dzięki którym te kationowe lipidy jeszcze łatwiej oddziałują z błonami biologicznymi.

Celem przedstawionej dysertacji było zbadanie właściwości amino-prenoli pod względem ich przydatności w medycynie i farmakologii jako

składników liposomowych nośników leków. Do badań wybrano pochodną zawierającą 7 jednostek izoprenowych (APren-7).

Badania podzielono na trzy zasadnicze zadania. W pierwszym etapie badano toksyczność amino-prenoli, natomiast w drugim i trzecim etapie badano wpływ zamknięcia w nowych nośnikach dwóch wybranych leków o różnej charakterystyce, działaniu i strukturze, na ich skuteczność terapeutyczną, w porównaniu do leków podanych w klasycznych rozpuszczalnikach.

ETAP1: Toksyczność APren-7

Modelem doświadczalnym były samce szczurów Sprague-Dawley, które codziennie przez cztery tygodnie otrzymywały podskórne zastrzyki ze świeżo przygotowanych roztworów: (i) liposomy zbudowane z DOPE (dioleilo-fosfatydylo-etanoloamina) i badanych pochodnych, (ii) „klasyczne” liposomy zbudowane tylko z DOPE lub (iii) wodę do iniekcji. W ciągu czterotygodniowej obserwacji mierzono ciśnienie krwi tętniczej (pomiar na ogonie nieinwazyjną metodą mankietów okluzyjnych), prowadzono obserwacje w klatkach metabolicznych, połączone z dobową zbiórką moczu oraz pobierano próbki krwi do oznaczeń biochemicznych. Część szczurów uśmiercano w celu pobrania narządów do przeprowadzenia analizy histopatologicznej i morfometrycznej, a u pozostałej części szczurów badano czynność układu krążenia i wydalania (doświadczenia ostre w narkozie).

Otrzymane wyniki pozwalają sądzić, że badane amino-prenole nie są toksyczne dla organizmów żywych, przynajmniej w zakresie badanych parametrów. Badane pochodne nie wpłynęły na rozwój, czy dojrzewanie zwierząt. Nie zaobserwowano znaczących różnic między grupami przy porównaniu parametrów metabolicznych, czy osoczowych. Analiza dobowego wydalania albuminy (biomarker uszkodzenia nerek) nie wykazała negatywnego wpływu badanych pochodnych na funkcjonowanie tego narządu. Obraz struktur nerkowych oraz wyniki badań czynnościowych były typowe dla zdrowych szczurów Sprague-Dawley. Wartości wskaźników funkcjonowania układu krążenia (ciśnienie krwi, stan lewej komory serca) także kształtowały się podobnie we wszystkich grupach. Na tej podstawie uznano, że amino-prenole nie są szkodliwe dla organizmów żywych i mogą być dalej badane pod względem ich przydatności jako składników liposomowych nośników leków.

ETAP 2: Efektywność desmopresyny zamkniętej w nośnikach zawierających APren-7

Desmopresyna (dDAVP) jest analogiem wazopresyny (AVP), działającym selektywnie poprzez receptory V₂R dla AVP, powodując jedynie zahamowanie wydalania moczu (działanie antydiuretyczne), a nie

powodując skurcz naczyń krwionośnych. dDAVP jest powszechnie używanym terapeutycznym w leczeniu moczówki prostej, moczenia nocnego, czy diagnostyce i leczeniu zaburzeń krzepnięcia krwi.

Modelem doświadczalnym były szczury Sprague-Dawley, u których po uśpieniu i przygotowaniu chirurgicznym wywoływano stan wzmożonej diurezy wodnej (2,5% roztwór glukozy podany ze stosunkowo dużą prędkością (36 ml/kg/h), w celu zablokowania endogennej wazopresyny oraz umożliwienia zaobserwowania efektu antydiuretycznego dDAVP). Po 30 min. szczurom podawano w krótkiej infuzji dożylniej (60 s) jeden z następujących roztworów: (i) dDAVP w liposomach z APren-7; (ii) dDAVP w wodzie; (iii) puste liposomy z APren-7; (iv) wodę. Przez dwie godziny obserwowano zmiany w diurezie, wydalaniu substancji osmotycznie czynnych oraz osmolalności osocza.

Zaobserwowano opóźnienie efektu hamowania wydalania moczu po podaniu dDAVP w nośniku liposomowym z APren-7, w stosunku do grupy otrzymującej dDAVP w wodzie, ale końcowy efekt antydiuretyczny był bardzo zbliżony w obu grupach. Wydaje się, że stopniowe uwalnianie leku z liposomów zawierających APren-7 przyczyniło się do przedłużenia działania desmopresyny w ustroju, co może być w wielu przypadkach bardzo korzystne (rzadsze dawkowanie leków, ochrona przed degradacją czy wydalaniem nerkowym). Otrzymano też dodatkowe potwierdzenie, że badane pochodne nie są szkodliwe dla szczurów Sprague-Dawley po podaniu dożylnym, przynajmniej w zakresie badanych wskaźników układu krążenia i wydalania.

ETAP 3: *Efektywność kandesartanu zamkniętego w nośnikach zawierających APren-7*

Kandesartan jest lipofilowym lekiem, należącym do grupy sartanów, czyli antagonistów receptorów AT₁ dla angiotensyny II (ANG II), powszechnie używanym w leczeniu nadciśnienia.

Modelem doświadczalnym były szczury spontanicznie nadciśnieniowe (SHR), które codziennie przez dwa tygodnie otrzymywały podskórne zastrzyki ze świeżo przygotowanych roztworów: (i) kandesartan zamknięty w liposomach z APren-7; (ii) kandesartan w „klasycznych” liposomach, zbudowanych tylko z DOPE; (iii) roztwór kandesartanu w PBS zawierającym węglan sodu (w stosunku 24:1) lub (iv) sam rozpuszczalnik (jw.). W ciągu dwutygodniowej obserwacji co drugi dzień zwierzętom mierzono ciśnienie krwi tętniczej (metodą telemetryczną), raz w tygodniu prowadzono obserwacje w klatkach metabolicznych oraz pobierano próbki krwi. Po dwóch tygodniach część szczurów uśmiercano w celu pobrania narządów do przeprowadzenia analizy morfologicznej i morfometrycznej, a u części badano czynność układu krążenia i wydalania (doświadczenia ostre w narkozie).

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że kandesartan podany w liposomowych nośnikach z APren-7 wykazywał lepszą antyhipertensyjną skuteczność w porównaniu do pozostałych grup otrzymujących lek.

Wyraźne różnice między poszczególnymi grupami były widoczne już od 6 dnia podawania leku. Zaobserwowano istotne obniżenie skurczowego ciśnienia tętniczego (SBP) w grupie otrzymującej kandesartan w liposomach z APren-7 w porównaniu do pozostałych grup. Obniżenie SBP pogłębiało się w tej grupie prawie do końca doświadczenia, osiągając maksymalną wartość (najniższe ciśnienie) w dniu 13.

Najwyższą skuteczność kandesartanu podanego w liposomach z APren-7 spośród wszystkich zastosowanych nośników potwierdza także analiza zmian poziomu kreatyniny w osoczu – historycznie jednego z najstarszych i najczęściej badanych biomarkerów układu wydalniczego. Stężenie kreatyniny istotnie obniżyło się jedynie w grupie otrzymującej kandesartan w nośnikach z APren-7, co może świadczyć o poprawie czynności nerek, najprawdopodobniej dzięki największemu obniżeniu ciśnienia krwi tętniczej w wyniku blokowania receptorów AT₁ dla ANG II. Pod uwagę można również brać pewne antyoksydacyjne właściwości samych amino-prenoli.

Na podstawie zaobserwowanych różnic, można przypuszczać, że kandesartan wykazuje lepszą skuteczność antyhipertensyjną po podaniu w nośniku z APren-7. Wydaje się, że lepsza efektywność leku podanego w nowych nośnikach, wynika z obecności samych amino-prenoli. Efekt wywołany podaniem kandesartanu w „klasycznych” liposomach był widoczny później niż dla pozostałych grup otrzymujących lek, a wielkość obniżenia SBP w kolejnych dniach doświadczenia była zbliżona do zaobserwowanej w grupie otrzymującej kandesartan w węglanie sodu.

Podsumowanie

W przedstawionej rozprawie badano potencjalne zastosowanie pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych, zwanych amino-prenolami, jako składników liposomowych nośników leków. Przedstawione powyżej badania można podsumować w kilku punktach:

1. APren-7 podawany podskórnie przez cztery tygodnie szczurom Sprague-Dawley, nie spowodował żadnych zmian w strukturach i czynności układu wydalniczego oraz krążenia; nie miał wpływu na dojrzewanie i wzrost zwierząt. Także po podaniu dożylnym szczurom w uśpieniu nie zaobserwowano negatywnych zmian w badanych parametrach, dlatego wnioskuje się, że nie jest on szkodliwy dla organizmów żywych w zakresie badanych parametrów i może być stosowany jako składnik liposomowych nośników leków.

2. Zamknięcie desmopresyny w liposomach z APren-7 spowodowało niewielkie opóźnienie w jej działaniu, ale końcowy efekt antydiuretyczny był bardzo zbliżony do zaobserwowanego w grupie otrzymującej desmopresynę w wodzie. Wydaje się, że powolne uwalnianie leku z liposomowego nośnika powodujące przedłużenie jego działania może być w wielu przypadkach bardzo korzystne.

3. Zamknięcie kandesartanu w liposomach z APren-7 polepszyło jego antyhipertensyjną skuteczność w porównaniu do kandesartanu rozpuszczonego w roztworze węgłanu sodu oraz zamkniętego w klasycznych liposomach. Wydaje się, że lepsze właściwości nowych nośników, wynikają z obecności samych amino-prenoli, ponieważ jedynie przy ich zastosowaniu kandesartan obniżał poziom kreatyniny w osoczu, wykazując pewne protekcyjne działanie w odniesieniu do nerek.

ABSTRACT

Adverse effects of many currently used drugs or their insufficient bioavailability constitute a major medical problem, which physicians and patients are forced to deal with. Many new compounds were proven to possess beneficial therapeutic activity, but due to severe side effects cannot be used in therapy. Beside searching for new drugs, one of the strategies to improve therapy is to search for auxiliary substances, such as drug carriers, to modify the fate of a drug in the patient's body. Augmented properties of administered drug can be achieved by providing faster target access, delaying the rapid metabolism and/or slowing excretion through the kidneys. This can lead to a decrease in a needed therapeutic dose, thereby adverse effects can be minimized or even eliminated. Liposomal drug carriers have become of interest to researchers, due to their properties and wide spectrum of application. Composition, charge, size and surface of liposomes can be modified in order to achieve optimal drug biodistribution and activity.

Latest research demonstrated that semi-synthetic, cationic derivatives of polyisoprenoid alcohols (amino-prenols, APrens) possess lipofecting properties – they facilitate the transfer of genetic material towards the cells. Polyisoprenoids represent a large and diverse class of naturally occurring hydrophobic polymers, found in almost all living organisms (bacteria, animals, plants). These linear compounds are constructed of 5 to 150 isoprene units with hydroxyl group (-OH) on α end and hydrogen atom on ω end. Polyisoprenoid alcohols play numerous roles in cells, but above all, as structural components of cellular membranes, they modulate their properties. Biophysical studies have proven that polyisoprenoids act as modulators of membranes by influencing their fluidity and permeability owing to the ability to induce hexagonal H_{II} phase formation.

Amino-prenols were obtained by chemical modification (hydroxyl group on α end was replaced by a quaternary ammonium group), which generated specific properties by which these cationic lipids can influence biological membranes more easily.

The aim of presented thesis was to investigate the properties of amino-prenols, regarding their application in medicine and pharmacology as components of liposomal drug carriers. An amino-prenol containing seven isoprene units (APren-7) was selected for research.

The study can be divided into three main phases. In the first stage toxicity of amino-prenols was examined. In the second and third stage the impact of drug encapsulation in newly designed liposomal carriers on effectiveness of selected drugs was tested. Two drugs of different

characteristics, activity and structure were chosen. Effectiveness of encapsulated drugs was compared to activity of drugs administered in classic solvents.

STAGE 1: *Toxicity of APren-7*

Male Sprague-Dawley (SD) rats were injected daily (subcutaneously) with freshly prepared solutions: (i) liposomes built of DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine) and tested amino-prenols, (ii) classic liposomes composed of DOPE only or (iii) water for injection. During four weeks mean arterial blood pressure was measured (non-invasive tail cuff method), observations in metabolic cages were performed, combined with daily urine collection and blood sampling for biochemical analysis. One part of animals from each group was sacrificed and the heart and kidneys were harvested for histopathological and morphometric analysis. The second part of rats was anaesthetized and after surgical preparations, cardiovascular and renal functions were assessed in acute experiments.

The result suggest that the amino-prenols are not toxic to living organisms, at least as assessed on basis of the parameters measured. The derivatives tested did not affect the maturation and development of young rats. Metabolic and plasma parameters were on the same level in all groups. Analysis of urinary albumin excretion (a biomarker of kidney injury) did not reveal any negative impact of the tested derivatives on renal function. Microscopic evaluation of renal structures did not show any histological changes. The results of functional studies under anaesthesia were accorded well with the values measured in healthy SD rats. Cardiovascular parameters, such as arterial blood pressure or left ventricle mass also remained similar in all the groups studied. It is therefore concluded that amino-prenols are not toxic to living organisms and further studies of their potential application as liposome components are justified.

STAGE 2: *Effectiveness of desmopressin encapsulated in liposomes with APren-7*

Desmopressin (dDAVP) is a vasopressin (AVP) analogue acting selectively through V₂ receptors, therefore inducing antidiuretic effect only and deprived of vasoconstrictor activity typical for AVP. dDAVP is a commonly used drug for treatment of diabetes insipidus, nocturnal enuresis and also for the diagnosis and treatment of certain clotting disorders.

In acute experiments, male SD rats were anaesthetised and after surgical preparation, 2.5% glucose solution was administered at high rate (36 ml/kg/h) to suppress endogenous vasopressin release and

induce water diuresis (a state, when large amounts of hypotonic urine are excreted). This protocol made it possible to distinguish the antidiuretic effectiveness of dDAVP administered in two vehicles. After 30 min rats received a short intravenous infusion (30 s) of one of the following solutions: (i) dDAVP in liposomes with APren-7; (ii) dDAVP in water; (iii) empty liposomes with APren-7; (iv) water. Subsequently, the changes in diuresis, total solute excretion and plasma osmolality were recorded for two hours.

Encapsulation of dDAVP in liposomes with APren-7 caused a delay in diuresis inhibition in comparison to the group which received dDAVP in water, but the final level of diuresis in both groups receiving antidiuretic drug was similar. It seems that, due to slower release of dDAVP from liposomal carriers prolongation of its activity in the system occurred, which might be beneficial in many cases (less frequent dosing, protection from degradation or rapid renal excretion). Moreover, we confirmed that amino-prenols, also after intravenous infusion, are not toxic to SD rats, at least as assessed by the measured cardiovascular and renal markers.

STAGE 3: *Effectiveness of candesartan encapsulated in liposomes with APren-7*

Candesartan is a lipophilic drug belonging to sartans family which includes a large group of AT₁ receptor antagonists for angiotensin II (ANG II), commonly used in hypertension treatment.

Spontaneously hypertensive rats (SHR) received daily, for two weeks, subcutaneous injections of one of the following solutions: (i) candesartan encapsulated in liposomes with APren-7; (ii) candesartan in classic liposomes built of DOPE only; (iii) candesartan in sodium carbonate mixed with PBS (in the ratio 1:24, respectively); (iv) vehicle (as described above). Telemetry system was used to measure arterial blood pressure (every two days); observation in metabolic cages with daily urine collection and blood sampling were performed once a week. One part of animals from each group was sacrificed for histological and morphometric analysis of the heart and kidneys and the second part was anaesthetised for cardiovascular and renal function assessment in acute experiments (procedures were similar to those described above in STAGE 1).

The results suggest that candesartan administered in liposomes with APren-7 demonstrated better antihypertensive effectiveness than in other carriers.

Pronounced differences between groups were visible after six days of follow-up studies. A statistically significant decrease in systolic blood pressure (SBP) was observed between the values for candesartan

encapsulated in liposomes with APren-7 group and those in the remaining experimental groups. In the former group a progressing decline in SBP was observed till the 13th day, whereas in the groups which received candesartan in classic liposomes or in sodium carbonate, after 4 days SBP remained at the same level or started to rise again.

Serum creatinine – historically one of the oldest and most frequently studied biomarkers of renal excretory system – significantly decreased only in the group which received candesartan in liposomes with APren-7. This might suggest improvement of renal function, probably related to the greatest reduction in blood pressure in this group. However, some antioxidant properties of amino-prenols *per se* might be taken into consideration.

On the basis of observed differences, it might be suggested that candesartan encapsulated in new liposomes containing the derivatives tested showed enhanced antihypertensive action. It seems that augmented action of candesartan in liposomes with APren-7 is a result of direct activity of tested derivatives *per se* (candesartan administered in classic liposomes without amino-prenols demonstrated relatively lower activity).

Summary

Derivatives of polyisoprenoid alcohols were studied regarding their potential application as components of liposomal drug carriers. The results of these studies can be summarized as follows:

- 1.** APren-7 administered subcutaneously for four weeks did not cause any adverse changes in the structure and functions of excretory and cardiovascular systems of Sprague-Dawley rats nor did it affect maturation and development of the animals. Also after intravenous administration no adverse effects were observed. Thus, it is concluded that the derivative tested is not toxic to living organisms, at least on the basis of the parameters tested, and can be used as a component of liposomal drug carriers.
- 2.** Encapsulation of desmopressin in liposomes with APren-7 resulted in a slight delay in its action but the final antidiuretic effect was on the same level as in the group which received desmopressin in water. It seems that encapsulated desmopressin, due to slower drug release from liposomal carriers, exhibits prolonged action, which can be beneficial in therapeutic application.

3. Candesartan encapsulated in liposomes with APren-7 demonstrated superior antihypertensive activity, compared to candesartan administered in classic liposomes or in sodium carbonate. It appears that improved properties of newly designed carriers can be ascribed to the presence of the derivatives tested. Remarkably, only with their application did candesartan reduce plasma creatinine levels, an indication of renal protective activity.

1. WSTĘP

1.1 WPROWADZENIE

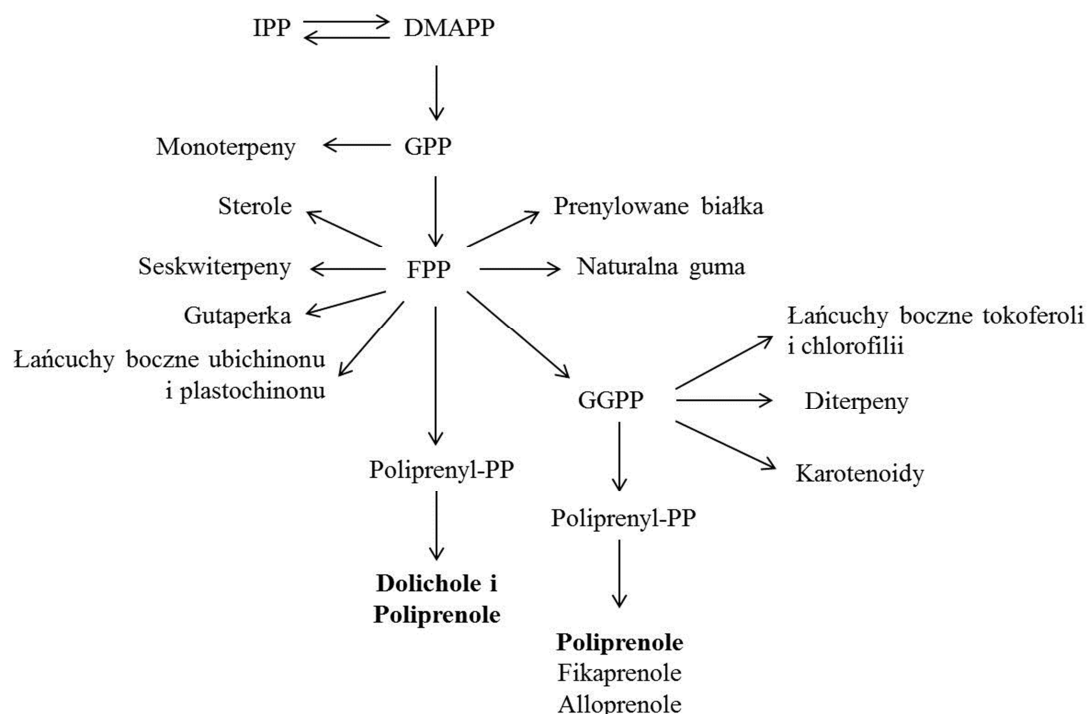
Niniejsza praca, poświęcona nowo zaprojektowanym liposomowym nośnikom leków, zawierającym pochodne alkoholi poliizoprenoidowych, była realizowana w ramach projektu współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka: „Zastosowanie pochodnych poliizoprenoidów jako nośników leków i regulatorów metabolizmu” (UDA-POIG.01.03.01-14-036/09-00). W tym projekcie partnerskim, realizowanym w ramach Konsorcjum naukowego, zaangażowanych było sześć jednostek naukowych: Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Lider Konsorcjum), Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Uniwersytet Jagielloński, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk (IMDiK PAN), Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oraz Stockholm University. Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych (IMDiK PAN) odpowiedzialny był za wykonanie Zadania 5: „Badania wpływu amino-Prenoli na dostępność/efektywność wybranych leków”. Wyniki uzyskane podczas jego realizacji przedstawione są w niniejszej rozprawie doktorskiej.

W części teoretycznej, w kolejnych podrozdziałach opisano zagadnienia kluczowe dla zrozumienia istoty projektu, począwszy od charakterystyki alkoholi poliizoprenoidowych z których wywodzą się badane amino-prenole, poprzez obecny stan wiedzy na temat systemów dostarczania leków, ze szczególnym uwzględnieniem nośników liposomowych. W kolejnym rozdziale zebrano wiadomości dotyczące narzędzi badawczych, jakich użyto w przedstawionej dysertacji. Ostatnia część stanowi krótką charakterystykę wybranych leków (desmopresyna i kandesartan), których użyto do badania potencjalnej przydatności nowo zaprojektowanych nośników substancji aktywnych.

1.2 ALKOHOLE POLIIZOPRENOIDOWE

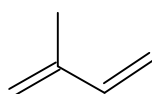
1.2.1 Budowa i występowanie

Alkohole poliizoprenoidowe, obok steroli, łańcuchów bocznych ubichinonu i plastochinonu czy charakterystycznych dla roślin izoprenoidów, takich jak karotenoidy zalicza się do terpenów (inaczej izoprenoidy, **Ryc. 1**), które stanowią jedną z najliczniejszych grup związków występujących naturalnie w przyrodzie [1].



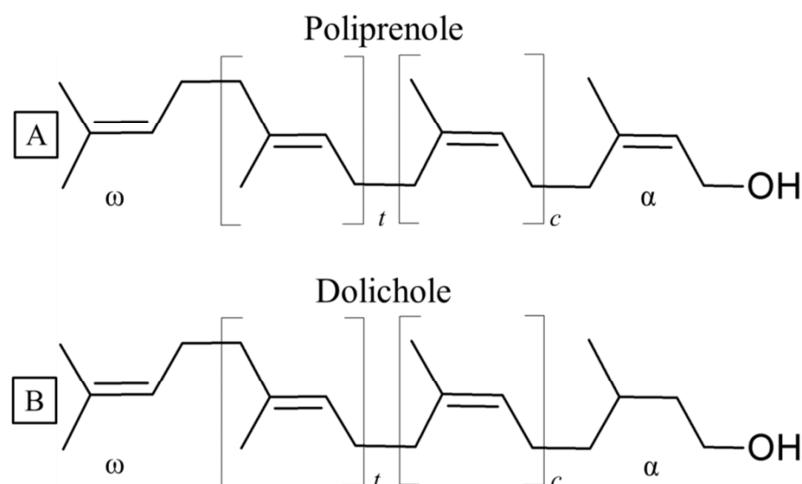
Ryc. 1. Biogeneza roślinnych poliizoprenoidów; IPP – difosforanizopentyli; DMAPP – difosforandimetyloallilu; GPP – difosforangeranyli; FPP – difosforanfarnezyli; GGPP – difosforangeranylgeranyli; PP – difosforanpoliprenyli; Źródło: modyfikacja własna na podstawie [1];

Alkohole izoprenoidowe stanowią szeroką grupę hydrofobowych polimerów, które występują we wszystkich żywych organizmach, poczynając od bakterii, aż do ssaków, przy czym najbardziej zróżnicowaną i najliczniejszą grupę stanowią izoprenoidy występujące u roślin okrytonasiennych [2]. Te liniowe cząsteczki zbudowane są z 5-150 jednostek izoprenowych (**Ryc. 2**) z grupą hydroksylową (-OH) na końcu alfa (α) i atomem wodoru na końcu omega (ω ; **Ryc. 3**) [2].



Ryc. 2. Struktura izoprenu

Zazwyczaj wymienia się trzy cechy różnicujące alkohole poliizoprenoidowe: nasycenie wiązania na końcu α , długość łańcucha węglowego oraz konfiguracja wiązań podwójnych (*cis* lub *trans*) [1]. Wyróżnia się dwie podstawowe grupy poliizoprenoidów różniące się uwodornieniem na końcu α : poliprenole (α -nienasycone) oraz dolichole (α -nasycone; **Ryc. 3**)



Ryc. 3. Struktura poliprenoli (A) i dolicholi (B); t – liczba jednostek izoprenowych w konfiguracji *trans*; c – liczba jednostek w konfiguracji *cis*; Źródło: modyfikacja własna na podstawie [3];

Wyniki badań ostatniego półwiecza wskazują, że alkohole poliizoprenoidowe można zaklasyfikować do dwóch podstawowych grup różniących się konfiguracją wiązań podwójnych; są to związki o konfiguracji tylko *trans* (*ang.* all-*trans*) oraz związki mieszane z przewagą konfiguracji *cis* (*ang.* mainly-*cis* lub *cis,trans*-mixed). Większość występujących naturalnie dolicholi i poliprenoli należy do grupy z przewagą konfiguracji *cis*, co oznacza, że zawierają one dwie lub trzy jednostki izoprenowe w pozycji *trans* (przylegające do końca ω) i liczne jednostki w pozycji *cis* [2]. Roślinne poliizoprenoidy można dalej podzielić w zależności od liczby wiązań w konfiguracji *trans* przy końcu ω na betulaprenole (di-*trans*,poli-*cis*-prenole) oraz ficaprenole (tri-*trans*,poli-*cis*-prenole) [4].

Najnowsze badania wskazują, że konfiguracja końca α znacząco wpływa zarówno na powinowactwo poliizoprenoidów do błon modelowych, jak i ich przepuszczalność. Postuluje się także, że izomeryzacja typu *cis/trans* na końcu α poliprenoli stanowi potencjalny mechanizm regulujący przepuszczalność błon komórkowych [5].

Przez lata twierdzono, że poliprenole występują głównie w fotosyntetyzujących tkankach roślin oraz komórkach bakteryjnych, natomiast dolichole są lipidami charakterystycznymi dla zwierząt i drożdży [2]. Podział ten jest jednak uproszczony, a rozwój technik

analitycznych pozwolił na znalezienie odstępstw od tej reguły: α -nienasycone poliprenole zostały znalezione u zwierząt, np. w przysadce mózgowej [6] czy w komórkach nowotworowych wątroby [7], a dolichole zostały zidentyfikowane jako dominujące w tkankach korzeni roślin [8].

Osobliwą cechą alkoholi poliizoprenoidowych jest ich występowanie w komórkach w postaci mieszanin homologów (inaczej rodzin homologów). Dolichole występują zazwyczaj w mieszaninach złożonych z sześciu do ośmiu związków niezależnie od organizmu, podczas gdy poliprenole można znaleźć w ogromnym zróżnicowaniu, począwszy od mieszanin kilku homologów, do układów zawierających ponad 100 poliprenoli o różnej długości łańcucha [3]. W niektórych przypadkach dwie lub trzy różne rodziny poliprenoli o różnych długościach łańcuchów występują w obrębie tej samej tkanki [1].

1.2.2 Biosynteza

Biosynteza alkoholi poliizoprenoidowych zachodzi w kilku następujących po sobie etapach. Pierwszym z nich jest synteza prekursorów jednostek izoprenoidowych: difosforanu izopentyli (IPP) oraz jego izomeru difosforanu dimetyloallilu (DMAPP), a następnie tworzony jest szkielet węglowy difosforanu poliprenyli; w ostatnim etapie zachodzi jego konwersja do odpowiedniego alkoholu poliizoprenoidowego [2, 3].

U bakterii i roślin synteza prekursorów izoprenoidowych (IPP i DMAPP) zachodzi równolegle na drodze dwóch szlaków: mewalonowego (MVA, zlokalizowanego w cytoplazmie) oraz fosforanu metyloerytroityli (MEP, działającego w plastydach) [9], natomiast uważa się, że u drożdży i zwierząt tylko szlak mewalonowy odpowiedzialny jest za syntezę IPP [2]. Odkrycie tak zwanych „izoprenoidów mozaikowych”, czyli związków złożonych z jednostek izoprenowych o różnym pochodzeniu (powstałych zarówno na drodze szlaku MVA, jak i na drodze MEP) nasunęło pytanie o istnienie wspólnej regulacji obu szlaków. Mimo iż uważa się, że obie ścieżki są od siebie niezależne w warunkach fizjologicznych to najnowsze badania wskazują na ich wzajemne interakcje (*ang.* cross-talk) pod wpływem pewnych bodźców zewnętrznych. Postuluje się, że oprócz światła [10], kluczowymi czynnikami modulującymi dostępność prekursorów izoprenoidów może być rytm okołodobowy [11] oraz stres środowiskowy [12]. Pojawia się także coraz więcej dowodów na istnienie wewnątrzkomórkowego przepływu prekursorów izoprenoidów powstających na drodze obu szlaków, prowadzącego do syntezy cząsteczek „mozaikowych” [9].

W drugim etapie biosyntezy formowane są szkielety wodorowęglowe izoprenoidów w procesie kolejnych kondensacji IPP z cząsteczkami difosforanów allilowych (GPP, FPP lub GGPP) co prowadzi do powstania długołańcuchowego difosforanu prenyli (Poliprenyl-PP). Enzymami

odpowiedzialnymi za ten proces są prenylotransferazy [2]. Można je podzielić na dwie zasadnicze grupy *cis* i *trans*, pod względem stereochemii powstającego produktu.

Ostatni etap biosyntezy poliizoprenoidów polega na tworzeniu końcowych form poliprenoli lub dolicholi. O ile mechanizm powstawania poliprenoli w wyniku defosforylacji poliprenylu-PP jest już dobrze poznany, o tyle końcowe etapy biosyntezy dolicholi były wyjaśnione stosunkowo niedawno [3]. Obecnie, spośród kilku proponowanych mechanizmów, najpowszechniej akceptowanym jest ten, w którym po osiągnięciu odpowiedniej długości poliprenylu-PP obie cząsteczki fosforanowe (PP) są odłączane przez fosfatazy. Następnie końcowa jednostka izoprenowa α jest redukowana. Zidentyfikowanie steroidowej 5- α -reduktazy typu III odpowiedzialnej za ten ostatni etap potwierdziło istnienie zakładanego mechanizmu [13].

1.2.3 Właściwości i funkcje

Ogromne zróżnicowanie grupy jaką stanowią alkohole poliizoprenoidowe powoduje, że pomimo ponad 50 lat intensywnych badań nadal wiele funkcji poliprenoli i dolicholi nie zostało wyjaśnionych.

Alkohole poliizoprenoidowe posiadają wysoką zdolność do akumulacji w tkankach; zjawisko to zaobserwowane zostało we wszystkich badanych do tej pory organizmach eukariotycznych [1]. Poliizoprenoidy gromadzone są głównie w postaci wolnych alkoholi i/lub estrów z kwasami karboksylowymi. Niewielka frakcja występuje w postaci fosforanów [2], a same fosforany dolicholi zostały także znalezione jako koniugaty z cukrami (są prekursorami biosyntezy glikoprotein). Silna hydrofobowość łańcuchów poliizoprenoidowych determinuje lokalizację poliprenoli i dolicholi w błonie komórkowej [3].

Ciekawym i nie do końca jeszcze poznany zjawiskiem jest wzrastająca wraz z wiekiem zawartość poliizoprenoidów w organizmie. Rola tych związków w starzejących się tkankach nie jest jednak do końca wyjaśniona [2]. Oprócz procesu starzenia, na zwiększoną akumulację poliizoprenoidów w tkankach mogą mieć wpływ także inne czynniki. Poziom roślinnych poliprenoli wzrasta znacząco po stymulacji światłem [14] czy zarażeniem wirusem mozaiki tytoniu [15]. Co ciekawe poziom poliprenoli wzrastał wyłącznie w odpornych na wirusa tkankach roślin tytoniu. Te badania potwierdziły przypuszczenia o udziale poliizoprenoidów w obronie roślin przed patogenami, zarówno na poziomie lokalnym jak i systemowym, jednakże dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany [16].

Postuluje się, że oprócz znanej roli tych związków jako modulatorów biofizycznych właściwości błon biologicznych (potwierdzono, że alkohole poliizoprenoidowe zwiększają przepuszczalność i płynność błon

modelowych [17], co powiązano ze zwiększoną tolerancją roślin na stres) poliprenole działają jako zmiatacze wolnych rodników [18].

Zwiększone gromadzenie dolicholi może być także indukowane różnymi stanami chorobowymi takimi jak lizosomalne choroby spichrzeniowe (mózg) [19], zaćma (soczewka oka) [20] czy choroba nowotworowa wątroby [2], stąd postuluje się, że dolichole wykazują antyoksydacyjne właściwości także u ssaków. Kolejne badania wskazują również na udział dolicholi w wewnątrzkomórkowym transporcie białek (*ang.* protein trafficking) oraz na ich rolę w transporcie pęcherzykowym (*ang.* anterograde vesicle trafficking) [2]. Mówi się także o ich udziale w odpowiedzi roślin na stres środowiskowy, czy skrajny niedobór wody [2].

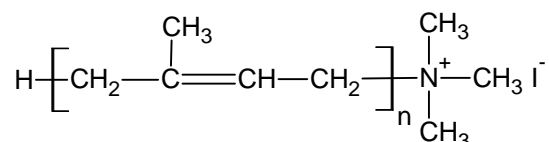
Ważną grupę stanowią ufosforylowane pochodne alkoholi poliizoprenoidowych (fosfopoliizoprenoidy), które odgrywają rolę kofaktorów w procesie glikozylacji białek [2]. Glikozylacja jest najczęściej występującą potranslacyjną modyfikacją białek, a jej biologiczna rola jest niezwykle ważna w procesach wzrostu i rozwoju oraz w wielu innych funkcjach organizmu [21]. Uważa się, że ponad połowa białek organizmu to glikoproteiny złożone z części polipeptydowej i oligosacharydowych glikanów. U eukariotów fosforan dolichylu pełni rolę kofaktora w biosyntezie *N*-, *C*- i *O*-glikoprotein oraz białek zawierających kotwicę GPI (*ang.* GPI-anchored; GPI – glikozylofosfatydyloinozytol), a u bakterii podobną rolę pełni fosforan bakteroprenylu. Zaburzenia glikozylacji prowadzą w komórkach do nagromadzenia nieprawidłowo sfałdowanych białek i tzw. stresu retikulum endoplazmatycznego (*ang.* Endoplasmic Reticulum Stress lub Unfolded Protein Response), takie zmiany obserwowano także w komórkach z zaburzeniami biosyntezy dolicholu [22].

Ostatnie lata przyniosły ogromny postęp w zakresie wiedzy na temat wrodzonych zaburzeń glikozylacji u człowieka (*ang.* Congenital Disorder of Glycosylation, CDG), czyli uwarunkowanych genetycznie wad metabolizmu powstałych na skutek nieprawidłowej glikozylacji białek [2]. Do tej pory zidentyfikowano 15 różnych mutacji w genach odpowiedzialnych za biosyntezę dolicholi związanych z oligosacharydami, które są przyczyną występowania bardzo różnych wariantów CDG [23].

Należy podkreślić, że biologiczna rola poliizoprenoidów jest jeszcze daleka od pełnego zrozumienia. Najnowsze doniesienia wskazują, że oprócz wykorzystania ich jako markerów procesu starzenia, można rozważać ich potencjalne zastosowanie jako biomarkerów stresu. Ponadto właściwe tempo biosyntezy dolicholi ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek, choć wciąż trudno rozstrzygnąć, czy obserwowane uszkodzenia komórek są wynikiem niedoboru dolicholi, czy nieprawidłowej glikozylacji białek. Najprawdopodobniej kombinacja obu procesów jest odpowiedzialna za upośledzenie metabolizmu komórek [2].

1.2.4 Amino-prenole

Przedmiotem badań w prezentowanej rozprawie doktorskiej były półsyntetyczne, kationowe pochodne alkoholi poliizoprenoidowych, nazwane amino-prenolami (APrens). Pomysł zastosowania amino-prenoli jako składników liposomowych nośników leków, zrodził się z obserwacji naturalnie występujących poliizoprenoidów i ich funkcji w organizmach oraz ich oddziaływania na błony modelowe. W badaniach biofizycznych potwierdzono, że dzięki ich zdolności do tworzenia w błonach domen o strukturze fazy heksagonalnej II [24, 25, 26], alkohole poliizoprenoidowe odgrywają rolę modulatorów błon modelowych, wpływając na ich przepuszczalność i płynność. Chemiczne przekształcenie grupy wodorotlenowej do czwartorzędowej grupy amoniowej (**Ryc. 4**) nadaje amino-prenolom specyficzne, fuzjogenne właściwości, dzięki którym te kationowe lipidy jeszcze łatwiej oddziałują z błonami biologicznymi.



Ryc. 4. Struktura czwartorzędowych soli poliprenylotrimetyloamoniowych

Do tej pory w organizmach żywych nie znaleziono naturalnie występujących kationowych pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych, ani do niedawna, nie były one przedmiotem badań. Dopiero w 2007 roku opublikowano wyniki eksperymentów, w których użyto amino-prenoli, jako składników mieszanin lipofekcyjnych [27]. Na podstawie wyników badań wstępnych, wyselekcjonowano kilka pochodnych, o różnej długości łańcucha węglowego.

Wybrane prenole były ekstrahowane ze źródeł roślinnych, a następnie poddawane modyfikacjom chemicznym do ostatecznej postaci. W jednostkach naukowych zaangażowanych w projekt, optymalizowano metody otrzymywania i identyfikacji APrens; badano amino-prenole pod kątem ich właściwości lipofekcyjnych (jako nośniki genów w angiogennej terapii genowej oraz jako składników lipopleksów w badaniach *in vitro*). Badano także właściwości epoksydowanych pochodnych poliizoprenoidów, podwyższających poziom biosyntezy ubiquinonu i obniżających biosyntezę cholesterolu.

Zadaniem Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych (IMDiK PAN) było zbadanie toksyczności amino-prenoli w modelach zwierzęcych i ich przydatności jako liposomowych nośników leków (badania *in vivo*), co jest przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej.

1.3 SYSTEMY DOSTARCZANIA LEKÓW

Mimo ogromnego postępu medycyny i farmakologii, nadal nie znaleziono rozwiązania wielu problemów związanych ze szkodliwymi następstwami przyjmowania leków. Często substancje o pożądanym działaniu terapeutycznym cechują się niekorzystną biodystrybucją (brak możliwości dotarcia do miejsca działania), ulegają zbyt szybkiemu metabolizmowi, bądź są zbyt szybko wydalane z organizmu, a także często wywołują działania toksyczne [28]. Oprócz poszukiwania nowych leków, ostatnio bardzo popularną strategią ulepszania terapii jest poszukiwanie nowych nośników substancji aktywnych [29]. Zastosowanie nowoczesnych systemów dostarczania leków (*ang.* Drug Delivery Systems, DDS) umożliwia modyfikowanie drogi i działania leków prawie na każdym etapie, od ich podania do ustroju, poprzez wchłanianie, dystrybucję, metabolizm czy wydalanie. Korzystne modyfikacje pozwalają na polepszenie biodostępności, ograniczenie terapeutycznych dawek i zminimalizowanie, poważnych często, skutków ubocznych [30].

Skuteczność strategii jaką jest projektowanie nowych systemów dostarczania leków potwierdza coraz większa liczba doniesień w tej dziedzinie. DDS jest pojęciem bardzo szerokim i obejmującym wiele typów nośników [31]. Można wymienić koniugaty typu: nośnik-lek, w których lek związany jest z nośnikiem wiązaniem kowalencyjnym, czy też nośnik-białko, w którym substancją terapeutyczną jest cząsteczka białka. Kolejną grupę stanowią polipleksy, czyli kompleksy kwasów nukleinowych z nośnikami [32]. Jako inne makrocząsteczkowe nośniki wymienia się polimery naturalne lub syntetyczne, w tym przeciwciała. Ostatnio popularne są tak zwane nośniki hybrydowe, będące połączeniem leku z kilkoma typami nośników (białkiem, polimerem lub przeciwciałem). Emulsje i liposomy stanowią osobną, bardzo szeroką grupę DDS. Ze względu na charakter prezentowanych badań zostaną one omówione bardziej szczegółowo w kolejnych podrozdziałach.

1.3.1 Liposomy – budowa i podział

Liposomy są to zamknięte struktury błonowe, mające postać pęcherzyków wypełnionych roztworem wodnym, otoczonym dwuwarstwą lipidową zbudowaną głównie z naturalnych lub syntetycznych fosfolipidów [33]. Pierwsze doniesienia o specyficznym zachowaniu lipidów w roztworze wodnym sięgają jeszcze połowy XIX wieku, ale dopiero w 1964 r. Bangham i wsp. [34] wyjaśnili budowę liposomów i opisali ich właściwości. Początkowo liposomy, nazywane bangosomami, były używane jako obiekty modelowe do badania błon komórkowych, ale już sam Bangham przewidział szybki rozwój ich zastosowania w wielu dziedzinach.

Liposomy można podzielić na kilka kategorii [35]; wyróżniamy liposomy naturalne, występujące w organizmach żywych (np. pęcherzyki uczestniczące w transporcie wewnątrzkomórkowym) i liposomy sztuczne, produkowane na skalę laboratoryjną lub przemysłową. Pod względem ich ładunku dzieli się je na obojętne, kationowe i anionowe. Na podstawie rozmiaru i liczby dwuwarstw lipidowych, z których się składają, można wyróżnić następujące grupy:

- pęcherzyki wielowarstwowe (*ang.* Multilamellar Vesicles, MLV)
- pęcherzyki jednowarstwowe (*ang.* Unilamellar Vesicles, UV)
 - duże pęcherzyki jednowarstwowe (*ang.* Large Unilamellar Vesicles, LUV)
 - małe pęcherzyki jednowarstwowe (*ang.* Small Unilamellar Vesicles, SUV)
- liposomy wielopęcherzykowe (*ang.* Multivesicular Vesicles, MVV)

Większość fosfolipidów tworzy strukturę dwuwarstwową, co wynika z ich amfifilowego charakteru oraz specyficznego kształtu cząsteczek (długi hydrofobowy „ogon” i hydrofilowa „głowa”), dzięki czemu możliwe jest powstawanie liposomów [36]. Jeszcze do niedawna fosfolipidy naturalne lub syntetyczne były jedynym materiałem używanym do konstruowania liposomów. Obecnie takie pęcherzyki można otrzymać także z niefosfolipidowych związków amfifilowych [36], pod warunkiem, że używany budulec w warunkach silnego uwodnienia tworzy strukturę dwuwarstwy lipidowej, podobną do tworzonej przez fosfolipidy. Termin liposomy bezpieczniej używać jest jednak w odniesieniu do pęcherzyków zbudowanych głównie z fosfolipidów, a te składające się z innych związków nazywa się niosomami lub nanosferami.

1.3.2 Metody otrzymywania liposomów

Szerokie zastosowanie liposomów powoduje, że są one przedmiotem intensywnych badań na całym świecie. Odpowiednio dobrana metoda przygotowania liposomów zapewnia we względnie szerokim zakresie możliwość manipulowania ich właściwościami (wielkość, ładunek, liczba warstw lipidowych, skład, stabilność i inne), tak aby uzyskane liposomy miały pożądane parametry.

Najstarszą, ale do tej pory powszechnie stosowaną, jest metoda Banghama polegająca na uwodnieniu cienkiego filmu lipidowego [37]. Polega ona na rozproszeniu lipidów w rozpuszczalniku organicznym, następnie na odparowaniu rozpuszczalnika i uwodnieniu wodnym buforem powstałego, suchego filmu lipidowego. Metoda jest prosta i stosunkowo tania, dająca niejednorodną mieszaninę wielowarstwowych liposomów (MLV). Kolejne etapy, takie jak przeciskanie przez porowatą membranę (ekstruzja) czy sonikacja (ultradźwięki), stosuje się w celu uzyskania mniejszych liposomów o jednolitej wielkości.

Do tej pory opracowano jeszcze wiele metod otrzymywania liposomów takich jak odparowywanie techniką faz odwróconych [38], dializa detergenowa [39], wstrzykiwanie roztworu lipidów w rozpuszczalniku (eterze lub etanolu) do roztworu wodnego [40], nanoprecypitacja, czy fuzja indukowana wapniem [37]. Opisane powyżej metody dotyczą pozyskiwania liposomów w skali laboratoryjnej. Istnieje także szereg technik wytwarzania liposomów na skalę przemysłową, które nie będą tu omawiane.

1.3.3 Liposomowe nośniki substancji aktywnych

Tak jak już wcześniej wspomniano Bangham przewidział, że „bangosomy” znajdą szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach, ale to niekwestionowany pionier w tej dziedzinie – Gregory Gregoriadis, jako jeden z pierwszych zwrócił uwagę na możliwość zastosowania ich w medycynie jako nośniki leków i podjął udane próby zamknięcia substancji aktywnych w liposomach [41, 42]. Pierwsze doniesienia o skuteczności liposomów jako nośników substancji terapeutycznych dotyczyły leczenia białaczki u myszy, za pomocą arabinozydu cytozyny [43]. Model ten był później wielokrotnie wykorzystywany do testowania efektywności formułacji liposomowych. W kolejnych eksperymentach *in vivo* stosowano zamknięte w pęcherzykach lipidowych leki przeciwko leiszmaniozie, aktynowocynę o antynowotworowej aktywności, leki przeciwzapalne, amfoterycynę B i doksorubicynę [44]. Intensywne badania doprowadziły do pierwszych prób klinicznych, w których podawano pacjentom doksorubicynę zamkniętą w liposomach [45]. Dzięki zastosowaniu nośników w znacznym stopniu ograniczono nieodwracalną kardiotoksyczność tego leku przeciwnowotworowego.

Liposomy mogą służyć zarówno jako nośniki substancji hydrofilowych – takie cząsteczki znajdują się wtedy w wodnym rdzeniu liposomów, co ułatwia im penetrację lipofilowych błon fizjologicznych – jak i cząsteczek hydrofobowych, które wbudowywane są w strukturę dwuwarstwy lipidowej, co zwiększa ich rozpuszczalność w wodnych płynach ustrojowych [46]. Liposomy nie ulegają tak szybkiej enzymatycznej degradacji, a ponieważ zbudowane są najczęściej z naturalnych związków lub ich syntetycznych analogów, uważa się, że są biokompatybilne i biodegradowalne [47]. Okazało się jednak, że tak zwane konwencjonalne liposomy (pierwszej generacji) posiadają szereg wad: stosunkowo słabą stabilność, „wyciekanie” substancji aktywnych z liposomów, czy szybki wychwyt przez układ fagocytarny, co znacznie skraca ich okres półtrwania [46]. Wraz z rozwojem technik laboratoryjnych, sprzętu i dostępnego materiału zaczęto modyfikować skład, metody wytwarzania i przede wszystkim strukturę powierzchni liposomów tak aby otrzymać optymalne preparaty.

Uwalnianie cząsteczek z liposomów jest kluczowym czynnikiem charakteryzującym ten system dostarczania leków. Badania wykazały, że kontakt z białkami osocza powoduje uwalnianie leków z pęcherzyków [44]. Zastosowanie cholesterolu [48] czy sfingomieliny [49] jako składników liposomów powoduje zwiększenie „sztywności” dwuwarstwy lipidowej i znacznie eliminuje „wyciekanie” substancji aktywnych z nośników.

Wybór odpowiedniego leku i jego modyfikacja jest kolejnym elementem strategii kontrolowania tempa uwalniania substancji aktywnej z liposomów. Podobnie jak błony biologiczne, membrany modelowe wykazują niższą przepuszczalność dla cząsteczek hydrofilowych, a większą dla hydrofobowych [44]. Znaczny postęp przyniosło opracowanie nowej metody „ładowania” leków do liposomów. Tak zwana metoda „zdalnej enkapsulacji” (aktywnego zamykania) opiera się na generowaniu przez błonowego gradientu pH, w odpowiedzi na który, leki o odpowiednich właściwościach przenikają do liposomów. Jedną z wielu zalet tej metody jest to, że leki zamyka się w pęcherzykach lipidowych już po ich uformowaniu, co pozwala na uniezależnienie obu procedur. Zatrzymywanie leku w pęcherzykach lipidowych zależy w znacznym stopniu od właściwości chemicznych samej substancji aktywnej, niektóre leki takie jak dokсорubicyna łatwiej przenikają do liposomów, a niektóre, takie jak cyprofloksacyna dużo trudniej „utrzymać” w strukturze liposomu [44].

Tempo uwalniania substancji z nośnika ma kluczowe znaczenie dla każdej terapii z użyciem systemów dostarczania leków. Trzeba pamiętać, że leki zamknięte w liposomach są biodostępne dopiero w momencie uwolnienia leku z pęcherzyków. Lokalne zwiększanie dostępnego stężenia leków, co przekłada się na poprawę wyników leczenia, ma miejsce tylko wtedy gdy uwalnianie leku jest zoptymalizowane [50].

Kolejnym problemem z jakim trzeba było się zmierzyć w celu poprawy właściwości preparatów liposomowych był ich szybki wychwyty przez układ fagocytarny (*ang.* Mononuclear Phagocyte System, MPS), zachodzący głównie w wątrobie i śledzionie [46]. Oprócz przypadków, w których leczenie miało bezpośredni związek z MPS, szybki wychwyty liposomów przez ten układ znacznie ograniczał dystrybucję leków do innych tkanek i jednocześnie podnosił toksyczność leków nagromadzonych w strukturach MPS. Początkowo, w celu eliminacji tego niekorzystnego zjawiska, próbowano zablokować MPS dużymi dawkami tak zwanych „pustych” liposomów przed podaniem właściwych preparatów [51, 52]. Jednakże dopiero wydłużenie okresu półtrwania nośników i ich ochrona przed MPS miały największe znaczenie dla polepszenia właściwości nośników liposomowych. Niewielką poprawę przyniosły próby zmniejszania wielkości pęcherzyków liposomowych

niosących leki [53], ale dopiero modyfikacje struktury powierzchni doprowadziły do osiągnięcia znaczącego sukcesu w przedłużeniu czasu krążenia liposomów we krwi. Zauważono, że zwiększenie hydrofobowości powierzchni liposomów znacznie wydłuża ich okres półtrwania i redukuje ich wychwyty przez wątrobę [54]. Dalsze badania doprowadziły do powstania nowego narzędzia w dziedzinie technologii liposomowej, czyli liposomów stabilizowanych sferycznie (*ang.* stealth liposomes), które charakteryzują się znacznie dłuższym okresem półtrwania, ze względu na zmniejszoną wykrywalność przez MPS [55]. By uczynić liposomy „niewidzialnymi”, pokrywa się ich powierzchnie resztami cukrowymi (np. gangliozydami) lub glikolem polietylenowym (PGE), co znacznie utrudnia proces fagocytozy. Okazało się, że tak zmodyfikowane liposomy („stealth”) mają znaczną przewagę nad konwencjonalnymi liposomami, co dość szybko przełożyło się na przeprowadzenie pierwszych prób klinicznych, w których podjęto próbę leczenia mięsaka Kaposiego u pacjentów zakażonych wirusem HIV [56] z wykorzystaniem liposomów nowej generacji.

Trzecim zagadnieniem jakie należało rozwiązać przy wykorzystaniu liposomów jako nośników leków było ich dostarczenie do wnętrza komórek przez błony komórkowe, tj. do miejsca uchwytu niektórych leków. Hydrofobowe leki będące słabymi zasadami, takie jak doksorubicyna czy winkrystyna, mogą wnikać do komórek jako wolne leki w niezmienionej postaci, dzięki zjawisku biernej dyfuzji z krwi i płynu pozakomórkowego, a małe hydrofilowe związki, np. arabinozyd cytozyny, mogą przenikać do wnętrza komórek przez transportery błonowe [44]. Jednakże dla dużej części leków, szczególnie nowej generacji, które nie są w stanie pokonać błony komórkowej i biernie dotrzeć do miejsca działania, głównym mechanizmem, dzięki któremu wnikają do komórek, jest endocytoza [57]. Przyłączenie do powierzchni nośników liposomowych, tak zwanych ligandów kierujących (*ang.* ligand-targeted liposomes), które są odpowiedzialne za rozpoznanie odpowiednich komórek docelowych, jest kolejnym udoskonaleniem technologii liposomowej. Endocytoza zależna od receptorów jest obecnie popularnym sposobem wprowadzania terapeutyków do wnętrza komórek, ale można ją stosować tylko w przypadku kiedy substancje aktywne są w stanie przetrwać w kwaśnym i nasyconym enzymami środowisku endosomów oraz lizosomów [44]. Ten typ terapii celowanej, z użyciem ligandów kierujących, zlokalizowanych na powierzchni nośników, jest szczególnie popularny w próbach leczenia nowotworów, jednak nadal niedoskonały. Wynik leczenia z użyciem ligandów kierujących często nie różnił się od wyników leczenia z użyciem klasycznych liposomów. Skuteczność takiej terapii zależy od wielu czynników, a jej koszt jest znacznie wyższy w porównaniu do terapii klasycznej [44].

Stabilność nośników liposomowych jest kolejnym kluczowym elementem, na który trzeba zwrócić uwagę przy omawianiu każdego typu terapii z użyciem DDS. Już ponad 20 lat temu stwierdzono, że znaczny postęp w tej dziedzinie przyniosłaby możliwość kontrolowanego uwalniania leku z nośnika, w momencie gdy dotrze on do miejsca działania [44]. Do tej pory zaproponowano dwa rodzaje czynników wyzwalających (*ang.* triggers) substancję czynną z pęcherzyka lipidowego [58]:

- zdalne, inaczej zewnętrzne (ciepło, ultradźwięki, światło)
- lokalne, związane z mikro-środowiskiem danej choroby albo tkanki/organeli, w której toczy się proces chorobowy (enzymy, zmiany pH)

Powyższe czynniki wykorzystuje się do zainicjowania uwalniania leku z liposomów, dzięki czemu taka terapia staje się niemal idealną terapią celowaną, w której uzyskujemy wysoką wydajność przy niskich dawkach leku i zredukowanej toksyczności.

W medycynie i biologii liposomów używa się zarówno w diagnostyce jak i leczeniu. Są one nośnikami substancji aktywnych terapeutycznie bądź różnorodnych markerów, jak również mogą stanowić narzędzie służące do badania błon biologicznych, właściwości białek błonowych i interakcji komórkowych.

Obecnie na rynku dostępny jest cały szereg preparatów, w których lek związany jest z liposomami [46, 59]. Preparaty te charakteryzują się różnym składem fosfolipidowym i budową oraz drogą podawania; podaje się je przede wszystkim drogami pozajelitowymi, głównie dożylnie, ale też zewnątrzoponowo, dordzeniowo, przezskórnice, do spojówki oka, czy do płuc. Przykłady zebrano w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Wybrane preparaty liposomowe dostępne na rynku

Nazwa preparatu	Substancja aktywna	Wskazania
Ambisome Abelcet Amphotec	Amfoterycyna B	zakażenia grzybicze
DaunoXome	daunorubicyna	nowotwory
Doxil Lipo-dox Myocet	doksorubicyna	nowotwory
Depocyt	arabinozyd cytozyny	zapalenie opon mózgowo- rdzeniowych
DepoDur	morfina	leczenie bólu
Epaxal	nieaktywna forma wirusa zapalenia wątroby typu A	zapalenie wątroby typu A
Inflexal V	nieaktywna forma wirusa grypy	grypa

Niezwykle ważną cechą liposomów jest ich zdolność do biernej akumulacji w miejscach o zwiększonej przepuszczalności naczyniowej (*ang.* Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR) [60], co charakteryzuje tkanki nowotworowe i tym samym jest niezwykle przydatne w ich niszczeniu.

Liposomy, oprócz wielu zastosowań w medycynie zdobyły dużą popularność w dermatologii i kosmetologii. Substancje czynne podawane miejscowo w postaci liposomów lepiej penetrują przez skórę a jednocześnie udaje się istotnie ograniczyć ich skutki uboczne [61]. Oprócz wymienionych powyżej zastosowań, liposomy stosuje się również jako nośniki szczepionek w immunoterapii, do transfekowania komórek kwasami nukleinowymi czy jako element terapii kombinowanych, zakładających użycie kilku różnych leków o niepokrywających się działaniach terapeutycznych [44].

1.3.4 Podsumowanie

Liposomy od ponad 40 lat są najszerzej stosowaną formą spośród wszystkich systemów dostarczania leków. Ich zastosowanie w medycynie eksperymentalnej i klinice jest niezwykle różnorodne: od obrazowania guzów nowotworowych, podawania szczepionek, wprowadzania kwasów

nukleinowych do komórek po leczenie rozmaitych chorób – od powszechnych infekcji takich jak grypa, przez niezliczone typy nowotworów, po choroby płuc i skóry. W nośnikach liposomowych można zamykać zarówno małe cząsteczki jak i makromolekuły; uważa się je za biodegradowalne i biokompatybilne. Nośniki liposomowe o odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni, mogą reagować z elementami błon komórkowych w przewidywalny sposób, a substancje aktywne w nich zamknięte mogą być uwalniane w odpowiednim tempie i miejscu, zapewniając najlepszy efekt terapeutyczny. Zdolność do redukcji skutków ubocznych leków zamkniętych we wnętrzu liposomów, przyczynia się do zwiększenia indeksu terapeutycznego, czyli stosunku dawki leku wywołującej objawy toksyczne do dawki wywołującej efekt terapeutyczny.

1.4 NEFROTOKSYCZNOŚĆ

Tak jak już wcześniej wspomniano, niniejsza rozprawa doktorska jest częścią projektu: „Zastosowanie pochodnych poliizoprenoidów jako nośników leków i regulatorów metabolizmu”, którego długofalowym celem (w razie uzyskania pozytywnych wyników) jest zastosowanie badanych pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych w przemyśle farmaceutycznym i pokrewnych.

W pierwszym etapie badań należało zbadać czy substancje te nie są toksyczne dla organizmów żywych. W kolejnych podrozdziałach opisano zagadnienia związane z wyborem modeli badawczych, zaczynając od wyjaśnienia czemu badanie funkcji nerek i układu krążenia jest dobrym wskaźnikiem toksyczności testowanych substancji.

1.4.1 Wysoka podatność nerek na działanie toksyczne substancji

Nerki stanowią najistotniejszą część układu wydalniczego ssaków. Oprócz funkcji wydalniczej, odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu homeostazy środowiska wewnętrznego organizmu [62]. Upośledzenie funkcji nerek może stanowić poważne zagrożenie życia.

Wiadomo, że bardzo ważną funkcją nerek jest metabolizm i usuwanie z organizmu egzogennych leków i toksyn, co powoduje, że nerki są szczególnie podatne i wrażliwe na uszkodzenia [63, 64]. Szacuje się, że ok. 20% przypadków ostrej niewydolności nerek u pacjentów jest wynikiem leko-zależnej nefrotoksyczności [65, 66]. Wysoki przepływ krwi przez nerki (w przybliżeniu 20% pojemności minutowej serca) powoduje, że są one wystawione na działanie wysokich stężeń leków i produktów ich metabolizmu, co może prowadzić do uszkodzenia struktur nerkowych, takich jak kłębuszki, kanaliki (przede wszystkim pętla Henlego), tkanka śródmiąższowa, czy naczynia (szczególnie naczynia proste; *ang. vasa recta*).

Wiele komórek w obszarze rdzenia nerki, szczególnie komórek pętli Henlego, funkcjonuje w warunkach względnego niedoboru tlenu. Zjawisko hipoksji w tkankach nerki powstaje na skutek wysokiego tempa metabolizmu i dużego zużycia tlenu, potrzebnego do aktywnego transportu jonów, co znacznie zwiększa wrażliwość nerek na działanie czynników nefrotoksycznych [63].

Kolejnym czynnikiem zwiększającym podatność nerek na uszkodzenia jest wysokie stężenie różnych związków i ich metabolitów, szczególnie w tkance śródmiąższowej rdzenia nerki, które wynika z ogromnej zdolności nerek do zagęszczania moczu. Wysokie stężenie toksyn w nerkach może powodować zarówno bezpośrednie uszkodzenie tkanek, jak i prowadzić do pogłębienia fizjologicznej hipoksji, a co za tym idzie związanych z nią dysfunkcji narządu [63].

W nerkach zachodzi wiele procesów chemicznych katalizowanych przez enzymy, które często prowadzą do powstania związku mniej toksycznego niż macierzysty. Jednakże w wielu przypadkach biotransformacja leków i innych substancji przez różnorodne systemy enzymów nerkowych, w tym cytochrom P450 i monooksygenazy flawinowe, prowadzą do powstania związków bardziej szkodliwych [67]. Obecność toksycznych produktów ubocznych tych przemian może doprowadzić do wystąpienia stanu stresu oksydacyjnego, co dalej pociąga za sobą upośledzenie funkcji tego narządu (alkilowanie lub utlenienie kwasów nukleinowych, uszkodzenia białek czy peroksydacje lipidów) [67].

Zwiększona toksyczność w takich strukturach nerki jak kanalik proksymalny, może wynikać też z intensywnego wychwytu potencjalnych toksyn i leków przez transportery zlokalizowane zarówno od strony błony podstawno-bocznej, jak i apikalnej [63]. Wzmocniony transport różnych substancji zwiększa narażenie kanalików nerkowych i ryzyko wystąpienia zbyt wysokiego stężenia substancji toksycznych, co może prowadzić do uszkodzenia nerek o różnym nasileniu.

Wszystkie wymienione powyżej czynniki, przyczyniają się do wysokiej podatności nerek na szkodliwe substancje, stąd badanie ich funkcji i morfologii jest doskonałym narzędziem do oceny toksyczności nowych związków. Egzogenne substancje mogą powodować różnorodne uszkodzenia w strukturze i działaniu układu wydalniczego, od subtelnych zmian po ostrą niewydolność nerek. Powstałe zmiany są w większości odwracalne ale muszą być wykryte w odpowiednim czasie, aby można było podjąć odpowiednie kroki przeciwdziałające dalszym uszkodzeniom. Dlatego istnieje ogromne zapotrzebowanie na specyficzne biomarkery, pozwalające na wykrywanie już bardzo wczesnych zmiany w strukturze i funkcjonowaniu nerek [65]. Także w medycynie doświadczalnej, istnieje ogromne zapotrzebowanie na uniwersalne narzędzia do oceny toksyczności nowych terapeutyków.

1.4.2 Biomarkery i ocena uszkodzeń nerek

Biomarkery są to łatwo mierzalne parametry, na podstawie których można wykryć i ocenić fizjologiczne, chorobotwórcze lub powstałe w odpowiedzi na interwencję terapeutyczną zmiany zachodzące w organizmie [68, 69]. Kontrolowanie specyficznych biomarkerów i ewentualne zakończenie stosowania danej substancji na podstawie pogarszającego się ich obrazu jest najskuteczniejszym sposobem zapobiegania lub łagodzenia nefrotoksyczności leków. Takie działania powinny być stosowane także na etapie badań przedklinicznych prowadzonych na zwierzętach. Najbardziej użytecznymi wskaźnikami są te, które można stosować zarówno u ludzi jak i zwierząt oraz takie, które można oznaczać w łatwych do pozyskania płynach ustrojowych, takich jak mocz czy krew. Na podstawie wielu dotychczasowych badań udało się rzetelnie zdefiniować związek między histopatologią nerek a poziomem uznanego w badaniach na zwierzętach biomarkera, a następnie przełożyć uzyskane wyniki na populację ludzką. Obecnie, jednym z największych wyzwań badań toksykologicznych w odniesieniu do nowych leków, są przede wszystkim trudne do zidentyfikowania bariery międzygatunkowe [65]. Przykładem, który dobrze ilustruje różnice międzygatunkowe w odpowiedzi na te same substancje terapeutyczne, są wyniki badań leku przeciwretrowirusowego – efawirenz (sustiva). Efawirenz należy do grupy nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy i stosowany jest w leczeniu zakażeń HIV. Lek ten powoduje martwicę komórek nabłonka w nerkach szczurów ale nie jest toksyczny dla ludzi czy małp z rodziny makakowatych [70]. Jego toksyczność u szczurów wynika z powstawania specyficznego dla tego gatunku metabolitu związanego z glutationem, który wykazuje działanie nefrotoksyczne.

Jedną ze strategii wykrywania wczesnych uszkodzeń w strukturach i zaburzeń w funkcji nerek jest zaprojektowanie grupy markerów, które są szczególnie wrażliwe na różne mechanizmy, na które działają konkretne leki lub grupy terapeutyków. Jednakże to podejście nie sprawdza się, gdy podłoże toksyczności danej substancji nie jest do końca wyjaśnione [65]. Alternatywnym podejściem jest użycie ograniczonej grupy biomarkerów, charakterystycznych dla miejsca pojawienia się zmian po podaniu nefrotoksycznego związku np. biomarkery charakterystyczne dla uszkodzenia kłębuszków czy kanalików proksymalnych, które razem stanowią najczęstsze miejsce występowania uszkodzeń związanych z toksycznością (90% leków) [65]. Idealnym rozwiązaniem byłoby znalezienie jednego łatwego do interpretacji wskaźnika, który pozwoliłby na precyzyjne wskazanie miejsca uszkodzenia narządu oraz zidentyfikowanie konkretnego typu uszkodzenia.

Analiza histopatologiczna

Jedną z podstawowych metod oceny toksyczności podanego związku (przede wszystkim w badaniach przedklinicznych) jest analiza histopatologiczna, która nadal uważana jest za „złoty standard” w tej dziedzinie [65, 71]. Zmiany, które mogą powstać w wyniku toksycznego działania substancji, zostały bardzo dobrze poznane i opisane dla wielu powszechnie używanych modeli zwierzęcych.

Najczęściej używanymi barwnikami do oceny morfologii i wychwycenia zmian chorobowych są hematoksylina i eozyna (HE), które od ponad wieku stosowane są w prawie niezmięnionej postaci [72]. Eozyna jest barwnikiem kwaśnym, barwiącym niespecyficznie białka cytoplazmatyczne na kolor różowy. Hematoksylina zaś przyłącza się do grup fosforanowych kwasów nukleinowych, barwiąc jądra komórkowe na kolor niebieski. W dobrze utrwalonym materiale barwienie HE daje możliwość oceny wielu zmian morfologicznych powstałych w komórkach, z uwzględnieniem zmian wewnątrz jądra komórkowego [72].

Wybrane biomarkery

Obecnie wiele badań poświęca się poszukiwaniu nowych biomarkerów specyficznych dla nerki. Ostre uszkodzenie nerek (*ang.* Acute Kidney Injury, AKI) stanowi istotny problem medyczny, który obciążony jest prawie 50% śmiertelnością [73]. Do tak wysokiej śmiertelności przyczynia się także brak specyficznych biomarkerów, pozwalających na wczesne wykrycie AKI. Do niedawna sprawność nerek oceniana była wyłącznie na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy, poziomu azotu pochodzącego od mocznika oznaczanego we krwi (*ang.* Blood Urea Nitrogen, BUN) oraz analizy moczu [74]. Pojawia się jednak coraz więcej doniesień o niedoskonałości tych biomarkerów, szczególnie ich przydatności do wykrywania chorób nerek we wczesnych stadiach [65, 71, 74, 75]. Stężenie kreatyniny zależy od takich czynników jak masa ciała, masa mięśniowa, wiek, płeć, rasa, przyjmowane leki czy dieta, z kolei na poziom BUN ma wpływ dieta, stopień nawodnienia czy stan czynnościowy wątroby [65, 71]. Ponadto, wymienione parametry nie wskazują dokładnego miejsca wystąpienia uszkodzenia, czyli nie są specyficzne dla konkretnego regionu nerki (*ang.* non region-specific) i dopiero przy wystąpieniu znacznego uszkodzenia nerek ich wartości wzrastają powyżej poziomów fizjologicznych.

Tempo przesączania kłębuszkowego (GFR)

Obecnie najczęściej używanym w klinice i badaniach naukowych wskaźnikiem do oceny wydolności nerek jest tempo przesączania kłębuszkowego (*ang.* Glomerular Filtration Rate, GFR). Jest to ilość osocza przefiltrowana w jednostce czasu przez kłębuszki nerkowe [76].

Najdokładniejszym sposobem oznaczania GFR są badania klirensowe. Klirens, inaczej współczynnik oczyszczania, jest to objętość osocza całkowicie oczyszczonego z danej substancji w jednostce czasu. Klirens substancji, która jest swobodnie filtrowana do torebki Bowmana otaczającej naczynia kapilarne kłębuszka, ale nie ulega reabsorpcji i sekrecji w kanalikach, jest miarą filtracji kłębuszkowej [76]. Na podstawie stężenia substancji X w osoczu (P_x) i moczu (U_x) oraz zmierzonej diurezy (V), można wyliczyć GFR ze wzoru:

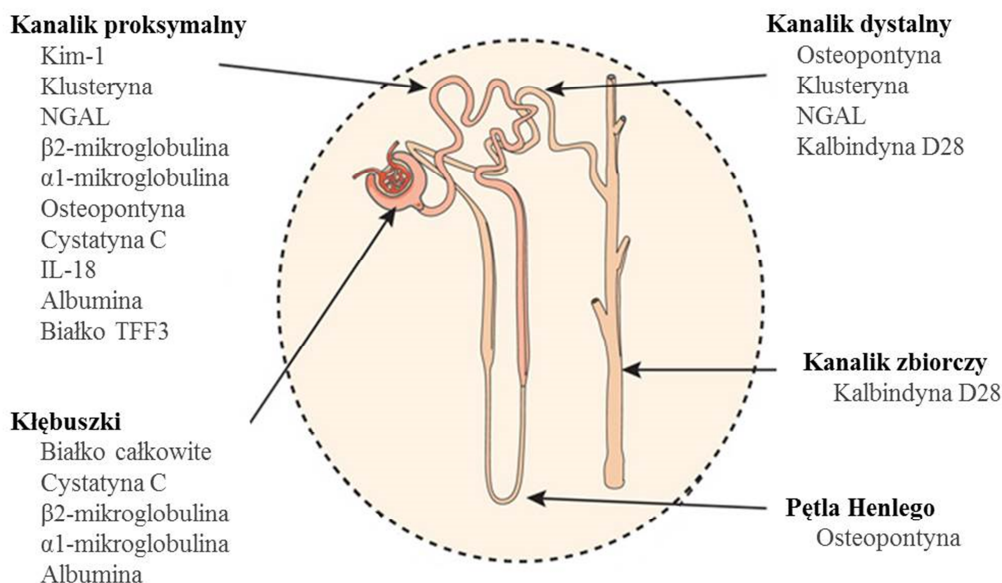
$$GFR = \frac{U_x \cdot V}{P_x}$$

Idealny marker do oznaczania GFR nie powinien być także usuwany z krwi żadną drogą pozanerkową. Nie powinien ulegać przemianom metabolicznym, czy wiązać się z białkami osocza [77]. Pierwszą i do tej pory używaną endogenną substancją, na której podstawie oznacza się GFR, jest kreatynina. Trzeba jednak pamiętać, że pewna ilość kreatyniny jest eliminowana drogą sekrecji kanalikowej oraz że kreatynina, w pewnym stopniu, ulega degradacji w jelitach. Do obliczania GFR powszechnie używa się substancji egzogennych, takich jak inulina. Klirens inuliny nadal uważany jest za „złoty standard” w tej dziedzinie. Inulina filtruje się swobodnie ze światła naczyń, nie jest transportowana przez ścianę kanalika, ani nie ulega metabolizmowi. Jednakże jest to metoda uciążliwa i kosztowna, ze względu na potrzebę ciągłej infuzji markera, zbiórki moczu oraz konieczności pobierania próbek krwi [74]. Z tego względu w praktyce najczęściej stosuje się metody szacowania tempa filtracji tylko na podstawie stężenia pewnych substancji w osoczu, wykorzystując odpowiednie wzory (*ang.* estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) [78]. Nadal najbardziej popularną jest metoda szacowania eGFR na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy. Na przestrzeni lat zaproponowano odpowiednie wzory, takie jak Cockcrofta-Gault'a [79] czy wzór dla pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (*ang.* Modification of Diet in Renal Disease study group, MDRD) [80, 81], do których obliczenia potrzebna jest znajomość niektórych parametrów takich jak masa ciała, wiek, płeć czy rasa. Uwzględnienie tych czynników pozwala na względne wyeliminowanie ich wpływu na wielkość filtracji kłębuszkowej, co pozwala ze stosunkowo dobrą dokładnością oszacować GFR.

Na przestrzeni ostatnich lat coraz większą popularność zyskuje cystatyna C jako marker do szacowania tempa filtracji [82]. Cystatyna C jest swobodnie filtrowana przez kłębuszki nerkowe, a następnie ulega reabsorpcji i całkowitemu rozkładowi w komórkach kanalików. Uważa

się, że ocena oparta na cystatinie C jest, w porównaniu do kreatyniny, znacznie mniej zależna od wieku (oprócz dzieci poniżej pierwszego roku życia), masy mięśniowej, rasy czy płci [74].

Nadal jednak oznaczenie GFR w badaniach klierensowych daje dużo dokładniejsze wyniki, niż szacowanie wielkości filtracji kłębuszkowej na podstawie stężenia kreatyniny lub innych markerów. Oprócz wymienionych wcześniej wad jest to przede wszystkim metoda czasochłonna. Dodatkowo, wartość filtracji kłębuszkowej jest dosyć zgrubną miarą wydolności nerek i nie wykrywa bardziej subtelnych zmian, takich jak obniżenie perfuzji nerek, niedrożność wewnątrzkanalikowa, zespół hemolityczno-mocznicowy (*ang.* haemolytic-uraemic syndrome) czy śródmiąższowe zapalenie nerek [71]. Wszystkie te uszkodzenia będą w konsekwencji prowadziły do obniżenia GFR (bezpośrednio lub pośrednio), ale spowodowane zmiany mogą być wykryte zbyt późno i nie dostarczą informacji o mechanizmie zaistniałego uszkodzenia. Z tego względu nadal poszukuje się specyficznych biomarkerów, które pozwolą na wczesne wykrycie uszkodzeń poszczególnych struktur nerkowych. Ogromna ilość badań na przestrzeni ostatniej dekady nad potencjalnymi biomarkerami doprowadziła do powstania listy 7 wskaźników rekomendowanych do oceny wczesnego uszkodzenia nerek. Lista, stworzona przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*ang.* Food and Drug Administration, FDA) we współpracy z Europejską Agencją Leków (*ang.* European Medicines Agency, EMA) w 2009 roku [71, 83] obejmuje wskaźniki oznaczane w moczu takie jak: albumina, transbłonowa glikoproteina typu pierwszego (*ang.* Kidney Injury Protein 1, KIM-1), całkowite stężenie białka w moczu, β 2-mikroglobulina, cystatyna C (zarówno w moczu, jak i osoczu), klusteryna i białko TFF3 (*ang.* Trefoil Factor-3). Na **Ryc. 5** przedstawiono rekomendowane przez EMA/FDA markery oraz wybrane substancje o wysokim potencjale diagnostycznym wraz ze wskazaniem dla których struktur nerkowych są charakterystyczne.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający wybrane biomarkery charakterystyczne dla uszkodzeń poszczególnych struktur nerek; KIM-1 - transbłonowa glikoproteina typu pierwszego (*ang.* kidney injury protein 1); NGAL - obojętnochłonna lipokalina związana z żelatynazą neutrofilii (*ang.* neutrophil gelatinase-associated lipocalin); RBP – białko wiążące retinol (retinol binding protein); IL-18 – interleukina 18; HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (*ang.* hepatocyte growth factor); *Źródło: modyfikacja własna na podstawie [65];*

Albumina

Albumina, produkowana przez wątrobę jest głównym białkiem występującym w osoczu krwi; szacuje się, że stanowi ok. 60% wszystkich zawartych w nim białek. Albumina wiąże wodę, kationy takie jak Ca^{2+} , Na^+ , K^+ oraz kwasy tłuszczowe, hormony, czy bilirubinę. Jej ważną funkcją jest utrzymanie ciśnienia onkotycznego krwi.

Albumina, jako stosunkowo duże białko, nie jest filtrowana do torebki Bowmana kłębuszków nerkowych i nie jest wydalana przez prawidłowo funkcjonujące nerki. Wydalanie albumin wskazujące na upośledzenie czynności nerek, stanowi czynnik ryzyka nie tylko dla niewydolności nerek, ale też udaru mózgu, czy chorób układu krążenia [84]. Termin mikroalbuminuria, oznacza wydalanie albuminy na stałym poziomie powyżej normy, ale poniżej czułości konwencjonalnych pasków testowych [85, 86]. Mikroalbuminurię u ludzi definiuje się jako dobowe wydalanie albuminy mieszczące się w granicach od 30 do 300 mg/24 godz. (*ang.* Urinary Albumin Excretion, UAE) lub jako tempo wydalania (przy czasowej zbiórce moczu) mieszczące się w przedziale od 20 do 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ (*ang.* Albumin Excretion Rate, AER) [84, 85]. Poziom UAE powyżej 300 mg/24 godz. określany jest już jako albuminuria. Obecnie amerykańska organizacja National Kidney Foundation rekomenduje używanie stosunku stężenia albuminy do kreatyniny (*ang.* Albumin-Creatinine Ratio, ACR) w pobranej próbce moczu, jako najdokładniejszego

wskaźnika do wykrywania mikroalbuminurii [85]. Uważa się, że oznaczanie ACR jest mniej uciążliwe dla pacjentów i mniej podatne na błędy wynikające z nieprawidłowej zbiórki moczu.

Początkowo sądzono, że wydalanie albuminy z moczem jest jedynie wynikiem zmian w procesie filtracji kłębuszkowej, wskutek wahań ciśnienia wewnątrz-kłębuszkowego, uszkodzeń strukturalnych podocytów lub błony podstawnej. Ostatnie badania na szczurach wskazują jednak, że mikroalbuminuria może występować także na skutek uszkodzeń komórek kanalikula proksymalnego, dlatego sądzi się, że biomarker ten może być użyteczny do wykrywania wczesnego AKI zależnego od uszkodzenia tych komórek [86]. Do tej pory wykazano, że mikroalbuminuria występuje zarówno przy krótko- jak i długotrwałym podaniu nefrotoksycznych chemioterapeutyków, takich jak cisplatyna, ifosfamid i metotreksat, jak również antybiotyków np. gentamycyny [86].

Istnieją jednak pewne ograniczenia w stosowaniu mikroalbuminurii jako wskaźnika wczesnego uszkodzenia nerek. Pomiar albuminy w moczu nie charakteryzuje miejsca wystąpienia uszkodzenia, a ponadto wyższy jej poziom w moczu może również wystąpić pod wpływem nieswoistych czynników, takich jak intensywny wysiłek fizyczny, zakażenia dróg moczowych, gorączka czy odwodnienie. Albumina może także być degradowana w długo przechowywanych próbkach [87]. Niezaprzeczalną zaletą tego biomarkera jest możliwość jego oznaczenia w łatwo dostępnym płynie ustrojowym, jakim jest mocz oraz niewielki koszt oznaczenia [87].

Cystatyna C

Cystatyna C (Cys C), endogenne inhibitory proteazy cysteinowej o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej (13 kDa), jest produkowana przez komórki jądrzaste i uwalniana do krwi ze stałą prędkością [88]. Jak już wspomniano, cystatyna C oznaczana w surowicy zyskuje coraz większe uznanie jako wskaźnik do szacowania wielkości filtracji kłębuszkowej. Wiele ostatnich badań, w tym obszerna meta-analiza dostępnych danych, wskazuje na przewagę Cys C nad kreatyniną w wykrywaniu wczesnych zmian GFR [89]. Równocześnie zostały już opracowane nowoczesne formuły do szacowania wielkości filtracji kłębuszkowej, w oparciu o stężenie cystatyny C w surowicy, bądź równania uwzględniające zarówno stężenie cystatyny C, jak i kreatyniny [90].

Oprócz oznaczania cystatyny C w próbkach krwi, niedawno zainteresowano się jej profilem w moczu. Jak już wspomniano cystatyna C, jako niewielkie białko, jest łatwo filtrowana przez kłębuszki, a następnie ulega całkowitej reabsorpcji i rozkładowi w komórkach kanalików. U zdrowych osobników ze sprawnie funkcjonującymi nerkami, stężenie cystatyny C w moczu jest śladowe. Wzrastający poziom cystatyny

C w moczu może więc świadczyć o zachodzących uszkodzeniach kanalików (funkcjonalnych i/lub strukturalnych), niezależnych od wielkości filtracji kłębuszkowej, co wykazano w wielu badaniach na przestrzeni ostatnich lat [91, 92].

Większość przytoczonych badań była przeprowadzona na populacji ludzkiej, stąd zastosowanie Cys C w badaniach przedklinicznych na zwierzętach ma swoje ograniczenia. Cystatyna C jest używana stosunkowo od niedawna, szczególnie jej poziom mierzony w moczu, dlatego brak potwierdzonych fizjologicznych norm dla różnych gatunków zwierząt może w pewnym stopniu utrudniać interpretację wyników. Jednakże rosnące zainteresowanie jakim cieszy się ten nowoczesny biomarker, sugeruje szybki postęp w badaniach przedklinicznych i jego znaczny udział w ocenie dysfunkcji nerek w niedalekiej przyszłości [93].

Ocena zmian hemodynamicznych w nerkach

Powstawanie moczu, rozpoczynające się od procesu filtracji kłębuszkowej może być w znacznym stopniu modyfikowane przez zmiany hemodynamiki wewnątrznerkowej. Selektywna filtracja osocza krwi jest możliwa ze względu na unikalne właściwości morfologiczne kłębuszków i cechy krążenia kłębuszkowego [62]. Wiele czynników musi współgrać ze sobą, umożliwiając utrzymanie optymalnego przepływu krwi przez nerki, tak aby procesy filtracji i formowania moczu zachodziły prawidłowo, niezależnie od zmian ciśnienia krwi tętniczej. Oprócz złożonego systemu autoregulacji nerkowego przepływu krwi, istnieje wiele mechanizmów i substancji, które powodują zmiany w hemodynamice nerek. Należą do nich między innymi układ renina-angiotensyna-aldosteron (układ RAA), katecholaminy, wazopresyna, endotelina, tlenek azotu, prostaglandyny, czy przedsionkowy peptyd natriuretyczny [94]. Oprócz endogennych czynników istnieje wiele egzogennych substancji, w tym leków, które także mogą modyfikować przepływ krwi przez nerki i filtrację kłębuszkową. Leki o działaniu anty-prostaglandynowym (niesterydowe leki przeciwzapalne), czy o anty-angiotensynowej aktywności (inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, blokery receptorów dla angiotensyny) mogą upośledzać autoregulację przepływu nerkowego i przyczyniać się do zaburzenia procesu filtracji kłębuszkowej [95]. Inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna, takrolimus) w zależności od dawki mogą powodować skurcz tętniczek doprowadzających kłębuszków, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia nerek, szczególnie u pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka [96]. Także użycie środków kontrastujących w badaniach obrazowych, może powodować zmiany w przepływie krwi przez nerki, co dość często prowadzi do ich ostrego uszkodzenia. CI-AKI (*ang.* acute kidney injury induced by contrast media) jest trzecią

najczęstszą przyczyną występowania AKI wśród hospitalizowanych pacjentów [97].

Badania toksykologiczne nowych leków powinny więc także uwzględniać ich potencjalny wpływ na hemodynamikę nerek, tak ważny parametr dla funkcjonowania całego organizmu. Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych dysponuje precyzyjną techniką laser-Doppler, która pozwala na dokładny pomiar przepływu krwi przez poszczególne obszary nerki szczura. Większość zespołów badawczych na świecie, do pomiarów hemodynamicznych stosuje jedną sondę rdzeniową, co stanowi dość uproszczone podejście. Rdzeń zewnętrzny i wewnętrzny nerki charakteryzują się odmienną budową oraz pełnią różne funkcje, co sugeruje, że przepływ krwi przez te strefy może podlegać osobnej i niezależnej regulacji. Tak dokładny pomiar przepływu krwi przez poszczególne strefy nerki, może więc nie tylko przynieść informacje na temat potencjalnego wpływu badanych substancji na hemodynamikę nerek, ale też określić rejon objęty uszkodzeniem zależnym od toksyczności substancji.

1.4.3 Podsumowanie

Wdrożenie nowych leków jest procesem długotrwałym i wieloetapowym. Badania obejmują szerokie spektrum metod, zaczynając od testów na liniach komórkowych, poprzez badania na zwierzętach, a kończąc na badaniach klinicznych. Na każdym etapie ocenia się inne parametry i wskaźniki. Przy odpowiednim zaprojektowaniu badań i wykorzystaniu dostępnych narzędzi badawczych, badania na zwierzętach pozwalają z dobrym przybliżeniem ocenić toksyczność nowego związku. Badania na zwierzętach prowadzone są od wielu lat, stąd dostępna jest ogromna baza danych zawierająca wartości wielu mierzonych parametrów i norm fizjologicznych dla poszczególnych gatunków zwierząt.

W przedstawionej rozprawie (ETAP 1) zaplanowano kompleksowe przebadanie nowych pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych (APren), skupiając się na obserwacji zmian w funkcjonowaniu układu wydalniczego, ponieważ, jak wykazano w powyższych rozdziałach (1.4.1) nerki są bardzo wrażliwe na działanie różnych związków. Badanie funkcji i uszkodzeń nerek jest doskonałym narzędziem do oceny toksyczności nowych terapeutyków. W badaniach wykorzystano uznane przez naukowców na całym świecie biomarkery, takie jak ocena zmian morfologicznych, wpływ podawanych substancji na masę ciała oraz masę poszczególnych narządów, czy dobowe wydalanie albuminy. W doświadczeniach ostrych u szczurów uśpionych wykorzystano unikalną technikę pomiaru przepływu krwi sondami typu laser-Doppler, która pozwala na ocenę zmian w hemodynamice nerek szczurów uśpionych, mogących być następstwem toksycznego działania podanych związków.

1.5 CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LEKÓW

Jak już wspomniano długofalowym celem projektu, którego częścią są badania przedstawione w niniejszej rozprawie, jest potencjalne zastosowanie pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych w przemyśle farmaceutycznym i pokrewnych, jako nośników substancji aktywnych farmakologicznie (leków i informacji genetycznej) ułatwiających ich przenikanie do miejsca działania oraz modyfikujących ich biodostępność w organizmie i tym samym prowadzących do uzyskania optymalnego efektu terapeutycznego.

Wstępnie zaplanowaliśmy przebadanie wpływu zamknięcia w nowych nośnikach dwóch leków o różnym działaniu, właściwościach i strukturze. Początkowo do tego celu wybrano: desmopresynę – lek hydrofilowy, o dość szybkim działaniu oraz spironolakton – związek hydrofobowy, powodujący poważne skutki uboczne. Dawki leków zostały ustalone na podstawie badań wstępnych i przeglądu dostępnej literatury w taki sposób aby nie wywoływały maksymalnego efektu terapeutycznego. W ten sposób chciano odróżnić skuteczność terapeutyczną leków podanych w nowo zaprojektowanych nośnikach, od efektywności po podaniu wybranych terapeutyków w klasycznych rozpuszczalnikach. Kompozycja samych nośników liposomowych była stosunkowo prosta, ponieważ składały się one tylko z podstawowego budulca, jakim jest dioleilo-fosfatydylo-etanolamina (DOPE) oraz badanych pochodnych – APren. Miało to na celu zbadanie właściwości samych amino-prenoli i ich przydatności jako składników liposomowych nośników leków, bez wpływu innych substancji używanych w preparatyce liposomów. W przyszłości możliwe jest wzbogacenie składu zaprojektowanych nośników o kolejne substancje pomocnicze, tak aby poprawić ich właściwości (wytrzymałość, struktura powierzchni, czy „ładowność”), ale na tym etapie badań skupiono się na ocenie efektu samych amino-prenoli.

Wszystkie roztwory liposomowe były przygotowywane w Zakładzie Biochemii Lipidów IBB PAN przez Katarzynę Gawarecką. Desmopresynę w wybranej dawce zamknięto w nowo zaprojektowanych nośnikach nie napotykając na większe trudności. Jednakże spironolaktonu nie udało się zamknąć w nowo zaprojektowanych liposomach z amino-prenolami, ani w liposomach złożonych z samego DOPE, mimo wielu prób i włożonego wysiłku. Z tego względu rozpoczęto poszukiwania kolejnych farmaceutyków, które mogłyby być użyte w zaplanowanych doświadczeniach. Drugim związkiem, na który zwrócono uwagę był FAD 286 – stosunkowo niedawno zsyntetyzowany inhibitor syntazy aldosteronu. Ponownie nie udało się zamknąć terapeutycznej dawki FAD 286 w liposomowych nośnikach z amino-prenolami. Ostatecznie, lekiem,

który z powodzeniem zamknięto w odpowiedniej dawce był kandesartan – antagonistą receptorów AT₁ dla angiotensyny II i tego związku użyto do badań ostatniego etapu.

1.5.1 Desmopresyna

Desmopresyna (dDAVP, deamino-D-argininowazopresyna) jest analogiem wazopresyny (*ang.* Arginine Vasopressin, AVP), inaczej zwanej hormonem antydiuretycznym (*ang.* Antidiuretic Hormone, ADH), który pełni w organizmie wiele ważnych funkcji [98]. AVP odpowiedzialna jest przede wszystkim za regulację osmolalności płynów ustrojowych, objętości krwi oraz ciśnienia krwi tętniczej, ale zaangażowana jest także w wiele innych procesów, takich jak proliferacja komórek, czy wydzielanie hormonu adrenokortykotropowego w warunkach stresu [98]. Działanie wazopresyny związane jest z wieloma podtypami receptorów. Można wyróżnić trzy najważniejsze, czyli transbłonowe receptory sprzężone z białkiem G, tj. V₁R, V₂R oraz dopiero niedawno zidentyfikowane receptory przysadkowe V₃R (dawniej zwane V_{1b}R) [99]. Receptory V₁R występują powszechnie w wielu komórkach, a w szczególności w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, gdzie odpowiedzialne są za skurcz naczyń, co powoduje wzrost ciśnienia krwi. Receptory V₂R zlokalizowane są głównie w komórkach kanalików zbiorczych nerki na błonie podstawno-bocznej tworzących ją komórek nabłonkowych i odpowiedzialne są za regulację wydalania wody przez nerki. Receptory V₂R można także znaleźć w komórkach śródbłonna, gdzie zaangażowane są w utrzymanie hemostazy poprzez uwalnianie czynnika von Willebranda [100].

Desmopresyna, czyli syntetyczny analog wazopresyny, posiada znacznie większe powinowactwo do receptorów V₂R, stąd cechuje ją silniejsze działanie antydiuretyczne, a znacznie słabsze działanie naczyniokurczące [98]. Regulacja procesu zagęszczania moczu poprzez stymulację receptorów V₂R, wiąże się przede wszystkim z przemieszczaniem zlokalizowanych w kanalikach nerkowych kanałów dla wody czyli akwaporyn (AQP).

Akwaporyny są to wyspecjalizowane białka błonowe, które umożliwiają transport wody przez błony biologiczne w wielu komórkach i tkankach [101]. Akwaporyny zlokalizowane w nerkach odgrywają szczególnie ważną rolę w organizmie, ponieważ ich działanie jest kluczowe dla utrzymania prawidłowej objętości i składu płynów ustrojowych w organizmie. Akwaporyny ssaków, o masie cząsteczkowej 28 kDa, są tetramerami, zbudowanymi z czterech monomerycznych jednostek [102]. Do tej pory zidentyfikowano 13 różnych akwaporyn u ssaków, z czego 8 występuje w nerkach [103]. Akwaporyna typu 1 (AQP1) występuje w dużej gęstości przede wszystkim w kanaliku proksymalnym oraz zstępującym

ramieniu pętli Henlego [101], co koreluje z ogromną przepuszczalnością tych odcinków dla wody. Dalsze odcinki kanalika nerkowego, takie jak kanalik zbiorczy, charakteryzują się zmienną przepuszczalnością dla wody. Proces ten regulowany jest przez wspomnianą wcześniej wazopresynę w dwojaki sposób. Krótkotrwały efekt związany jest z uwolnieniem akwaporyn typu 2 (AQP2) z wewnątrzkomórkowych pęcherzyków, w których są magazynowane i ich przemieszczaniem w kierunku błony komórkowej (*ang.* AQP2 trafficking). Stymulacja V_2R przez wazopresynę (lub jej analogi) uruchamia kaskadę sygnałów, w której pierwszym etapem jest aktywacja cykloazy adenylowej, co powoduje zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP, a następnie prowadzi do aktywacji kinazy białkowej A. AQP2 zostaje ufosforylowana i migruje z wewnątrzkomórkowych pęcherzyków do błony komórkowej od strony światła kanalika, w którą jest wbudowywana, czyniąc ją przepuszczalną dla wody. Jest to proces stosunkowo szybki (trwający kilka minut), który umożliwia intensywną reabsorpcję wody w kanaliku zbiorczym [104]. Dodatkowo kinaza białkowa A oraz prawdopodobnie białko Epac (*ang.* Exchange Protein Activated by cAMP) intensyfikują samą syntezę kanałów wodnych AQP2, co związane jest z długotrwałą odpowiedzią na aktywację receptorów V_2R (od kilku godzin do kilku dni) przez wazopresynę lub jej analogi [104].

Desmopresyna, selektywnie stymulując receptory V_2R , zwiększa reabsorpcję wody w kanaliku zbiorczym, co prowadzi do zagęszczenia moczu i opóźnienia potrzeby oddawania moczu (mikcja). dDAVP po raz pierwszy została zastosowana w 1972 roku w leczeniu centralnej (ośrodkowej) postaci moczówki prostej [98]. Do tej pory desmopresyny używa się w leczeniu i diagnostyce wielu innych chorób, takich jak moczówka prosta, różne odmiany moczenia nocnego (u chorych powyżej piątego roku życia) [105], w tym u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym [106], w leczeniu i diagnostyce zaburzeń krzepnięcia krwi [107], do utrzymywania hemostazy u pacjentów z łagodną odmianą hemofilii A, chorobą von Willebranda typu 1, czy nabytych zaburzeniach ilościowych płytek krwi [108]. W zależności od przeznaczenia desmopresyna podawana jest w różnych postaciach (aerozol do nosa, roztwór do zastrzyków dożylnych, podskórnych i domięśniowych, czy tabletki doustne) [98]. Niezależnie od przyjmowanej postaci leku czy długości leczenia, dDAVP jest dobrze tolerowana, a skutki uboczne jej podawania występują stosunkowo rzadko [98]. Do najczęstszych działań niepożądanych należą zawroty głowy, osłabienie, wymioty czy biegunka [105]. W nielicznych przypadkach u pacjentów leczonych desmopresyną (1 na 10000) występowała hiponatremia, czyli stan obniżonego poziomu sodu we krwi [98], który może być bardzo groźny dla organizmu. Jednakże przestrzeganie prawidłowego przyjmowania zaleconych dawek

desmopresyny, znacznie ogranicza ryzyko wystąpienia hiponatremii oraz innych skutków ubocznych.

1.5.2 Kandesartan

Kandesartan jest lipofilowym lekiem, należącym do grupy sartanów, czyli antagonistów receptorów AT₁ dla angiotensyny II (ANG II), powszechnie używanym w leczeniu nadciśnienia tętniczego [109]. Sartany uniemożliwiają działanie ANG II, która uwalniana jest przez układ renina-angiotensyna-aldosteron (układ RAA). W warunkach fizjologicznych układ RAA odpowiedzialny jest za kontrolę napięcia ścian naczyń krwionośnych i pośrednio za regulację objętości krwi i stężenia jonów sodowych oraz potasowych w płynach ustrojowych. Ścieżka powstawania ANG II rozpoczyna się od wydzielania reniny, która przekształca angiotensynogen do angiotensyny I (ANG I). Następnie enzym konwertujący (*ang. angiotensin converting enzyme*, ACE) przekształca ANG I do ANG II. Angiotensyna II charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności, od bezpośredniego działania naczyniokurczącego, poprzez pobudzenie układu współczulnego, zwiększenie wydzielania aldosteronu, który intensyfikuje reabsorpcję sodu w kanaliku zbiorczym nerki; wszystko to prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej [110]. Kandesartan jako selektywny antagonist receptorów AT₁ dla ANG II jest używany w leczeniu nadciśnienia tętniczego. Podaje się go doustnie w postaci estryfikowanego proleku o nazwie kandesartan cyleksetylu (*ang. candesartan cilexetil*), który jest absorbowany w ścianach układu pokarmowego i hydrolizowany do aktywnej postaci – kandesartanu [109]. Ze względu na niecałkowitą absorbcję proleku w ścianach układu pokarmowego, biodostępność kandasartanu po podaniu doustnym, jest stosunkowo niska (40%) [109]. Kandesartan usuwany jest głównie przez nerki oraz w niewielkim stopniu przez drogi żółciowe i drogą jelitową. Kandesartan jest metabolizowany jedynie w niewielkim stopniu w wątrobie [111].

Kandesartan posiada największe powinowactwo do receptorów AT₁ spośród dostępnych blokerów receptorów dla angiotensyny (*ang. angiotensin receptor blockers*, ARBs) [112].

2. CELE BADAŃ

ETAP1: Toksyczność APren-7

Określenie wpływu (toksyczności) liposomów z APren-7 na organizmy żywe (doświadczenia chroniczne trwające cztery tygodnie, podczas których samce szczurów Sprague-Dawley otrzymywały iniekcje podskórne badanych nośników z APren-7, zakończone doświadczeniami ostrymi);

ETAP 2: Efektywność desmopresyny zamkniętej w nośnikach zawierających APren-7

Ustalenie wpływu desmopresyny (analog wazopresyny o antydiuretycznej aktywności) zamkniętej w nowych nośnikach zawierających APren-7 na przebieg diurezy wodnej (doświadczenia ostre na szczurach uśpionych z wywołaną diurezą wodną ETAP 2.1) oraz ustalenie jej farmakokinetyki po podaniu w liposomowych nośnikach (doświadczenia na szczurach czuwających w klatkach metabolicznych, ETAP 2.2);

ETAP 3: Efektywność kandesartanu zamkniętego w nośnikach zawierających APren-7

Zbadanie wpływu kandesartanu zamkniętego w liposomach z APren-7 na nadciśnienie o podłożu genetycznym (szczury SHR; *ang.* Spontaneously Hypertensive Rats) (doświadczenia chroniczne na szczurach czuwających zakończone doświadczeniami ostrymi na szczurach w uśpieniu)

3. MATERIAŁY I METODY

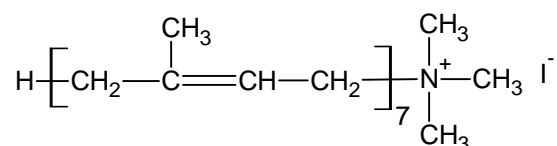
3.1 ZWIERZĘTA

Do doświadczeń wykorzystano samce szczurów stada Sprague-Dawley (n=76) oraz SHR (*ang.* Spontaneously Hypertensive Rats; n=32) ze zwierzętarni IMDiK PAN. Procedury doświadczalne zostały zaaprobowane przez IV Lokalną Komisję Etyczną d.s. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała Nr 58/2010 z dnia 10.09.2010 r. do wniosku 45/2010; Uchwała Nr 47/2012 z dnia 01.06.2012 r. do wniosku 43/2012; Uchwała Nr 12/2014 z dnia 15.04.2014 r. do wniosku 12/2014).

3.2 PRZYGOTOWANIE BADANYCH SUBSTANCJI

3.2.1 Jodek heptaprenylotrimetyloamonu (APren-7)

Do badań wyselekcjonowany został związek zawierający siedem jednostek izoprenowych. Najpierw odpowiedni alkohol poliizoprenoidowy został wyekstrahowany z drewna brzozy w Zakładzie Biochemii Lipidów (ZBL) IBB PAN, a następnie poddany chemicznym modyfikacjom do ostatecznej postaci (**Ryc. 6**) w Instytucie Chemii Organicznej według zoptymalizowanej procedury [27].



Ryc. 6. Struktura jodku heptaprenylotrimetyloamonu (APren-7)

3.2.2 Zawiesiny liposomowe

Zawiesiny liposomów do iniekcji były przygotowane w ZBL IBB PAN przy współpracy z Katarzyną Gawarecką, metodą uwodnienia (hydratacji) filmu lipidowego i ekstruzji przez porowatą membranę.

- *Klasyczne liposomy (L)*

Roztwór dioleilo-fosfatydylo-etanolaminy (DOPE, Sigma) w chloroformie (90 mg/ml) w objętości 55 μl suszono wstępnie w strumieniu sprężonego azotu do postaci cienkiego filmu na dnie próbówki, a następnie przez noc w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem. Po tym czasie do wytworzonego filmu lipidowego dodawano wody i wytrząsano na wortexie każdą z próbek przez co najmniej 8 min w celu otrzymania

wielowarstwowych liposomów, które następnie poddawano siedmiokrotnemu przeciskaniu (ekstruzji) przez porowatą membranę (ekstruder LiposoFast, Avestin Europe GmbH, Mannheim, Niemcy) do postaci jednowarstwowych liposomów o jednakowej średnicy (100 nm).

- *Liposomy z APren-7 (LP)*

Roztwór DOPE w chloroformie (90 mg/ml) w objętości 50 µl oraz roztwór APren-7 w chloroformie (18 mg/ml, stosunek molowy DOPE:APren-7 10:1) w objętości 25 µl zmieszano, następnie postępowano analogicznie jak przy przygotowaniu klasycznych liposomów (L).

- *Roztwór desmopresyny zamkniętej w liposomach z APren-7 (dD+LP)*

Podobną procedurę jak opisano powyżej wykorzystano do przygotowania roztworu desmopresyny (dDAVP, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]-Vasopressinacetate salt hydrate, Sigma) zamkniętej w liposomach z APren-7. Po odparowaniu resztek rozpuszczalnika w eksykatorze do mieszaniny DOPE (9 mg) i APren-7 (0,9 mg) dodawano 1 ml roztworu dDAVP (0,5 mg/ml) oraz 0,5 ml wody, następnie wytrząsano przez 15 min. Po przecięciu przez membranę przenoszono próbki do ultrawirówki w celu oddzielenia liposomów od wolnej dDAVP (450000 g, 80 min). Następnie zlewano frakcję płynną (supernatant), a pozostałą frakcję stałą (pelet) trzykrotnie przepłukiwano 1 ml wody. Po zważeniu w celu określenia zawartości liposomów, rozprowadzano frakcję stałą w 300 µl wody. Zawartość leku w przygotowanym roztworze weryfikowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem UV (HPLC/UV; kolumna 4.6 x 250 mm Cosmosil 5C18-AR-II, przepływ izokratyczny, rozpuszczalnik acetonitryl/kwas trifluorooctowy, 17 min; detektor: Waters Photodiode Array Detector).

- *Roztwór kandesartanu zamkniętego w liposomach z APren-7 (C+LP)*

Roztwór DOPE w chloroformie (90 mg/ml) w objętości 50 µl, roztwór APren-7 w chloroformie (9 mg/ml, stosunek molowy DOPE:APren-7 10:1) w objętości 25 µl oraz roztwór kandesartanu (1 mg/ml) w objętości 50 µl suszono wstępnie w strumieniu sprężonego azotu do postaci cienkiego filmu na dnie próbki, a następnie przez noc w eksykatorze pod obniżonym ciśnieniem. Po tym czasie do wytworzonego filmu lipidowego dodawano 450 µl gorącej wody (82°C), krótko wytrząsano (2 min) i ogrzewano w łaźni wodnej przez 10 min (82°C), następnie powtarzano ogrzewanie w łaźni wodnej przez kolejne 10 min (82°C) i wytrząsano na wortexie każdą z próbek przez 6 min, w celu otrzymania wielowarstwowych liposomów, które następnie poddawano kilkukrotnej ekstruzji przez porowatą membranę, do postaci jednowarstwowych liposomów o jednakowej średnicy (100 nm). Zawartość kandesartanu w

przygotowanym roztworze weryfikowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej z detektorem UV (HPLC/UV; kolumna 4.6 x 250 mm Cosmosil 5C18-AR-II, przepływ izokratyczny, rozpuszczalnik metanol pH 6.0 – 6.5, 8 min; detektor: Waters Photodiode Array Detector).

- *Roztwór kandesartanu zamkniętego w klasycznych liposomach (C+L)*

Roztwór DOPE w chloroformie (99 mg/ml) w objętości 55 µl oraz roztwór kandesartanu (1 mg/ml) w objętości 50 µl zmieszano, a następnie postępowano analogicznie jak przy przygotowaniu roztworu kandesartanu zamkniętego w liposomach z APren-7 (C+LP).

3.2.3 Roztwory kontrolne

- *Roztwór desmopresyny w wodzie (dD+W)*

Desmopresynę pobierano w odpowiedniej ilości z roztworu (80 ng/ml), w zależności od masy ciała szczura (dawka 60 ng/kg).

- *Woda do iniekcji (W)*

W doświadczeniach chronicznych jako kontrolę podawano sterylną wodę do iniekcji z ampulek 5 ml (Polpharma SA).

- *Roztwór kandesartanu w węglanie sodu (C+WS)*

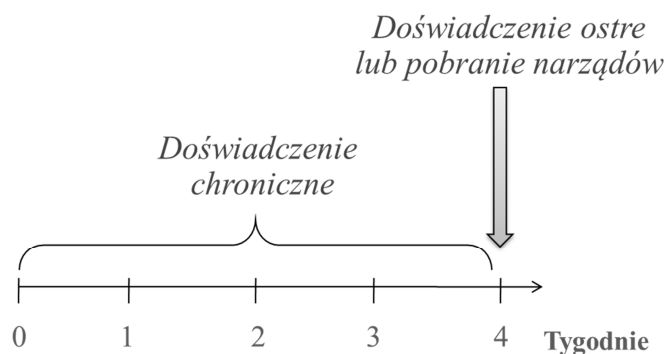
Przygotowano roztwór wyjściowy kandesartanu (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) o stężeniu 0,75 mg/ml 0,1 N węglanu sodu (Na_2CO_3). Z tak przygotowanego roztworu pobierano 200 µl i dopełniono roztworem buforowanej soli fizjologicznej (PBS) do 5 ml (dawka 0,1 mg/kg).

- *Węglan sodu w PBS-ie (WS)*

0,1 N roztwór węglanu sodu (Na_2CO_3) mieszano z PBS w proporcji 1:24

3.3 TOKSYCZNOŚĆ APren-7 (ETAP 1)

Model doświadczalny stanowiły samce szczurów Sprague-Dawley o początkowej masie ciała 154 ± 3 g (n=39). Eksperymenty tej części rozprawy doktorskiej podzielono na następujące etapy: czterotygodniowe doświadczenia chroniczne na czuwających szczurach, zakończone doświadczeniami ostrymi na szczurach w narkozie (**Ryc. 7**). Z całkowitej puli zwierząt po doświadczeniach chronicznych część szczurów została wykorzystana tylko do pobrania narządów w celu przeprowadzenia analizy morfometrycznej, biochemicznej i histologicznej (nie przeprowadzano doświadczenia ostrego).



Ryc. 7. Schemat doświadczenia ETAPU 1

3.3.1 Doświadczenia chroniczne

Przez cały okres trwania doświadczenia chronicznego zwierzęta miały dostęp do paszy standardowej (STD, 0,25% Na w/w, SSNIFF GmbH, Soest, Niemcy) i świeżej wody. W pierwszym tygodniu doświadczenia chronicznego wszystkie szczury były przyzwyczajane do eksperymentatorów, pomieszczeń doświadczalnych, aparatury pomiarowej i zabiegów, którym były później poddawane. Miało to na celu zminimalizowanie stresu związanego z wykonywanymi czynnościami, jak na przykład unieruchomieniem zwierząt podczas pomiarów ciśnienia metodą rękawów okluzyjnych na ogonie. Następnie codziennie przez kolejne cztery tygodnie wszystkie zwierzęta otrzymywały podskórne zastrzyki ze świeżo przygotowanych roztworów:

- L – „klasyczne” liposomy zbudowane z DOPE (n=13);
- LP – liposomy zbudowane z DOPE i APren-7 (n=13);
- W – woda do iniekcji (n=12).

Raz w tygodniu czuwającym szczurom mierzono na ogonie skurczowe ciśnienie krwi (SBP, nieinwazyjna technika mankietów okluzyjnych, system CODA, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA); pobierano krew z żyły ogonowej w celu oznaczenia stężenia substancji osmotycznie czynnych (P_{osm}), stężenia jonów Na^+ (P_{Na}) oraz hematokrytu (Ht); prowadzono dobowe obserwacje w klatkach metabolicznych [Tecniplast S.p.A. Buguggiate, Włochy] połączone z dobowym bilansem płynów (spżycie wody i diureza (V)), pomiarem spożycia paszy i wydalanego kału oraz pomiarem tempa wydalania substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm} \cdot V$), sodu ($U_{Na} \cdot V$), potasu ($U_K \cdot V$), albuminy i metabolitów tlenu azotu w moczu.

3.3.2 Doświadczenia ostre

Ostatniego dnia doświadczenia chronicznego zwierzęta usypiano za pomocą tiopentalu sodu (100 mg/kg i.p.; Thiopental, Sandoz GmbH, Kundl, Austria) i przygotowywano chirurgicznie do pomiarów czynności nerek i parametrów krążeniowych. Stała temperatura ciała szczura (37°C) była utrzymywana automatycznym systemem grzewczym (Fine Science Tools TR-200 21052-00 Animal Temperature Controller, Biodirect Inc, Taunton, MA, USA) z czujnikiem temperatury umieszczonym w odbycie.

W celu zapewnienia swobodnej wymiany gazowej w tchawicy umieszczano rurkę polietylenową (tracheotomia). Do żyły szyjnej wprowadzano kaniulę polietylenową do infuzji 3% roztworu albuminy bydlęcej (albumina, frakcja V, Appli Chem GmbH, Darmstadt, Niemcy) w płynie Ringera (10 ml/kg/h; Baxter Polska Sp. z o. o., Warszawa, Polska) celem uzupełnienia ubytku płynów powstałego podczas zabiegów chirurgicznych. Do aorty przez tętnicę udową wprowadzano kaniulę teflonową do pomiaru średniego ciśnienia krwi (MBP; Transducer M1567A, Philips Medizin Systeme Böblingen GmbH, Böblingen, Niemcy). Po wykonaniu cięcia lędźwiowego, delikatnie oczyszczano lewą nerkę z otaczających tkanek i tłuszczu, pozostawiając nienaruszoną torebkę włóknistą oraz szypułę nerkową. Uwolnioną nerkę umieszczano na holderze stosowanym do badań mikropunkcyjnych. Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF, ml/min) mierzono sondą elektroakustyczną typu MAPRB, połączoną z przepływomierzem ultradźwiękowym (model T106, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA) założoną na tętnicę nerkową, po jej częściowym oddzieleniu od żyły i otaczających tkanek. Następnie kaniulowano moczowód w celu pomiaru diurezy i zbiórki moczu do badań (wykonano takie same oznaczenia jak w moczu pobranym w doświadczeniach chronicznych). Pomiary hemodynamiczne (przepływ krwi przez strefy nerki) prowadzono sondami światłowodowymi połączonymi z miernikiem przepływu typu laser-Doppler (system Periflux 4001, Perimed AB, Jarfalla, Szwecja). Przepływ przez korę nerki (CBF) mierzono sondą powierzchniową (PF 407). Do pomiaru przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF) wykorzystano sondę igłową wklutą na głębokość 3 mm (PF 402) a przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny (IMBF) mierzono sondą igłową (PF 402) umieszczoną na głębokości 5 mm. Przepływ krwi wyrażano w umownych jednostkach PU (Perfusion Unit). Kalibracja sond w płynie kalibracyjnym (sygnał pomiarowy swobodnych ruchów Browna = 250 PU) umożliwiała porównywanie pomiarów pomiędzy kolejnymi seriami doświadczeń. Po zakończeniu doświadczenia położenie sond w tkance weryfikowano przez cięcie podłużne w osi nerki.

3.3.3 Pobieranie narządów

Po zakończeniu obserwacji chronicznych od części zwierząt pobierano narządy w celu przeprowadzenia analizy morfometrycznej, biochemicznej i histologicznej (nie wykonywano doświadczenia ostrego). Zwierzęta usypiano za pomocą tiopentalu sodu (100 mg/kg i.p.), pobierano mocz z pęcherza, a następnie wycinano prawą nerkę, ważono i utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA; Eurochem BGD Sp. z o. o., Tarnów, Polska). Igłą iniekcijną pobierano krew z aorty. Wycinano serce, ważono i za pomocą precyzyjnych narzędzi chirurgicznych wycinano lewą komorę serca, którą ważono, a następnie zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C . Z zebrany moczem i krwią postępowano tak samo jak z materiałem zebrany w doświadczeniach chronicznych i ostrych.

3.4 EFEKTYWNOŚĆ DESMOPRESYNY ZAMKNIĘTEJ W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 2)

Doświadczenia tej części dysertacji podzielono na dwie części. W doświadczeniach ostrych (ETAP 2.1) określany był wpływ zamknięcia desmopresyny w nośnikach liposomowych zawierających APren-7 na jej biodostępność i efektywność hamowania diurezy wodnej. Osobną grupę szczurów przygotowano chirurgicznie do badania farmakokinetyki desmopresyny podanej w nowych nośnikach (ETAP 2.2); doświadczenia wykonano na Stanowisku Metaboliczno-Telemetrycznym (SMT) Zakładu Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych, które jest wyposażone w system ABST (ang. Automated Blood Sampler and Telemetry) umożliwiający automatyczne pobieranie krwi i podawanie leków szczurom czuwającym.

3.4.1 Doświadczenia ostre (ETAP 2.1)

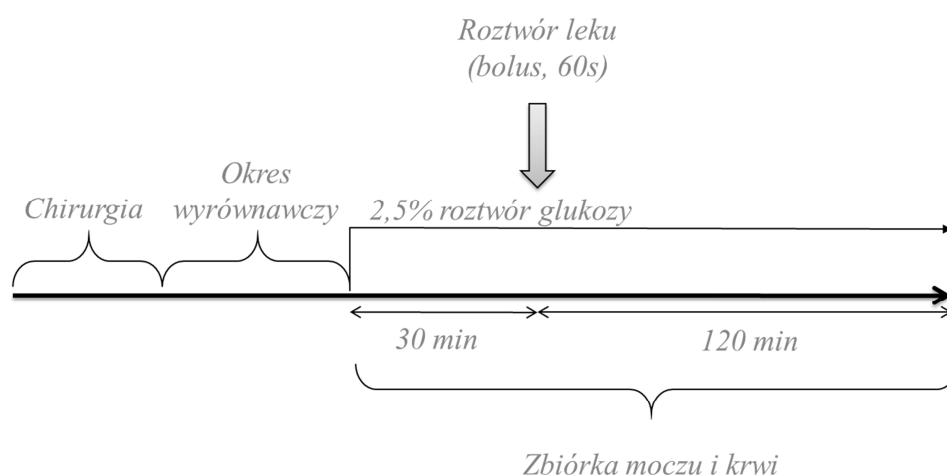
Model doświadczalny stanowiły samce szczurów Sprague-Dawley o średniej masie ciała 299 ± 3 g ($n=26$). Przygotowanie chirurgiczne zwierząt do doświadczeń ostrych tej części było zbliżone do opisanego powyżej doświadczenia ostrego ETAPU 1 (podrozdział 3.3.2.). Oprócz tracheotomii, zakaniulowania żyły szyjnej do podawania infuzji oraz tętnicy udowej do pomiaru ciśnienia szczurom kaniulowano pęcherz moczowy w celu pomiaru diurezy z prawej nerki. Po wykonaniu 1 cm nacięcia wzdłuż linii białej, delikatnie wysuwano pęcherz na zewnątrz, a następnie wykonywano niewielkie nacięcie samego pęcherza, w którym umieszczano specjalnie przygotowaną polietylenową kaniulę zakończoną kołnierzem. Koniec pęcherza zamykano na kaniuli przy użyciu nici chirurgicznej w celu zapewnienia szczelności układu. Dodatkowo do drugiej tętnicy udowej wprowadzano krótką kaniulę teflonową w celu pobierania próbek krwi w określonych punktach czasowych (mierzone stężenie substancji osmotycznie czynnych w osoczu, P_{osm}). Następnie postępowano jak

opisano powyżej (podrozdział 3.3.2). Po wykonaniu cięcia lędźwiowego i oczyszczeniu nerki zakładano sondę elektroakustyczną na tętnice nerkową w celu pomiaru RBF; kaniulowano moczowód (pomiar diurezy z lewej nerki (V) i zbiórka moczu do analizy (U_{osmV}) oraz umieszczano sondy typu laser-Doppler w celu przeprowadzenia pomiarów hemodynamicznych (CBF, OMBF, IMBF).

Po przygotowaniu chirurgicznym i po okresie wyrównawczym (30 min), wywoływano stan wzmożonej diurezy wodnej przez dożylnie podanie 2,5% roztworu glukozy z prędkością 36 ml/kg/h (infuzję kontynuowano przez całe doświadczenie, **Ryc. 8**). Po 30 minutach od początku infuzji roztworu glukozy podawano jako bolus (0,5 ml w ciągu 1 min) jeden z następujących roztworów w zależności od grupy:

- dD+LP – desmopresynę zamkniętą w liposomach z APren-7 (60 ng/kg dDAVP; n=7);
- dD+W– desmopresyna rozpuszczona w wodzie (60 ng/kg dDAVP, n=6);
- LP – puste liposomy z APren-7 (n=7).
- W – sam rozpuszczalnik (n=6);

Przez całe doświadczenie podawano również 0,5% roztwór inuliny (36 ml/kg/h) do późniejszego oznaczenia przesączania kłębuszkowego (*ang.* Glomerular Filtration Rate, GFR). Po zakończeniu doświadczenia ostrego prawą nerkę wycinano, a następnie przygotowywano do wykonania barwienia hematoksyliną i eozyną oraz znakowania przeciwciałami skierowanymi przeciwko akwaporynie 2, w celu określenia jej dokładnej lokalizacji.



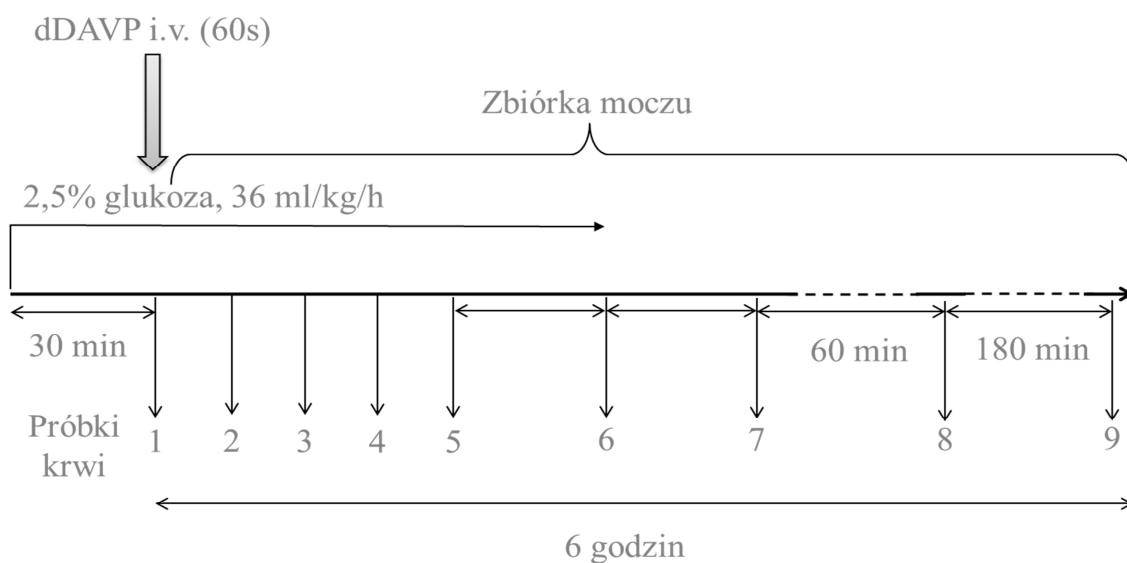
Ryc. 8. Schemat doświadczenia ostrego ETAPU 2.1

3.4.2 Farmakokinetyka desmopresyny (ETAP 2.2)

Ponownie model doświadczalny stanowiły samce szczurów Sprague-Dawley o średniej masie ciała 284 ± 10 g ($n=11$). Siedem dni przed rozpoczęciem właściwego eksperymentu wykonywano w krótkotrwałej narkozie [pentobarbital sodu w dawce 50 mg/kg masy ciała (Biowet, Puławy)] zabiegi chirurgiczne umożliwiające prowadzenie doświadczeń na zwierzętach czuwających. Do żyły udowej (infuzja leku) oraz do tętnicy udowej (pobieranie próbek krwi) wprowadzono kaniule o średnicy 0,33 mm (Micro-Renathan, Bioseb, Vitrolles, Francja). Ujścia kaniul wyprowadzono przez otwór wykonany w skórze na karku i unieruchomiono szwami. W celu zabezpieczenia drożności kaniul wypełniono je przeciwzakrzepowym roztworem Citra-Lock™ 4% (również o działaniu antybakteryjnym; Dirinco B.V. Oss, Holandia). Kaniule przepłukiwano co drugi dzień. Na 3 dni przed właściwym doświadczeniem szczury przenoszono do klatek metabolicznych (BASi, West Lafayette, USA), które są połączone z systemem EMPIS® (automatyczny system infuzji substancji czynnych do naczyń krwionośnych lub innych wybranych lokalizacji w ciele zwierzęcia) oraz systemem Culex® (zautomatyzowany system do pobierania próbek płynów ustrojowych *in vivo* oraz magazynowania ich w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$). Rano w dniu doświadczenia (analogicznie do schematu postępowania doświadczenia ostrego ETAPU 2.1, **Ryc. 9**) szczurom podawano 2,5% roztwór glukozy (36 ml/kg/h, infuzję kontynuowano przez 2 godziny) w celu wywołania diurezy wodnej; następnie po upływie 30 min podawano roztwór leku jako bolus (0,5 ml w ciągu 1 min):

- dD+LP – desmopresynę zamkniętą w liposomach z APren-7 (60 ng/kg dDAVP, $n=6$);
- dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie (60 ng/kg dDAVP, $n=5$);

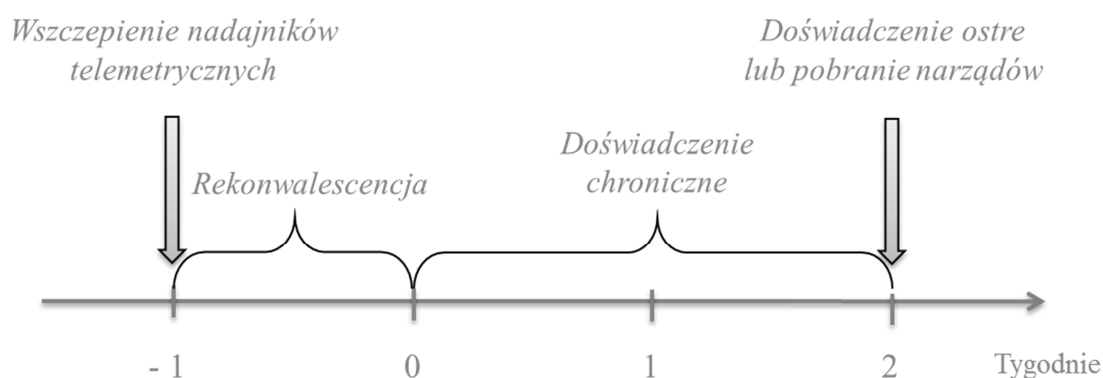
Przez całe doświadczenie mierzono diurezę i pobierano próbki krwi po 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 oraz 360 min od podania leku (w sumie 9 próbek w ciągu 6 godz.) w celu oznaczenia zmian stężenia osocznego desmopresyny w czasie.



Ryc. 9. Schemat badania farmakokinetyki desmopresyny (ETAP 2.2)

3.5 EFEKTYWNOŚĆ KANDESARTANU ZAMKNIĘTEGO W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 3)

W trzecim etapie badań wykorzystano szczury SHR o średniej, początkowej masie ciała 301 ± 3 g ($n=32$). Eksperymenty tej części podzielono na następujące etapy: dwutygodniowe doświadczenia chroniczne na czuwających szczurach, zakończone doświadczeniami ostrymi na szczurach w narkozie (**Ryc. 10**). Od części szczurów poddanych doświadczeniom chronicznym pobrano narządy w celu przeprowadzenia analizy morfometrycznej, biochemicznej i histologicznej (nie przeprowadzono doświadczenia ostrego).



Ryc. 10. Schemat doświadczenia chronicznego ETAPU 3

3.5.1 Doświadczenia chroniczne

Przez cały okres trwania doświadczenia chronicznego zwierzęta miały dostęp do paszy standardowej (STD, 0,25% Na w/w, SSNIFF GmbH, Soest, Niemcy) i świeżej wody. Na tydzień przed właściwym

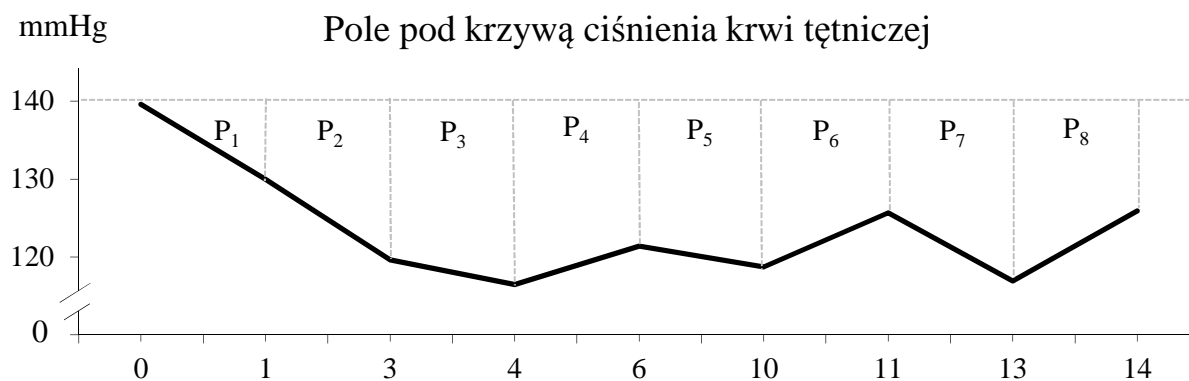
doświadczeniem szczury zostały poddane zabiegowi chirurgicznemu mającemu na celu wszczepienie sond telemetrycznych (Data Sciences International, St. Paul, USA). Szczury zostały uśpione pentobarbitem sodu (Biowet, Puławy; 50 mg/kg masy ciała; dootrzewnowo), który jest pochodną kwasu barbiturowego wykazującą u gryzoni działanie narkotyczne i przeciwbólne.

Po tygodniowej rekonwalescencji codziennie przez 14 dni zwierzęta otrzymywały podskórne zastrzyki ze świeżo przygotowanych roztworów:

- C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7 (0,1 mg/kg; n=8);
- C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE (0,1 mg/kg; n=8);
- C+WS – kandesartan rozpuszczony w 0,1 N roztworze węgla sodu (Na_2CO_3) w PBS w stosunku 1:24 (0,1 mg/kg; n=8).
- WS – sam rozpuszczalnik (jw.; n=8)

Dwa razy w tygodniu czuwającym szczurom mierzono ciśnienie krwi tętniczej (telemetria). Raz w tygodniu pobierano krew z żyły ogonowej w celu oznaczenia hematokrytu (Ht), stężenia substancji osmotycznie czynnych (P_{osm}), jonów Na^+ (P_{Na}), K^+ (P_{K}) oraz kreatyniny; prowadzono dobowe obserwacje w klatkach metabolicznych (Tecniplast S.p.A. Buguggiate, Włochy) połączonych z bilansem płynów [spżycie wody i diureza (V)], spżycia paszy i wydalanego kału oraz dobową zbiórką moczu w celu oznaczenia wydalania substancji osmotycznie czynnych ($U_{\text{osm}} \cdot V$), sodu ($U_{\text{Na}} \cdot V$) i potasu ($U_{\text{K}} \cdot V$) oraz dobowego wydalania albuminy.

Do interpretacji wyników pomiarów ciśnienia krwi tętniczej, między innymi, wykorzystano porównanie wartości pola pod krzywą zmian ciśnienia, liczoną metoda sumowania pól trapezów. Wykorzystaną metodę zilustrowano na **Ryc. 11**. Pole pod krzywą obliczono ze wzoru: $P_{\text{całk.}} = P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_8$



Ryc. 11. Schematyczne przedstawienie metody sumowania pól trapezów, którą użyto do wyliczenia pola pod krzywą wykresu ciśnienia krwi tętniczej

3.5.2 Doświadczenia ostre

Po przygotowaniu chirurgicznym zwierząt do doświadczeń ostrych [analogicznie do opisanych powyżej doświadczeń ostrych Etapu 1 (podrozdział 3.3.2)] u wszystkich zwierząt przeprowadzono krótkie pomiary czynności nerek i parametrów krążeniowych. W skrócie: po tracheotomii i zakaniulowaniu naczyń – tętnicy udowej do pomiaru ciśnienia i pobierania próbek krwi oraz żyły szyjnej do podawania infuzji [3% roztwór albuminy bydlęcej i roztwór 1,5% inuliny (10 ml/kg/h) do oznaczenia przesączania kłębuszkowego (GFR)] – odsłaniano nerkę w celu pomiarów hemodynamicznych (RBF, CBF, OMBF, IMBF). Dokonywano pomiaru diurezy (V) i zbiórki moczu do analizy. Z zebranymi próbkami moczu i krwi postępowano tak samo jak z materiałem zebrany w doświadczeniach chronicznych.

3.5.3 Pobieranie narządów

Po zakończeniu obserwacji chronicznych od części zwierząt pobierano tylko narządy (bez doświadczenia ostrego) w celu przeprowadzenia analizy morfometrycznej, biochemicznej i histologicznej. Zastosowano procedurę opisaną w Etapie 1 (podrozdział 3.3.3).

3.6 ANALIZA ZEBRANEGO MATERIAŁU

3.6.1 Analiza próbek moczu i krwi

Po określeniu objętości moczu (V) metodą grawimetryczną (zakładając gęstość moczu równą gęstości wody) próbkę wirowano (960 g, 4 min). Krew wirowano (2800 g, 10 min), a osocze przenoszono do nowej probówki. Zawartość substancji osmotycznie czynnych w moczu i osoczu oznaczano za pomocą osmometru (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Niemcy), mierząc obniżenie punktu zamarzania próbki względem punktu zamarzania wody. Stężenie sodu i potasu mierzono przy użyciu fotometru płomieniowego (model PFP7, Jenway, Essex, UK), po czym odczytywano z krzywej standardowej wykreślonej na podstawie pomiarów roztworów standardowych o znanym stężeniu. Pozostałą objętość próbek przechowywano w -80°C w celu późniejszego wykorzystania do oznaczeń biochemicznych.

3.6.2 Pomiar tempa przesączania kłębuszkowego (GFR)

Tempo przesączania kłębuszkowego (GFR) obliczano na podstawie klirensu inuliny. Ten naturalny wielocukier swobodnie przesącza się w nerkach, nie ulegając reabsorpcji, dlatego cały przesączony ładunek inuliny wydziela się do moczu; metoda mierzenia GFR oparta na klirensie inuliny jest nadal uważana za złoty standard w tej dziedzinie [113]. Na

potrzeby laboratorium zmodyfikowano metodę spektrofotometrycznego pomiaru inuliny we krwi opisaną przez Nolina *et al.* [114]. W trakcie doświadczenia ostrego szczury otrzymywały infuzję roztworu inuliny (zapewniający stałe stężenie tej substancji we krwi). Zebrane i odpowiednio rozcieńczone zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS) próbki osocza (1:3) i moczu (1:100) poddawano inkubacji (1h, 37°C) z roztworem enzymów (1000 U/ml katalazy i 100 U/ml oksydazy glukozowej, 100 µl) w celu usunięcia endogennej glukozy. Następnie dodawano 50 mM kwasu indolilo-3-octowego (150 µl) i 38% kwasu solnego (3 ml) oraz ponownie inkubowano (20 min, 60°C) w łaźni wodnej. Po schłodzeniu próbki nakładano na płytkę 96-dołkową, 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}) oraz diurezę (V) korzystano ze wzoru ogólnego na klirens nerkowy i w ten sposób obliczano GFR:

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

3.6.3 Wykonanie barwień i znakowań na skrawkach parafinowych

Nerki po pobraniu zostały utrwalane przez co najmniej tydzień w 4% roztworze PFA, następnie je odwadniano i zalewano parafiną. Z tkanki zamkniętej w bloczku wykonywano skrawki grubości 5 µm, które suszono w 56°C. Przed barwieniem ze skrawków usuwano parafinę, a następnie skrawki uwadniano. Na tak przygotowanych skrawkach wykonano odpowiednie barwienia (hematoksylina-eozyna; ETAP 1, 2, 3) i znakowanie przeciwciałami skierowanymi przeciwko akwaporynie 2 (ETAP 2). Przygotowanie i analiza preparatów do badań odbywało się we współpracy z prof. dr hab. n. med. Janiny Rafałowskiej i jej współpracownikami z Zakładu Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej.

3.6.4 Wykonanie testów ELISA w próbkach moczu i osocza

Zebrane próbki moczu i osocza wykorzystano do oznaczenia stężenia pochodnych rozpadu tlenku azotu (NO, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), dobowego wydalania albuminy (UAE, Immunology Consultants Laboratory Inc, Newberg, USA), kreatyniny (Sunred Biological Technology, Shanghai) oraz cystatyny C (Uscn Life Science Inc. Wuhan, Chiny). Oznaczenia zostały wykonane z użyciem testów enzymatycznych ELISA według instrukcji załączonych przez producentów.

3.7 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 czterotygodniowych 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.).

4. WYNIKI

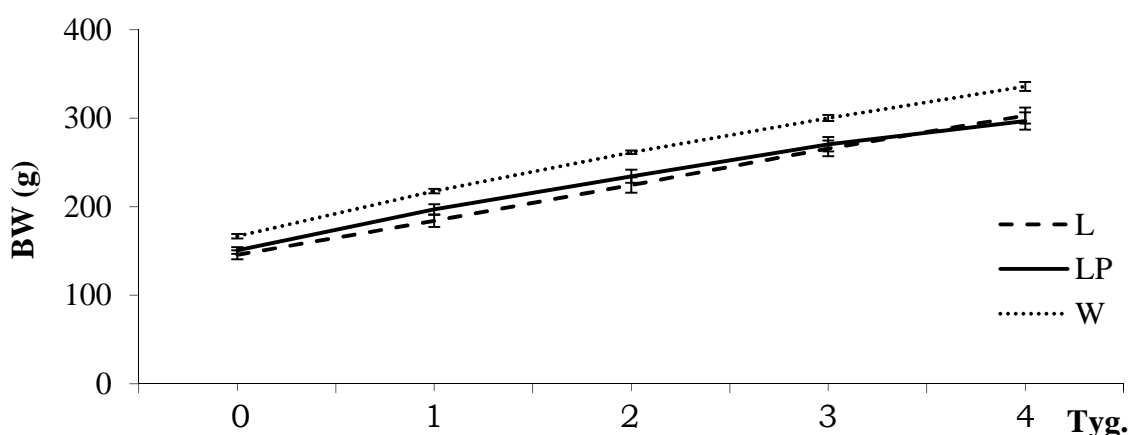
Wyniki z poszczególnych etapów badań zebrano w kolejnych podrozdziałach. Liczebność grup podano w części Materiały i Metody. Jeżeli dany parametr mierzono tylko w niektórych próbkach liczebność podano w legendach do rycin lub w tekście.

4.1 TOKSYCZNOŚĆ APren-7 (ETAP 1)

4.1.1 Doświadczenia chroniczne

W ciągu czterotygodniowego doświadczenia w żadnej z grup nie zaobserwowano odbiegających od normy oznak dotyczących zdrowia zwierząt, tj. wyglądu, stanu sierści, aktywności nocnej, zachowań pielęgnacyjnych czy socjalnych. Stosunkowo młode zwierzęta (5-6 tygodniowe) rozwijały się prawidłowo; nie zaobserwowano żadnego wpływu badanych substancji na ich dojrzewanie i wzrost oraz kondycję fizyczną.

Mimo różnic w wyjściowej masie ciała między grupami zwierząt przyrost masy w ciągu czterech tygodni był bardzo zbliżony we wszystkich grupach (**Ryc. 12**). Krzywe przyrostu masy ciała wyrażone jako procent początkowej masy pokrywały się; nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między grupami (procentowy przyrost masy ciała dla L: 109±4; LP: 97±4; W: 102±4%).



Ryc. 12. Masa ciała (BW) szczurów otrzymujących codziennie przez cztery tygodnie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – klasyczne liposomy; LP – liposomy z APren-7; W – woda do iniekcji;

Parametry metaboliczne i parametry osocza

Wyniki uzyskane na podstawie cotygodniowych obserwacji zwierząt w klatkach metabolicznych zamieszczono w **Tabeli 2**. Większość

otrzymanych wyników w obrębie poszczególnych parametrów pozostawała na zbliżonym poziomie niezależnie od rodzaju podawanej substancji (brak różnic między grupami). Statystycznie istotne różnice odnotowano jedynie przy porównaniu zmian ich poziomu w czasie (na przestrzeni czterech tygodni). W ciągu czterech tygodni spożycie wody wzrosło najbardziej w grupie otrzymującej rozpuszczalnik (W), jednocześnie, co ciekawe, przyrost tempa wydalania moczu był w tej grupie najniższy. Można przypuszczać, że znamienne większy przyrost spożycia wody w tej grupie był związany z nieznacznie większą wyjściową masą ciała zwierząt otrzymujących roztwór kontrolny (W). Należy podkreślić, że przyrost wartości większości parametrów w czasie czterech tygodni był konsekwencją wzrostu i dojrzewania badanych zwierząt.

Raz w tygodniu podczas obserwacji zwierząt w klatkach metabolicznych pobierany był również mocz do oznaczeń parametrów wydalniczych. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych oraz sodu i potasu zostało zebrane w **Tabeli 3**. Nie zaobserwowano statystycznie znamienych różnic między grupami w ciągu całego doświadczenia. Również przyrosty wartości dla poszczególnych parametrów, związane z fizjologicznym rozwojem i wzrostem zwierząt były zbliżone we wszystkich grupach. W trakcie doświadczenia chronicznego nie zaobserwowano także żadnych znamienych różnic w mierzonych parametrach osocza (**Tabela 4**).

Tabela 2. Bilans płynów, spożycie paszy i wydalanie kału w ciągu czterotygodniowej obserwacji szczurów otrzymujących badane związki

		Tygodnie					Δ 4-0
		0	1	2	3	4	
Spożycie wody (ml/24 h)	L	21±1	23±2	23±1	25±1	27±2	6±2
	LP	24±1	25±1	27±1	26±2	29±2	4±2
	W	23±1	27±1	29±1	30±1	37±3	13±3*
Diureza (ml/24 h)	L	5,1±0,4	7,9±0,8	7,3±0,7	9,0±0,6	10,9±0,6	5,8±0,5
	LP	6,1±0,7	8,1±0,4	9,0±0,6	9,1±1,0	12,1±0,9	6,0±1,1
	W	7,0±0,5	9,0±0,6	8,4±0,6	10,0±0,6	11,0±0,5	3,9±0,6 [#]
Spożycie paszy (g/24 h)	L	14,2±0,8	16,3±1,0	17,2±0,8	18,5±0,5	19,1±0,9	6,2±1,1
	LP	16,0±0,7	16,9±1,0	17,9±1,7	16,2±0,7	19,9±1,0	3,9±1,2
	W	17,2±0,5	18,8±0,7	20,2±1,3	22,3±0,7	21,4±0,9	4,3±1,0
Wydalanie kału (g/24 h)	L	5,1±0,4	7,2±0,8	6,7±0,8	7,8±0,7	7,2±0,7	2,1±0,8
	LP	5,6±0,5	7,4±0,7	7,1±0,6	7,4±0,6	9,2±0,6	3,6±0,8
	W	6,8±0,5	8,5±0,5	8,4±0,7	9,0±0,6	10,7±0,6	3,9±0,8

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: L – klasyczne liposomy; LP – liposomy z APren-7; W – wodę do iniekcji; Δ – przyrost poziomów parametrów w czasie (różnica między końcem doświadczenia – tydzień „4”, a początkiem – dzień „0”); * znamienne różne od grupy LP ($p < 0,05$); # znamienne różne od grupy L ($p < 0,05$);

Tabela 3. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm}\cdot V$) oraz sodu ($U_{Na}\cdot V$) i potasu ($U_K\cdot V$) w ciągu czterotygodniowej obserwacji szczurów otrzymujących badane związki

		Tygodnie					Δ 4-0
		0	1	2	3	4	
$U_{osm}\cdot V$ (mOsm/24h)	L	12,5±0,6	17,0±0,9	16,7±0,8	20,0±0,7	22,0±0,8	9,5±1,1
	LP	12,8±1,0	17,1±0,5	17,5±0,6	18,1±0,7	21,8±0,7	9,0±1,5
	W	16,1±0,5	20,1±0,4	20,5±1,0	22,7±0,9	24,3±0,5	8,2±0,9
$U_{Na}\cdot V$ (mmol/24h)	L	0,7±0,0	1,1±0,1	1,0±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1	0,7±0,1
	LP	0,5±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	1,2±0,1	0,7±0,1
	W	0,9±0,0	1,3±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	1,6±0,1	0,7±0,1
$U_K\cdot V$ (mmol/24h)	L	3,1±0,2	4,0±0,2	3,5±0,2	4,3±0,1	4,6±0,2	1,5±0,2
	LP	3,2±0,3	3,8±0,1	3,6±0,1	3,8±0,2	4,2±0,1	1,0±0,3
	W	4,0±0,1	4,8±0,1	4,7±0,2	4,7±0,2	4,9±0,2	1,0±0,2

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: L – klasyczne liposomy; LP – liposomy z APren-7; W – wodę do iniekcji; Δ – przyrost poziomów parametrów w czasie (różnica między końcem doświadczenia – tydzień „4”, a początkiem – dzień „0”);

Tabela 4. Stężenie substancji osmotycznie czynnych (P_{osm}) oraz sodu (P_{Na}) w osoczu i hematokryt (Ht) w ciągu czterotygodniowej obserwacji szczurów otrzymujących badane związki

		Tygodnie				
		0	1	2	3	4
P_{osm} (mOsm/l)	L	302±3	299±2	300±2	306±1	306±1
	LP	304±2	301±2	306±2	310±2	310±2
	W	300±1	302±2	307±1	309±2	307±3
P_{Na} (mmol/l)	L	136±2	139±2	133±2	132±2	133±1
	LP	130±1	136±1	132±2	137±3	129±2
	W	132±3	134±2	135±2	131±2	135±2
Ht (%)	L	40±1	41±1	43±0	44±1	43±1
	LP	40±0	41±1	42±1	44±1	42±1
	W	40±1	41±1	44±1	44±1	44±1

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: L – klasyczne liposomy; LP – liposomy z APren-7; W – wodę do iniekcji

Dobowe wydalanie albuminy i metabolitów tlenu azotu

W próbkach pobranych od zwierząt w dniu „0” i po czterech tygodniach badań, oznaczono dobowe wydalanie albuminy (ang. Urinary Albumin Excretion, UAE, **Tabela 5**). Największy przyrost UAE odnotowano w grupie otrzymującej wodę do iniekcji (W); wyniki otrzymane po czterech tygodniach w tej grupie były istotnie wyższe w porównaniu z wartościami wyjściowymi (* znamienne różne w tygodniu 4

vs dzień „0” dla grupy W, $p < 0,05$). Wartość UAE w czwartym tygodniu doświadczenia dla tej grupy była również istotnie wyższa w porównaniu do grupy otrzymującej liposomy z APren-7 (# $p < 0,05$ W vs LP), a przyrost UAE w ciągu czterech tygodni (Δ) był istotnie wyższy w stosunku do obu grup otrzymujących liposomy (§ $p < 0,05$ dla grupy W vs L i LP).

Ze względu na większą masę ciała szczurów otrzymujących roztwór kontrolny (W), przeliczono UAE także na kilogram masy ciała. Wyniki przedstawiono na **Ryc. 13**. W przypadku tak przedstawionego wskaźnika UAE nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami, ani znamiennych różnic w przyroście wartości tego parametru w czasie.

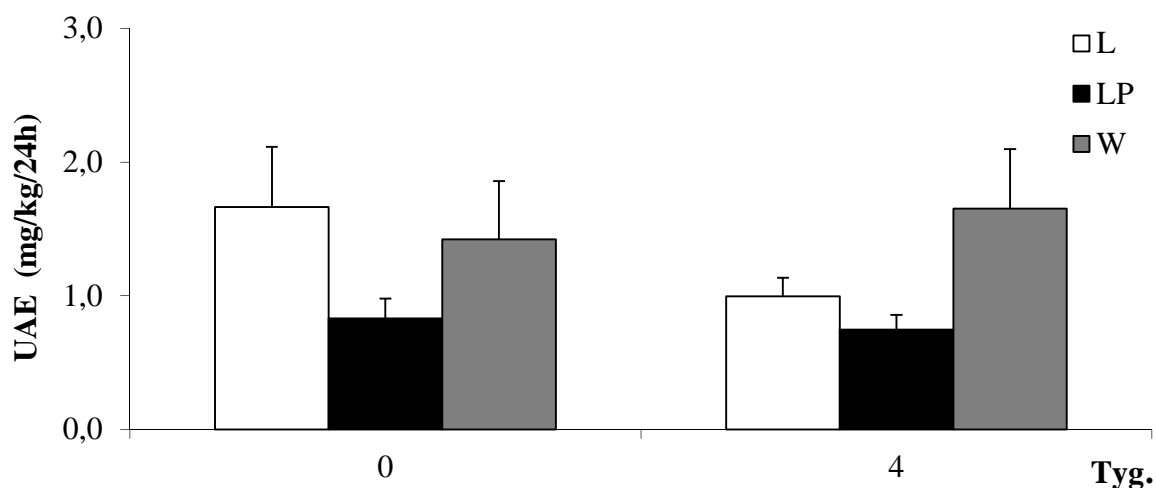
Podobnie jak w przypadku UAE oznaczano dobowe wydalanie metabolitów tlenu azotu ($U_{NO_x} \cdot V$, **Ryc. 14**). Nie odnotowano żadnych znamiennych różnic zarówno między grupami, jak i w przyroście wydalania NOx podczas czterech tygodni obserwacji, w poszczególnych grupach.

Podjęto także próby oznaczenia stężenia cystatyny C w zebranych próbkach moczu i osocza, metodą spektrofotometryczną z użyciem komercyjnie dostępnego kitu ELISA. Niestety otrzymane wyniki nie miały wartości merytorycznej i nie nadawały się do interpretacji.

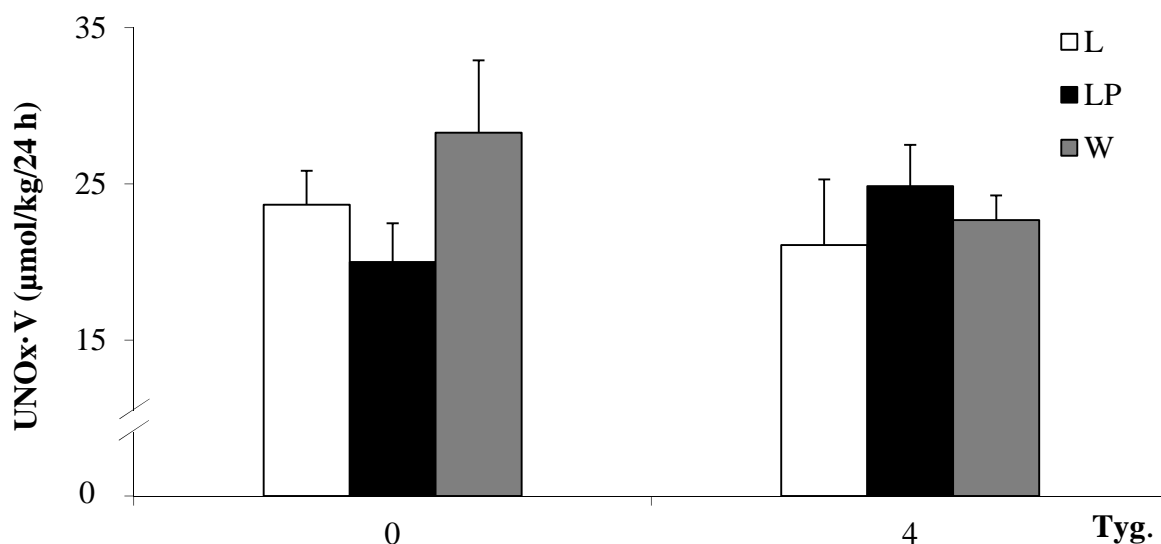
Tabela 5. Dobowe wydalanie albuminy (UAE, mg/24 h) w dniu „0” i po czterech tygodniach obserwacji

		Tygodnie		Δ 4-0
		0	4	
UAE (mg/24 h)	L	0,24±0,07	0,31± 0,04	0,06±0,07
	LP	0,13±0,02	0,22± 0,03	0,09±0,03
	W	0,23±0,07	0,55± 0,14 * #	0,32±0,10 §

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: L – klasyczne liposomy; LP – liposomy z APren-7; W – wodę do iniekcji; Δ – przyrost poziomu parametru w czasie (różnica między końcem doświadczenia – tydzień „4”, a początkiem – dzień „0”); * znamienne różne w stosunku do dnia „0” ($p < 0,05$); # znamienne różne od grupy LP w 4 tygodniu obserwacji ($p < 0,05$); § znamienne różne od grup L i LP ($p < 0,05$);



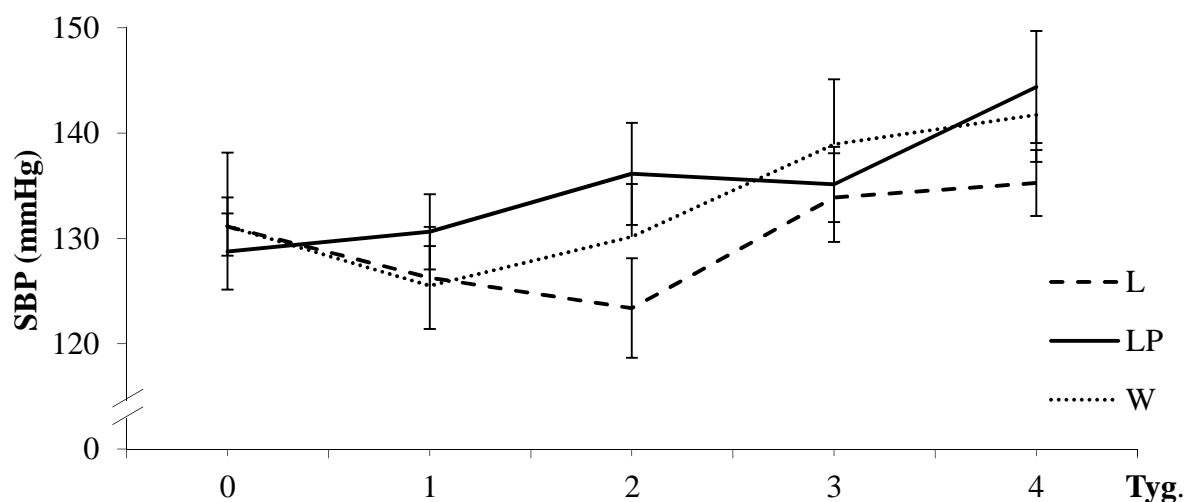
Ryc. 13. Dobowe wydalanie albuminy (UAE) w przeliczeniu na kilogram masy ciała przed i po czterotygodniowej obserwacji u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – liposomy (n=7), LP – liposomy z APren-7 (n=7), W – woda do iniekcji (n=6)



Ryc. 14. Dobowe wydalanie metabolitów tlenku azotu ($U_{NOx}\cdot V$) przed i po czterotygodniowej obserwacji u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – liposomy (n=7), LP – liposomy z APren-7 (n=6), W – woda do iniekcji (n=6);

Skurczowe ciśnienie krwi tętniczej

Podczas doświadczeń chronicznych raz w tygodniu mierzono skurczowe ciśnienie krwi (SBP) na ogonie u szczurów czuwających (**Ryc. 15**). We wszystkich grupach SBP wzrosło w ciągu czterech tygodni obserwacji; największy wzrost odnotowano w grupie otrzymującej liposomy z APren-7 (LP), ale nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic między grupami, jak również różnic w przyroście wartości dla tego parametru w czasie.



Ryc. 15. Zmiany skurczowego ciśnienia krwi tętniczej (SBP) w ciągu czterotygodniowej obserwacji u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – klasyczne liposomy (n=8); LP – liposomy z APren-7 (n=8); W – woda do iniekcji (n=8);

4.1.2 Doświadczenia ostre

Po zakończeniu doświadczeń chronicznych u części zwierząt przeprowadzano doświadczenia ostre, w których mierzono parametry charakteryzujące układ krążenia, wydalanie nerkowe oraz hemodynamikę nerek.

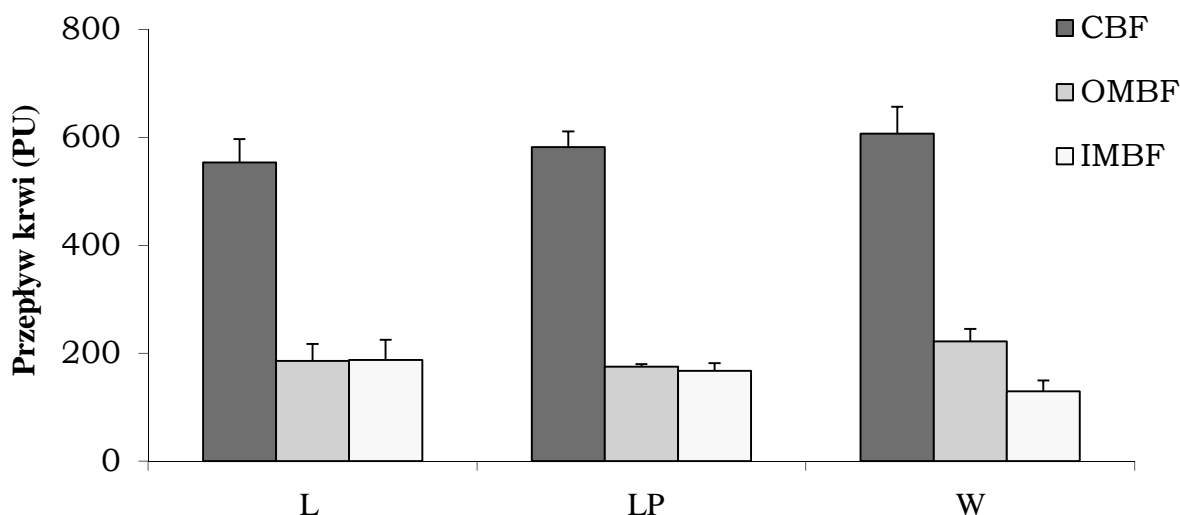
Średnie ciśnienie krwi tętniczej, przepływ całkowity krwi przez nerkę oraz parametry wydalnicze (diureza, wydalanie substancji osmotycznie czynnych oraz sodu i potasu) we wszystkich grupach kształtowały się na podobnym poziomie (**Tabela 6**).

Tabela 6. Średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP), całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) oraz parametry wydalnicze: diureza (V), wydalanie substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm} \cdot V$) oraz sodu ($U_{Na} \cdot V$) i potasu ($U_K \cdot V$) mierzone w doświadczeniach ostrych u uśpionych szczurów po czterotygodniowym traktowaniu badanymi związkami

	L	LP	W
MBP, (mmHg)	122±1	117±3	128±5
RBF, (ml/min)	8,1±0,5	9,5±1,0	9,8±0,9
V, (μl/min)	7,1±1,6	8,4±1,9	10,8±2,1
$U_{osm} \cdot V$ (μOsm/min)	6,1±1,0	6,0 ±0,9	8,3±1,2
$U_{Na} \cdot V$ (μmol/min)	0,4±0,1	0,6±0,2	0,6±0,1
$U_K \cdot V$ (μmol/min)	0,9±0,2	1,1±0,2	1,3±0,2

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: L – klasyczne liposomy (n=6); LP – liposomy z APren-7 (n=6); W – wodę do iniekcji (n=8);

Mierzono również przepływy krwi przez poszczególne strefy nerki. Charakterystyczny, prawidłowy obraz relatywnie coraz niższego ukrwienia poszczególnych obszarów nerki w kierunku od kory do rdzenia wewnętrznego (CBF > OMBF > IMBF) zaobserwowano w grupie otrzymującej rozpuszczalnik (W). W obu grupach otrzymujących liposomy (L i LP) zaobserwowano zjawisko zrównania się przepływów rdzeniowych (**Ryc. 16**); stosunek OMBF/IMBF w obu tych grupach był istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej (L: $1,0 \pm 0,1$; LP: $1,1 \pm 0,1$ vs W: $1,9 \pm 0,3^*$ przy $p < 0,05$).



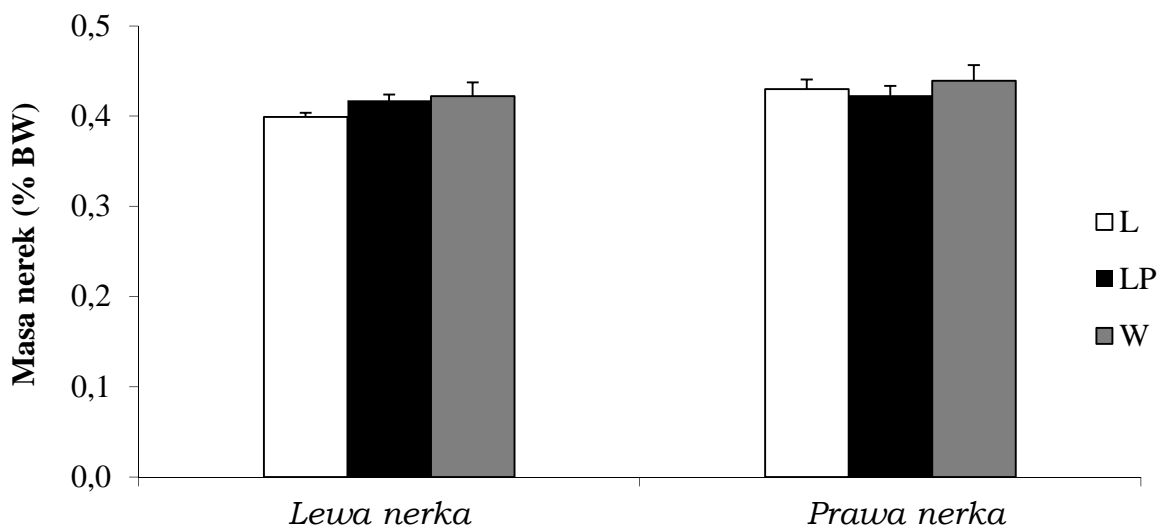
Ryc. 16. Przepływ krwi przez strefy nerki u szczurów w uśpieniu, otrzymujących codziennie przez cztery tygodnie w doświadczeniu chronicznym, podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – klasyczne liposomy (n=6); LP – liposomy z APren-7 (n=6); W – woda do iniekcji (n=8); CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki;

4.1.3 Analiza histologiczna, parametry morfologiczne i morfometryczne

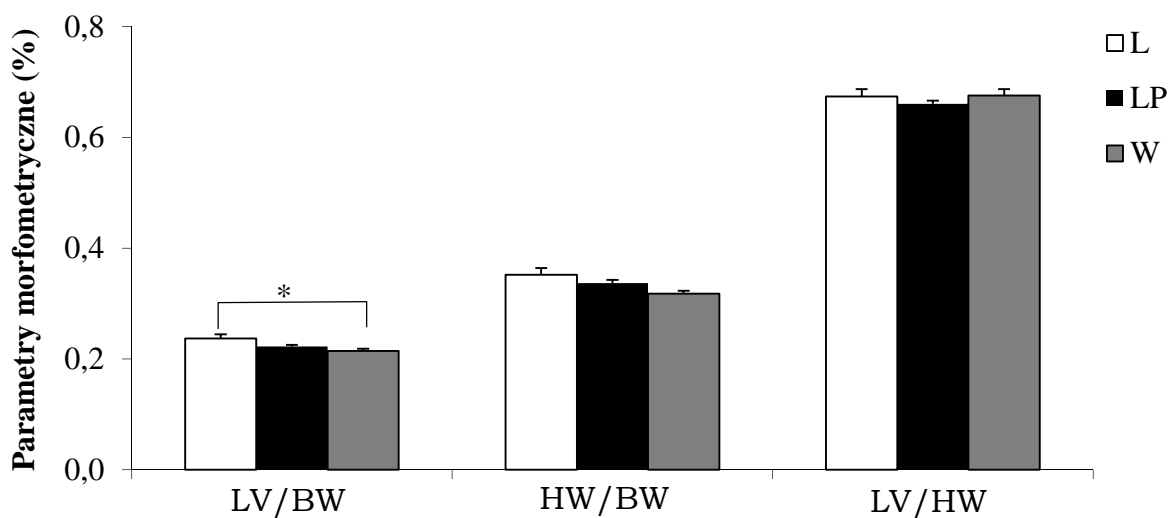
Od części zwierząt po doświadczeniach chronicznych pobierano narządy (nie przeprowadzono doświadczenia ostrego) w celu wykonania analizy morfometrycznej i morfologicznej.

Masa obu nerek wyrażona jako procent masy ciała była niemal identyczna we wszystkich grupach (**Ryc. 17**). Stosunek masy lewej komory serca do masy ciała w grupie L był istotnie większy niż w grupie W, co może wskazywać na pewne zmiany (np. przerost lewej komory serca) u zwierząt otrzymujących „klasyczne” liposomy (**Ryc. 18**). Nie można jednak wykluczyć, że powyższa różnica może być następstwem mniejszej całkowitej masy ciała zwierząt w grupie L w porównaniu do grupy W (**Tabela 7**).

Ocenę morfologii nerek przeprowadzono na podstawie zebranego materiału wybarwionego hematoksyliną i eozyną (**Ryc. 19**). Nie zaobserwowano żadnych negatywnych zmian ani znamienych różnic między grupami w obrazie mikroskopowym pobranych nerek.



Ryc. 17. Masa nerek (wyrażona jako procent masy ciała) pobranych od szczurów otrzymujących przez cztery tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – klasyczne liposomy (n=6); LP – liposomy z APren-7 (n=6); W – woda do iniekcji (n=8);

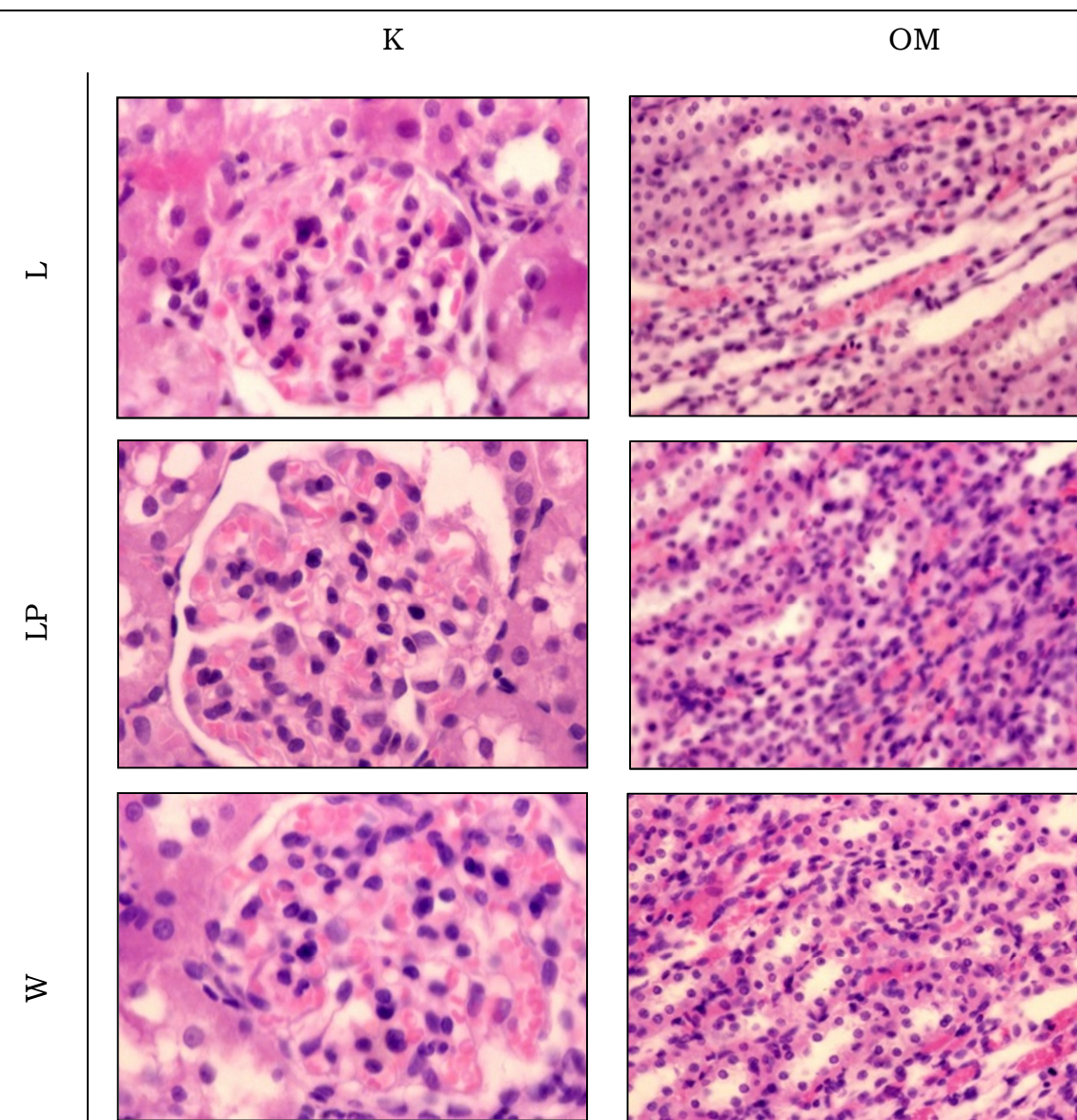


Ryc. 18. Parametry morfometryczne narządów pobranych od szczurów otrzymujących przez cztery tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – klasyczne liposomy (n=13); LP – liposomy z APren-7 (n=13); W – woda do iniekcji (n=16); LV/BW – stosunek masy lewej komory serca do masy ciała; HW/BW – stosunek masy serca do masy ciała; LV/HW – stosunek masy lewej komory serca do masy serca; * znamienne różnie od grupy W ($p < 0,05$);

Tabela 7. Masa ciała (BW), masa serca (HW) i masa lewej komory serca (LV) szczurów po czterotygodniowych doświadczeniach chronicznych, w których szczury otrzymywały badane związki

	L	LP	W
BW (g)	294±8	293±10	326±5*
HW (g)	1,03±0,03	0,99±0,03	1,03±0,01
LV (g)	0,69±0,03	0,65±0,02	0,70±0,01

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: L – klasyczne liposomy (n=13); LP – liposomy z APren-7 (n=13); W – wodę do iniekcji (n=16); * znamienne różne w stosunku do grup L i LP (p<0,05);



Ryc. 19. Preparaty parafinowe nerek barwione hematoksyliną i eozyną, pobranych od szczurów otrzymujących codziennie przez cztery tygodnie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: L – liposomy, LP – liposomy z APren-7, W – woda do iniekcji; K – kora nerki (powiększenie 200x); OM – rdzeń zewnętrzny (powiększenie 100x);

4.2 EFEKTYWNOŚĆ DESMOPRESYNY ZAMKNIĘTEJ W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 2)

4.2.1 Doświadczenia ostre (ETAP 2.1)

Przebieg diurezy wodnej, wydalanie substancji osmotycznie czynnych oraz osmolalność osocza

Wydalanie moczu (diurezy, V) podczas całego doświadczenia ostrego zostało przedstawione na **Ryc. 20**. Przebieg zmian V był zróżnicowany zarówno w obu grupach otrzymujących antydiuretyczny lek (dD+LP i dD+W), jak i w grupach kontrolnych LP oraz W.

W obu grupach kontrolnych zaobserwowano istotny wzrost diurezy na skutek intensywnej infuzji roztworu glukozy; w grupie otrzymującej sam rozpuszczalnik (W) wzrost wydalania moczu był widoczny już po 30 min od rozpoczęcia podawania roztworu glukozy (istotnie wyższy poziom w stosunku do początkowej wartości zaobserwowano po 60 min; dla przejrzystości rycin istotności w stosunku do początkowej wartości nie zaznaczono na wykresie). W grupie otrzymującej puste liposomy z APren-7 (LP) zaobserwowano wolniejszy wzrost diurezy (po 60 min podawania glukozy diureza zauważalnie wzrosła, a istotnie wyższą wartość V w stosunku do początku doświadczenia zaobserwowano po 90 min doświadczenia; istotności nie zaznaczono na wykresie). Ze względu na opóźniony efekt wzrostu diurezy w grupie LP, wartości V były istotnie niższe jeszcze po 60 oraz 90 min od rozpoczęcia infuzji glukozy w stosunku do grupy W (istotności nie zaznaczone na wykresie). Po 120 min od rozpoczęcia podawania roztworu glukozy w grupie W diureza zaczęła ponownie się obniżać, co było spontanicznie występującą reakcją fizjologiczną.

W obu grupach otrzymujących desmopresynę (dD+LP oraz dD+W) zaobserwowano wcześniejsze zahamowanie wydalania moczu na skutek działania leku w porównaniu do grup kontrolnych (* znamienne różne dla grup dD+LP i dD+W w stosunku do grupy W po 30 i 60 min od podania leku; # wartości diurezy znamienne różne dla grup dD+LP i dD+W w stosunku do grupy LP po 90 oraz 120 min od podania leku; **Ryc. 20**).

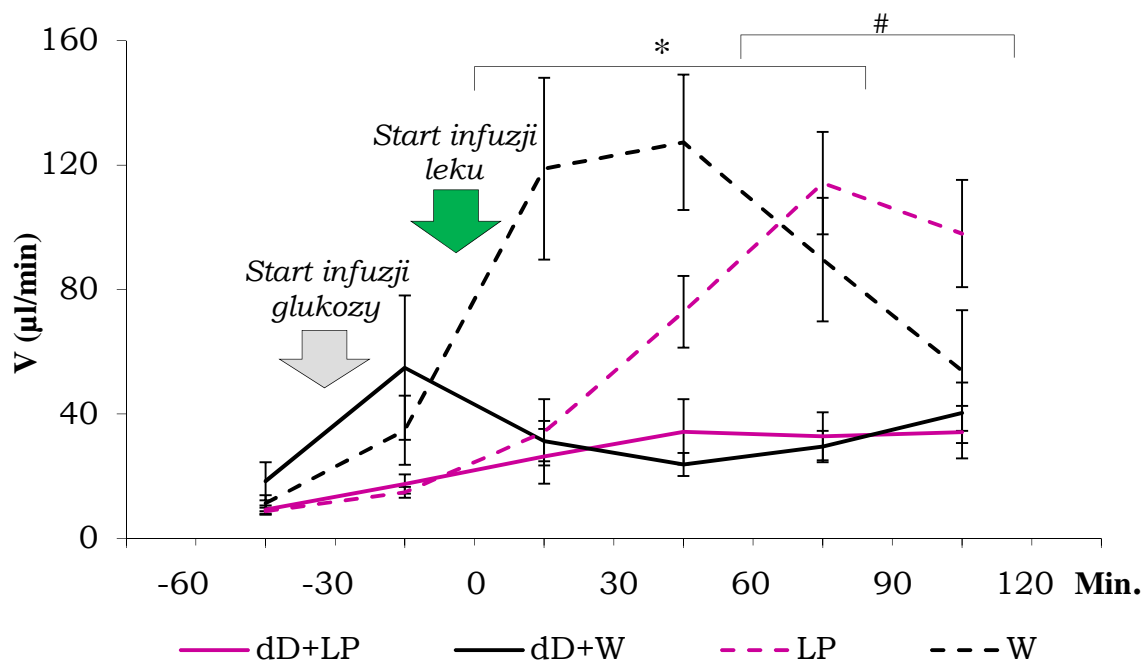
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między obiema grupami otrzymującymi lek (dD+LP oraz dD+W), jednakże profil zahamowania diurezy był widocznie różny w obu tych grupach. Zahamowanie diurezy po podaniu desmopresyny zamkniętej w liposomach z APren-7 (dD+LP) było widoczne po godzinie od rozpoczęcia infuzji, to jest później niż dla grupy otrzymującej lek w klasycznym rozpuszczalniku (dD+W), dla której zahamowanie wydalania moczu obserwowano już po 30 min (**Ryc. 20**). Wydaje się jednak, że efekt antydiuretyczny dDAVP po podaniu w testowanym nośniku utrzymywał

się dłużej niż w przypadku desmopresyny podanej w wodzie (dD+W), dla której po godzinie obserwowano ponowny wzrost diurezy. Wydalanie moczu pod koniec doświadczenia (po 2 h od podania leku) było na niemal identycznym poziomie w obu grupach otrzymujących desmopresynę (dD+LP i dD+W).

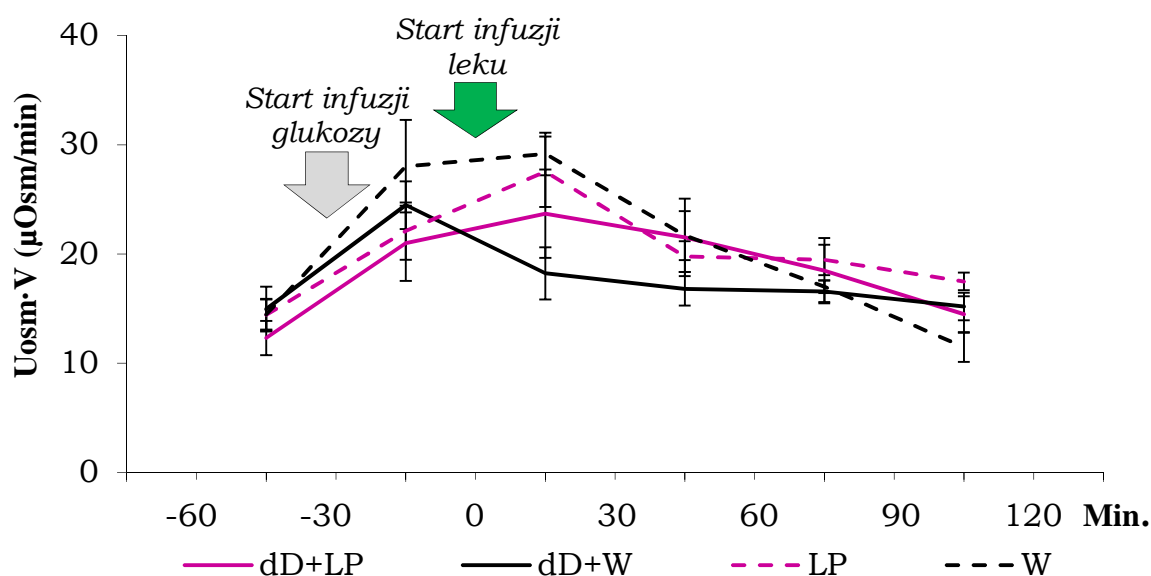
Szybsze, ale krótsze działanie antydiuretyczne desmopresyny podanej w klasycznym rozpuszczalniku (dD+W), także uwidoczniło się w przebiegu zmian wydalania substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm} \cdot V$; **Ryc. 21**). Po 30 min podawania roztworu glukozy $U_{osm} \cdot V$ wzrosło we wszystkich grupach, ale tylko w grupie dD+W już po 30 min od podania leku ponownie obniżyło się do poziomu wyjściowego. W grupie otrzymującej desmopresynę w nowych nośnikach (dD+LP) wydalanie substancji osmotycznie czynnych zaczęło obniżać się po 60 min od podania leku, osiągając na koniec doświadczenia (po 120 min od podania leku) ten sam poziom, co w grupie dD+W (nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami).

Obniżenie stężenia substancji osmotycznie czynnych w osoczu (osmolalność osocza, P_{osm} ; **Ryc. 22**) na skutek dużego ładunku płynu (infuzja 2,5% glukozy w celu wywołania diurezy wodnej) początkowo kształtowało się na podobnym poziomie we wszystkich grupach. Na skutek nieznacznie opóźnionego efektu wywołania diurezy wodnej w grupie LP, w stosunku do grupy W, po 60 min podawania roztworu glukozy zaobserwowano rozcieńczenie osocza podobne jak w grupach otrzymujących lek antydiuretyczny (dD+LP oraz dD+W). Po 90 min od podania roztworu glukozy diureza w grupie LP zaczęła wzrastać, co spowodowało zahamowanie dalszego rozcieńczania osocza. Końcowe obniżenie P_{osm} kształtowało się w obu grupach kontrolnych (LP oraz W) na podobnym poziomie (nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami kontrolnymi).

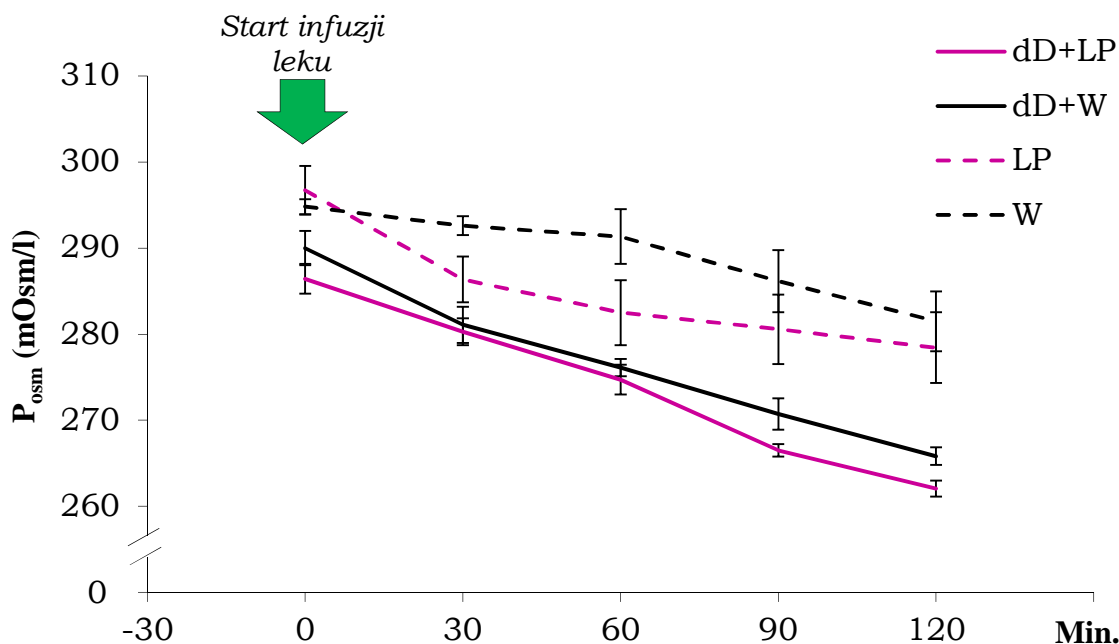
Obniżenie osmolalności osocza, związane z zatrzymywaniem wody na skutek podania desmopresyny, początkowo kształtowało się podobnie w grupach ją otrzymujących (dD+LP i dD+W; **Ryc. 22**). Mimo braku istotnych statystycznie różnic między grupami otrzymującymi desmopresynę, można było zauważyć, że po 90 min od podania leku, w grupie dD+LP nastąpiło wyraźniejsze obniżenie osmolalności osocza w porównaniu do grupy dD+W. Na koniec doświadczenia wartości P_{osm} w obu grupach otrzymujących lek były istotnie różne w stosunku do grup kontrolnych (* dD+LP i dD+W *vs* LP i W; **Ryc. 23**).



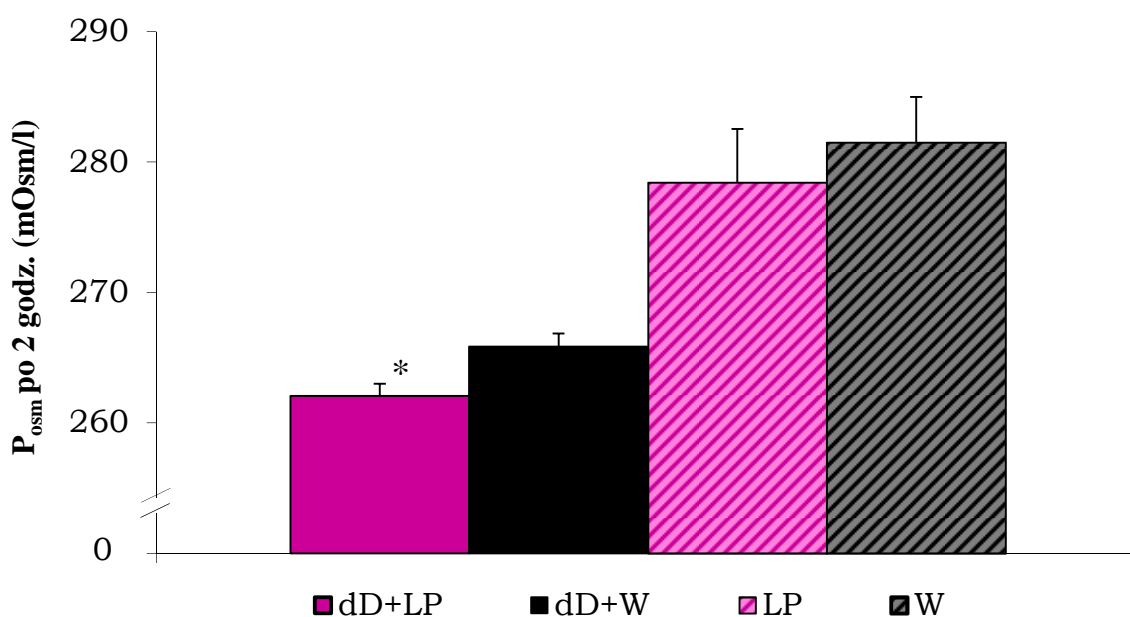
Ryc. 20. Przebieg diurezy wodnej (V) u szczurów w narkozie otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda; * znamienne różne dla grup dD+LP i dD+W w stosunku do grupy W w okresach do 30, 60 i 90 min od podania leku ($p < 0,05$); # znamienne różne dla grup dD+LP i dD+W w stosunku do grupy LP w okresach do 90 oraz 120 min od podania leku ($p < 0,05$);



Ryc. 21. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm} \cdot V$) u szczurów w narkozie otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda;



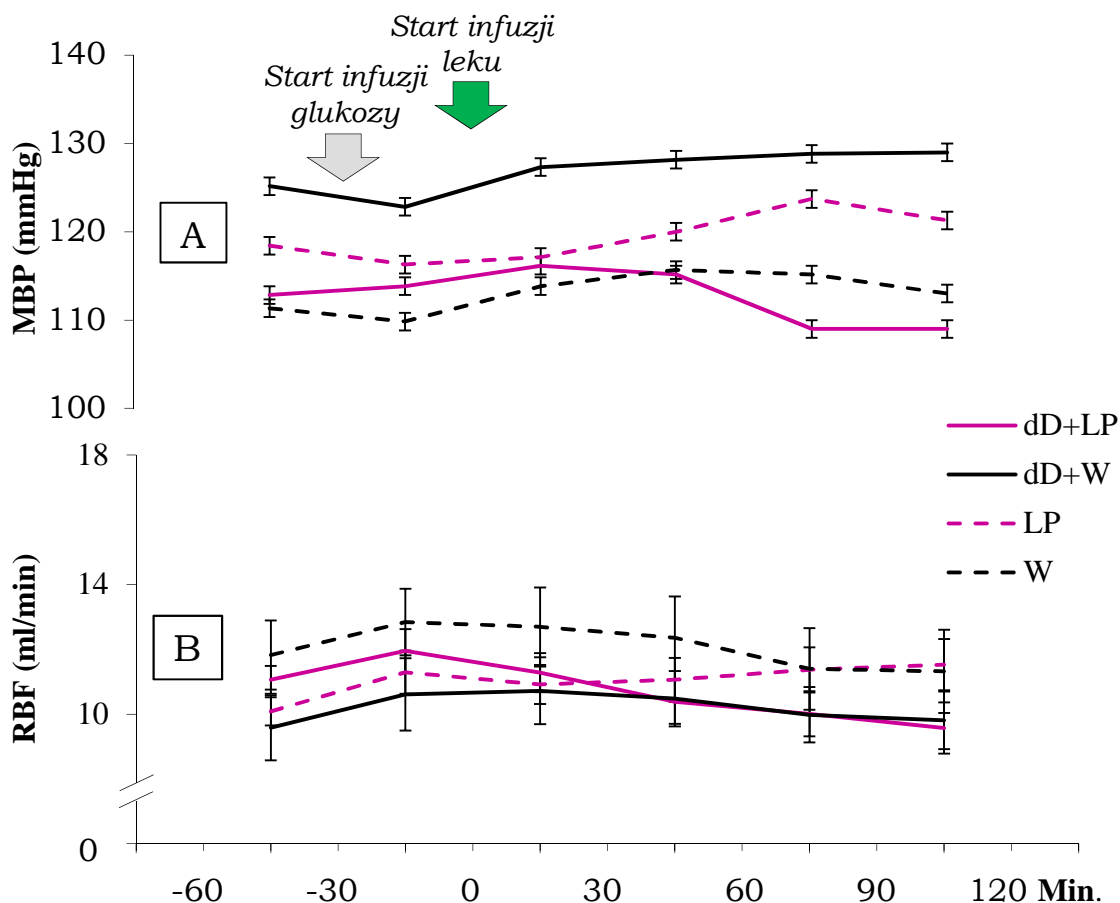
Ryc. 22. Stężenie substancji osmotycznie czynnych w osoczu (P_{osm}) szczurów w narkozie otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda;



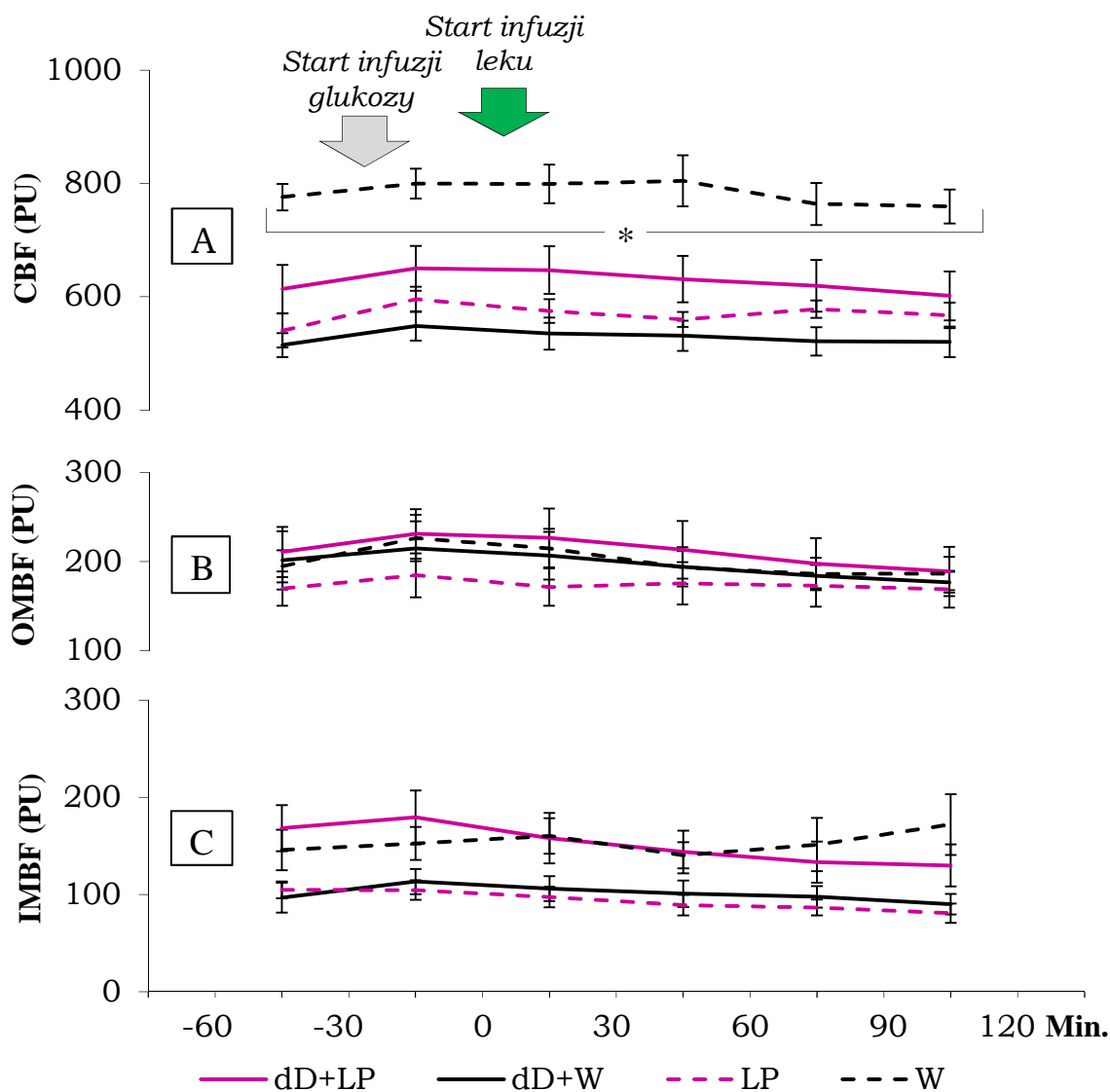
Ryc. 23. Osmolalność osocza po 2 h doświadczenia u szczurów w narkozie otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda; * znamienne różnie w stosunku do obu grup kontrolnych LP oraz W ($p < 0,05$);

Hemodynamika nerek

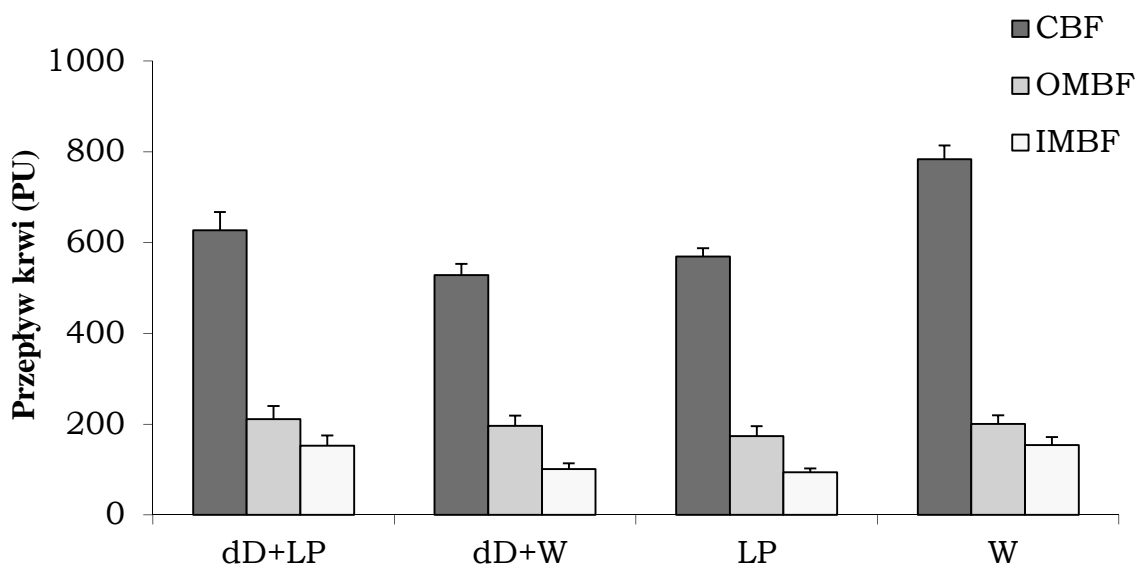
W trakcie doświadczenia ostrego mierzono średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP), całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) oraz przepływy przez poszczególne strefy nerki (CBF, OMBF, IMBF), których przebiegi przedstawiono na **Ryc. 24** oraz **Ryc. 25**. Nie zaobserwowano znaczących różnic między grupami, wszystkie wartości utrzymywały się na podobnym poziomie przez całe doświadczenie. W grupie otrzymującej sam rozpuszczalnik (W), przepływ przez korę nerki (CBF) od początku doświadczenia kształtował się na wyższym poziomie w stosunku do pozostałych grup (* W vs dD+LP, dD+W oraz LP; $p < 0,05$; **Ryc. 25A**). Uśrednione wartości z całego doświadczenia dla poszczególnych przepływów przez strefy nerki przedstawiono na **Ryc. 26**. We wszystkich grupach zaobserwowano prawidłowy obraz coraz niższego ukrwienia poszczególnych obszarów nerki w kierunku od kory do rdzenia wewnętrznego. Stosunek przepływu krwi przez rdzeń zewnętrzny do przepływu przez rdzeń wewnętrzny nerki (OMBF/IMBF) także był na podobnym poziomie we wszystkich grupach (dD+LP: $1,6 \pm 0,3$; dD+W: $2,0 \pm 0,3$; LP: $1,9 \pm 0,3$; W: $1,4 \pm 0,2$, NS). Wartość filtracji kłębuszkowej (GFR, **Ryc. 27**) utrzymywała się na podobnym poziomie przez całe doświadczenie we wszystkich grupach; nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami.



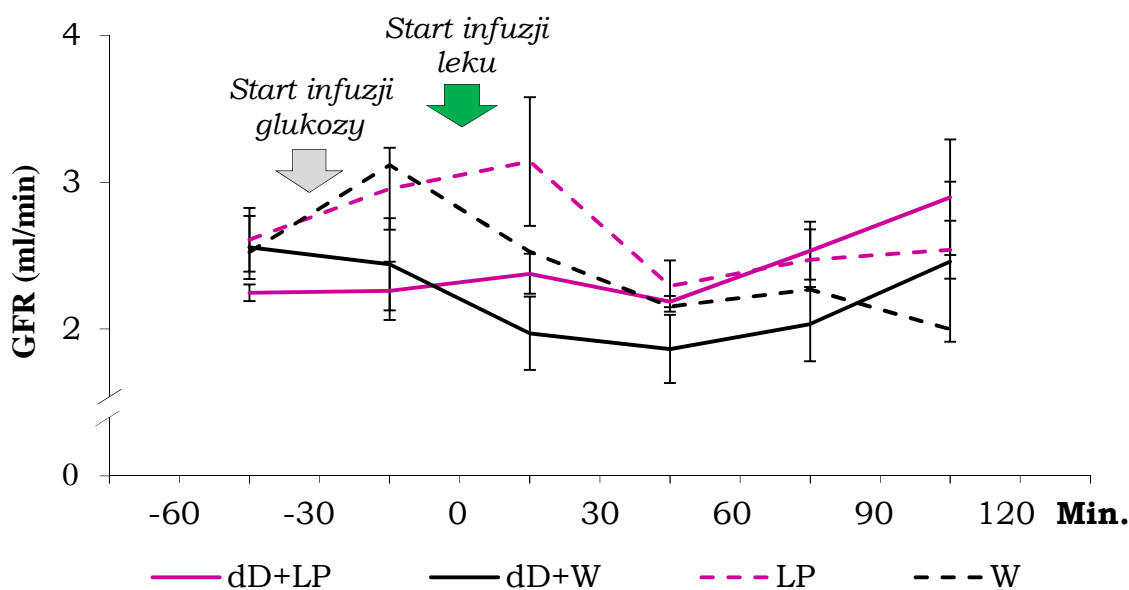
Ryc. 24. A: Średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP); **B:** Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) u uśpionych szczurów otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda;



Ryc. 25. A: Przepływ krwi przez korę nerki (CBF); **B:** Przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki (OMBF); **C:** Przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki (IMBF) u szczurów w uśpieniu otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda; * znamienne różnice dla grupy W w stosunku do dD+LP, dD+W oraz LP, przez całe doświadczenie ($p < 0,05$)



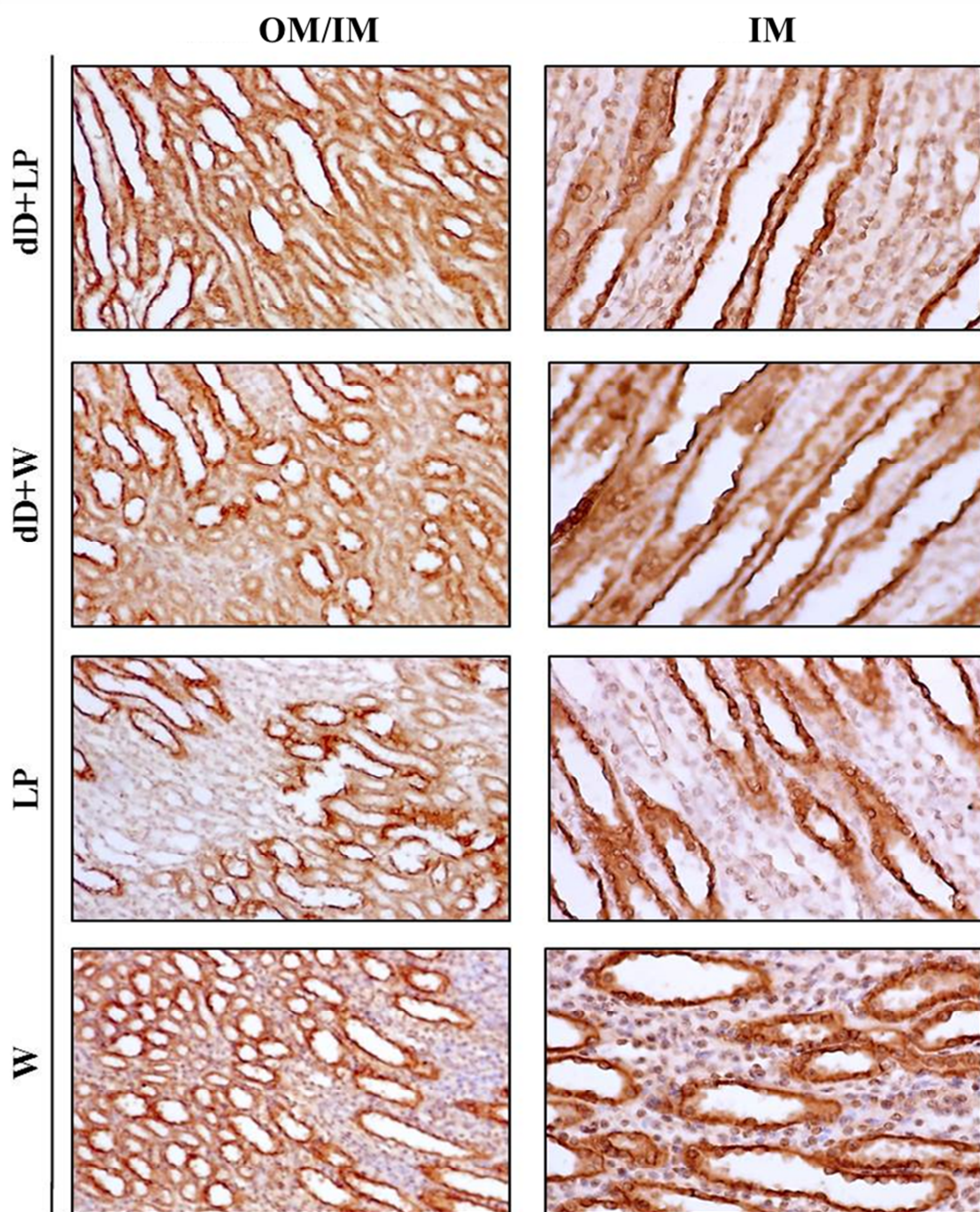
Ryc. 26. Uśredniony z całego doświadczenia przepływ krwi przez strefy nerki u szczurów w uśpieniu otrzymujących następujące roztwory: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda; CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki;



Ryc. 27. Wartość filtracji kłębuszkowej (GFR) u uśpienych szczurów otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda;

Lokalizacja akwaporyny 2 (AQP2)

Po zakończeniu doświadczeń ostrych od szczurów pobierana była prawa nerka w celu oznaczenia lokalizacji akwaporyny 2 (kanał białkowy dla wody, podtyp 2, **Ryc. 28**). Wyznakowanie przeciwko AQP2 oceniano w poszczególnych strefach nerki: korze, rdzeniu zewnętrznym i wewnętrznym, które charakteryzują się odmienną strukturą i zawartością AQP2. Stopień wyznakowania przeciwko AQP2 prezentował się podobnie we wszystkich badanych grupach. Różnice były widoczne w zależności od obserwowanej strefy nerki. Stopień wyznakowania rósł w głąb nerki od kory, w której wyróżnić można było tylko nieliczne wyznakowane kanały, przez rdzeń zewnętrzny, który charakteryzował się znacznie większym stopniem wyznakowania niż kora, ale mniejszym niż rdzeń wewnętrzny. W rdzeniu wewnętrznym zaobserwowano zdecydowanie najwyższy stopień wyznakowania przeciwko AQP2.



Ryc. 28. Znakowanie przeciwno akwaporynie 2 (AQP2) skrawków parafinowych nerek, pobranych na koniec doświadczenia ostrego, od szczurów w narkozie, otrzymujących dożylną infuzję jednego z następujących roztworów: dD+LP – desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7; dD+W – desmopresyna rozpuszczona w wodzie; LP – puste liposomy z APren-7; W – woda; OM/IM – granica rdzenia zewnętrznego i wewnętrznego (powiększenie 100x); IM – rdzeń wewnętrzny (powiększenie 200x);

4.2.2 Farmakokinetyka desmopresyny (ETAP 2.2)

Przeprowadzono serię doświadczeń z użyciem czuwających szczurów Sprague-Dawley w celu określenia farmakokinetyki dDAVP zamkniętej w liposomach z APren-7, w porównaniu do leku rozpuszczonego w klasycznym rozpuszczalniku. Od każdego zwierzęcia pobrano 9 próbek krwi po 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 oraz 360 min od podania leku. Zamierzano oznaczyć stężenie leku w zebranych próbkach osocza i w ten sposób określić tempo jego uwalniania z nośnika. Niestety po wielu próbach cel nie został osiągnięty. Pierwszą metodą jaką zastosowano była metoda z użyciem komercyjnie dostępnego kitu ELISA (Novatein Biosciences, Woburn, Anglia). Następnie podjęto próby oznaczenia dDAVP metodami chromatograficznymi. Zwrócono się w tym celu najpierw do Instytutu Farmaceutycznego (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków), a następnie do Zespołu Spektrometrii Mas (Instytut Chemii Organicznej PAN). Wszystkie zastosowane metody oznaczania desmopresyny w materiale szczurzym okazały się nieskuteczne.

4.3 EFEKTYWNOŚĆ KANDESARTANU ZAMKNIĘTEGO W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7 (ETAP 3)

4.3.1 Doświadczenia chroniczne

Skurczowe ciśnienie krwi tętniczej (SBP)

W ciągu dwutygodniowej obserwacji we wszystkich grupach mierzono jednocześnie skurczowe, średnie i rozkurczowe ciśnienie krwi tętniczej (odpowiednio SBP, MBP i DBP) metodą telemetryczną. Porównania dotyczyły zarówno zmian w obrębie grupy (w stosunku do wyjściowego poziomu ciśnienia krwi tętniczej dla każdej grupy, czyli dnia „0”) oraz różnic między grupami (w odpowiadających dniach doświadczenia).

U wszystkich zwierząt otrzymujących kandesartan niezależnie od nośnika (C+LP, C+L, C+WS) zaobserwowano istotne obniżenie ciśnienia krwi tętniczej (SBP, MBP i DBP; **Ryc. 29 A, B, C**) już po pierwszym dniu podawania leku, które utrzymywało się w ciągu kolejnych dni doświadczenia (wartości uzyskane z 1, 3, 4... aż do 14 dnia istotnie różniły się od wartości w dniu „0” w obrębie każdej grupy). Dla przejrzystości rycin, istotności względem dnia „0” nie zaznaczono na wykresach.

Kandesartan podawany w różnych nośnikach w mniej wyraźny sposób wpływał na obraz rozkurczowego ciśnienia krwi tętniczej (DBP), natomiast jego efekty na SBP i MBP były bardziej zróżnicowane w zależności od zastosowanego nośnika.

W grupie otrzymującej kandesartan w liposomach z APren-7 (C+LP) oraz grupie C+WS (kandesartan w węglanie sodu) zaobserwowano istotnie

niższe wartości SBP w porównaniu do grupy kontrolnej (WS) już od pierwszego dnia doświadczenia ($*p < 0,05$, **Ryc. 29 A**). W grupie, która otrzymywała kandesartan w „klasycznych” liposomach (C+L) istotne obniżenie SBP w stosunku do WS, zaobserwowano dopiero po trzech dniach podawania leku ($**p < 0,05$; **Ryc. 29 A**). Zaobserwowane różnice utrzymywały się do końca doświadczenia (aż do 14 dnia podawania). Tak samo kształtowały się zmiany średniego ciśnienia krwi (**Ryc. 29 B**).

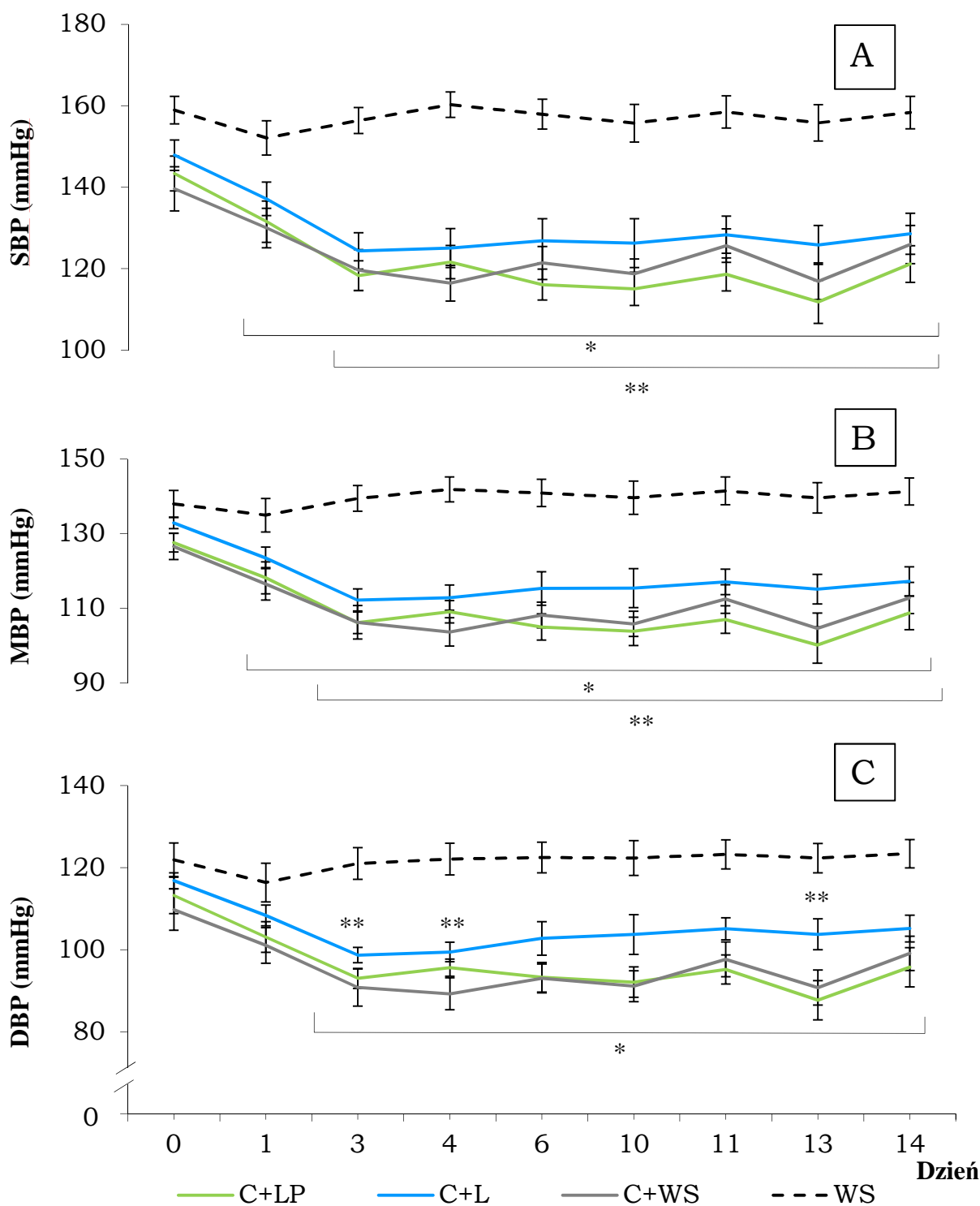
Obniżenie DBP we wszystkich grupach otrzymujących kandesartan (C+LP, C+L oraz C+WS) zaobserwowano po trzech dniach podawania zastrzyków w stosunku do grupy kontrolnej (WS). Począwszy od tego dnia, dla grupy C+LP oraz C+WS istotne różnice w wartościach DBP (w stosunku do grupy WS) utrzymywały się do końca doświadczenia ($*p < 0,05$; **Ryc. 29 C**), podczas gdy wartości DBP w grupie szczurów otrzymujących kandesartan w „klasycznych” liposomach (C+L) istotnie różniły się od zaobserwowanych w grupie kontrolnej (WS) tylko w niektórych dniach, tj. 3, 6 i 13 ($**p < 0,05$; **Ryc. 29 C**).

Analiza przebiegu średnich wartości ciśnienia tętniczego w ciągu dwutygodniowej obserwacji pozwoliła jedynie na ujawnienie różnic w szybkości wystąpienia istotnego, w porównaniu do grupy kontrolnej, obniżenia ciśnienia krwi tętniczej. Dopiero analiza wielkości tego obniżenia (Δ) w różnych grupach i ich porównanie w konkretnych dniach, ujawniło głębsze zróżnicowanie skuteczności kandesartanu, w zależności od zastosowanego nośnika. Wyniki tej analizy zebrano na **Ryc. 30** oraz **Ryc. 31**.

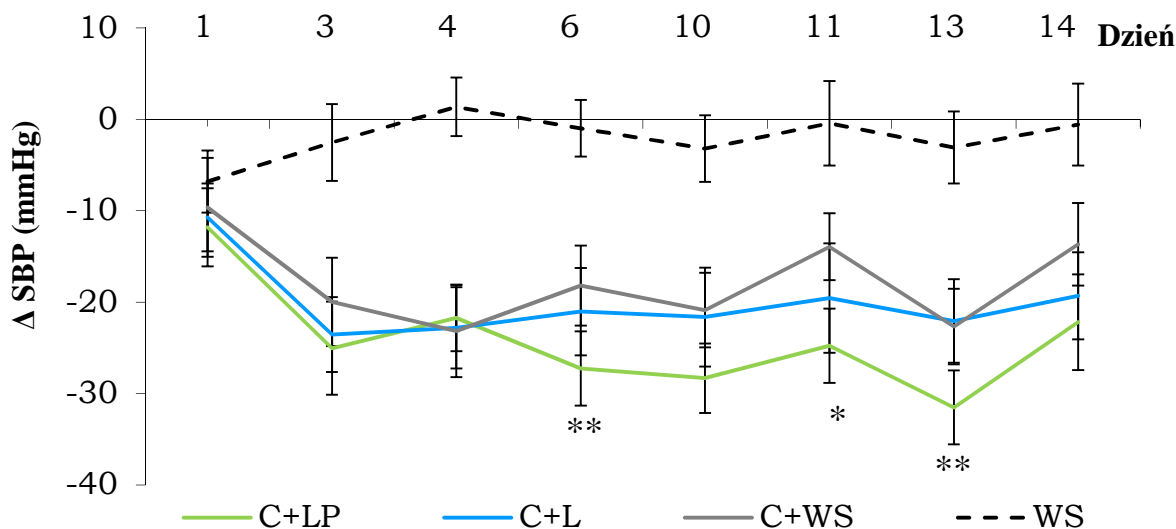
We wszystkich grupach otrzymujących kandesartan (C+LP, C+L, C+WS) począwszy od trzeciego dnia podawania leku, przebieg zmian SBP był istotnie różny od przebiegu zmian w grupie kontrolnej (WS) (**Ryc. 30**; istotności nie zaznaczono na wykresie).

Wyraźniej większe obniżenie SBP (Δ SBP) zaobserwowano w grupie otrzymującej kandesartan w nowo zaprojektowanych nośnikach z APren-7 (C+LP) już od 6 dnia podawania badanych roztworów. Obniżenie SBP w tym dniu było istotnie różne dla tej grupy (C+LP) w porównaniu do pozostałych grup ($** C+LP$ vs $C+L$ oraz $C+WS$, $p < 0,05$; **Ryc. 30**). W grupie C+L maksymalne obniżenie SBP zaobserwowano w 3 (-24±2 mmHg), a w grupie C+WS w 4 dniu doświadczenia (-23±4 mmHg) i w kolejnych dniach bezwzględne wartości Δ SBP dla tych grup utrzymywały się na podobnym poziomie lub były wręcz mniejsze, podczas gdy dla grupy otrzymującej kandesartan w liposomach z APren-7 (C+LP) obniżenie SBP cały czas się pogłębiało, osiągając maksymalną bezwzględną wartość w dniu 13 (-32±2 mmHg). Obraz przebiegu zmian ciśnienia tętniczego w tym dniu doświadczenia zasługuje na szczególną uwagę (**Ryc. 31**). Należy podkreślić, że obniżenie SBP w dniu 13 było istotnie różne dla grupy C+LP w porównaniu do wszystkich pozostałych grup ($* C+LP$ vs $C+L$ oraz

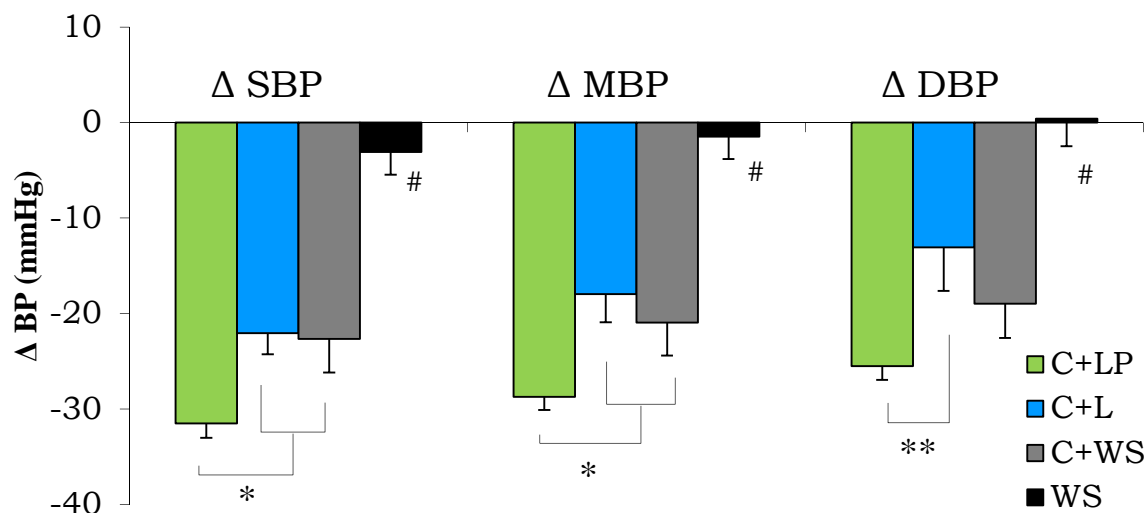
C+WS, $p < 0,05$; **Ryc. 31**), a ponadto również bezwzględna wartość obniżenia DBP była istotnie większa w porównaniu do zaobserwowanej w grupie otrzymującej „klasyczne” liposomy (** C+LP vs C+L, $p < 0,05$; **Ryc. 31**). Między grupami C+L oraz C+WS nie zaobserwowano istotnych różnic przy porównaniu wartości obniżenia SBP, ani DBP. Pole pod krzywą zmian skurczowego ciśnienia krwi tętniczej (SBP) w ciągu dwutygodniowej obserwacji, policzone metodą sumowania pól trapezów, było największe w grupie otrzymującej kandesartan w liposomach z APren-7 i bliskie granicy istotności w stosunku do grupy C+WS (C+LP vs C+WS, $p = 0,07$; **Ryc. 32**).



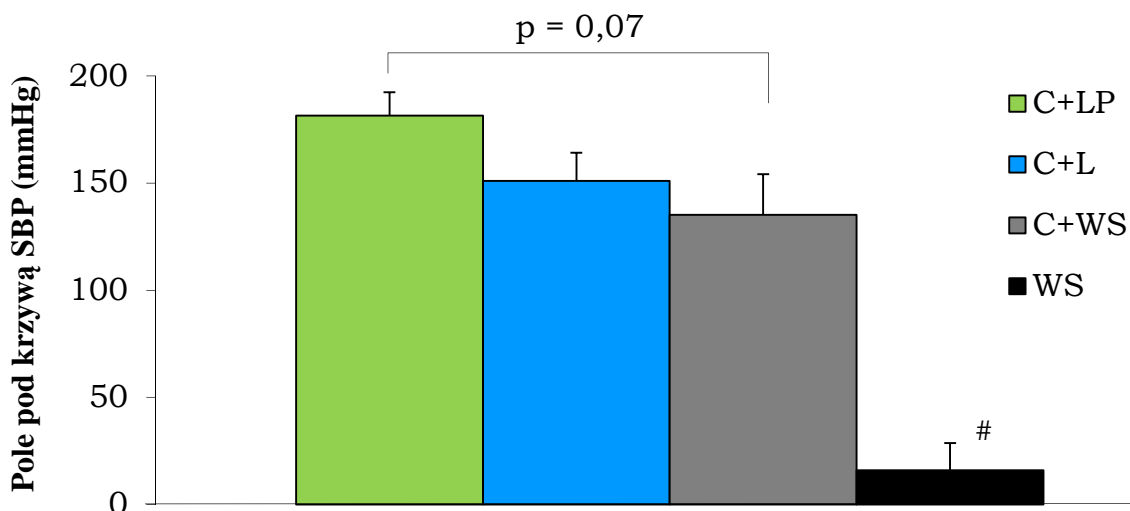
Ryc. 29. A: Skurczowe (SBP); **B:** średnie (MBP); **C:** rozkurczowe (DBP) ciśnienie krwi tętniczej u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan rozpuszczony w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.) w ciągu dwutygodniowej obserwacji; * znamienne różne dla grup C+LP oraz C+WS w stosunku do grupy WS w odpowiadających dniach doświadczenia ($p < 0,05$); ** znamienne różne dla grupy C+L w stosunku do grupy WS w odpowiadających dniach doświadczenia ($p < 0,05$);



Ryc. 30. Przebieg zmian skurczowego ciśnienia krwi tętniczej (Δ SBP) w kolejnych dniach doświadczenia u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan rozpuszczony w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); * znamienne różne dla grupy C+LP w porównaniu do grupy C+WS w odpowiadającym dniu doświadczenia ($p < 0,05$); ** znamienne różne dla grupy C+LP w porównaniu do grupy C+WS oraz C+L w odpowiadającym dniu doświadczenia ($p < 0,05$);



Ryc. 31. Obniżenie skurczowego (Δ SBP), średniego (Δ MBP) i rozkurczowego (Δ DBP) ciśnienia krwi tętniczej w 13 dniu doświadczenia u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan rozpuszczony w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); * znamienne różne dla grupy C+LP w porównaniu do grupy C+L oraz C+WS ($p < 0,05$); ** znamienne różne dla grupy C+LP w porównaniu do grupy C+L ($p < 0,05$); # znamienne różne dla grupy WS w stosunku do grup otrzymujących kandesartan C+LP, C+L, C+WS, $p < 0,05$;



Ryc. 32. Pole pod krzywą zmian skurczowego ciśnienia krwi tętniczej (SBP) w ciągu dwutygodniowej obserwacji, policzone metodą sumowania pól trapezów, u szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan rozpuszczony w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); # znamienne różnice dla grupy WS w stosunku do grup otrzymujących kandesartan C+LP, C+L, C+WS, $p < 0,05$;

Masa ciała, parametry metaboliczne i osoczowe

U wszystkich badanych grup zaobserwowano niewielki, ale istotny przyrost masy ciała w porównaniu z dniem „0” (* wartości masy ciała po 7 i 14 dniach doświadczenia różniły się istotnie od wartości wyjściowych w dniu „0”, $p < 0,05$; **Ryc. 33**).

Pomiędzy grupami nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w absolutnych wartościach masy ciała zwierząt, mimo stosunkowo dużej różnicy w wyjściowych wartościach tego parametru. Wyraźniejsze różnice między poszczególnymi grupami odnotowano przy porównaniu zmiany poziomu tego parametru w czasie (Δ BW).

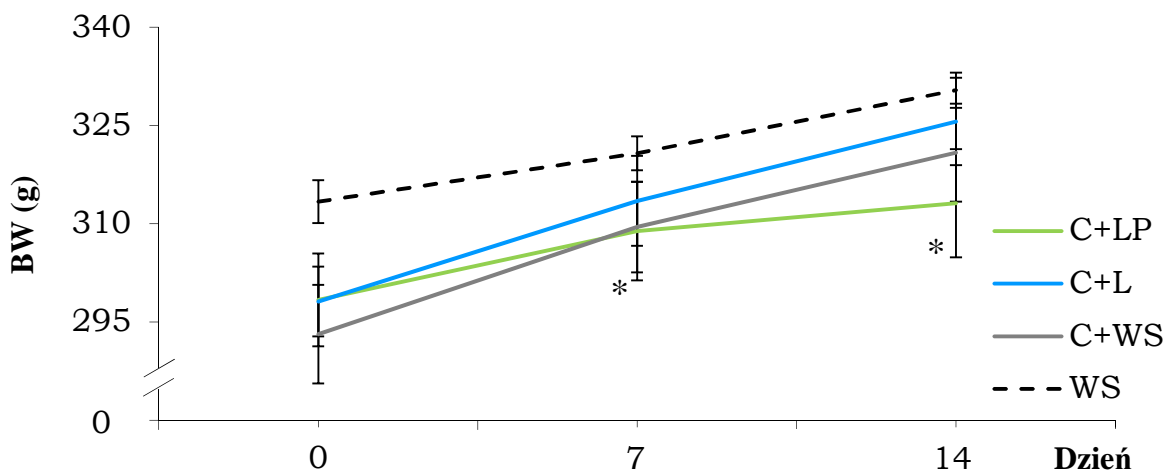
Przyrost masy ciała (Δ BW) po 7 dniach obserwacji był największy w grupie otrzymującej kandesartan w roztworze węgla sodu (C+WS) i istotnie różny od grupy kontrolnej (*C+WS vs WS, $p < 0,05$, **Ryc. 34**). Po 14 dniach obserwacji w grupach C+L oraz C+WS zaobserwowano największy przyrost masy ciała; dla grupy C+L był on istotnie większy w porównaniu do grup C+LP oraz WS (# C+L vs C+LP oraz WS; $p < 0,05$, **Ryc. 34**).

Wyniki uzyskane na podstawie cotygodniowych obserwacji zwierząt w klatkach metabolicznych zamieszczono w **Tabeli 8**. Nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami zwierząt w poszczególnych punktach czasowych. Dla grup, które otrzymywały kandesartan w liposomach z APren-7 (C+LP) oraz kandesartan w węglanie sodu (C+WS) wartości

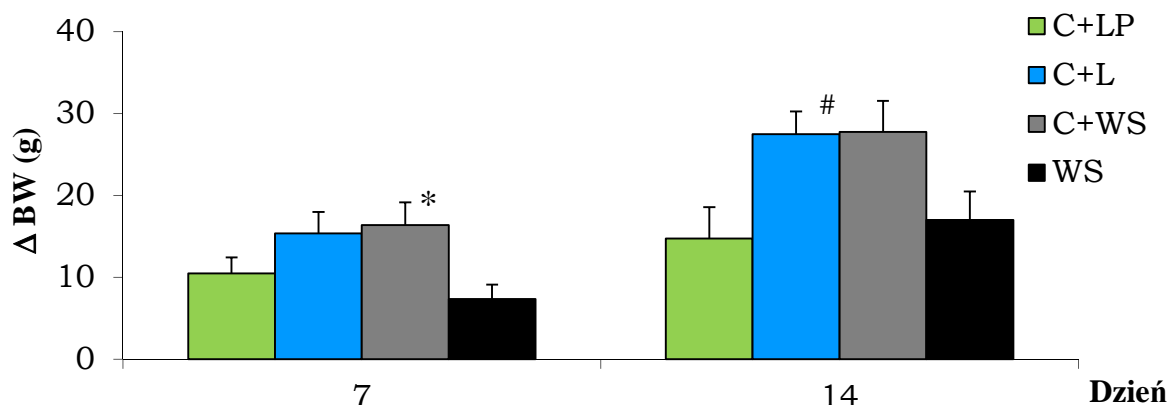
diurezy mierzonej po 7 i 14 dniach obserwacji, różniły się istotnie względem początku doświadczenia (dzień „0”). W grupie kontrolnej, która otrzymywała sam rozpuszczalnik (WS), wartość diurezy po 14 dniach obserwacji była istotnie wyższa w stosunku do dnia „0”. Przyrost tempa wydalania moczu w ciągu dwóch tygodni obserwacji był na nieznacznie wyższym poziomie w grupie kontrolnej (WS), ale nie odnotowano istotnych różnic między grupami; w pozostałych grupach przyrost diurezy był na podobnym poziomie (C+LP: $6,7 \pm 2,2$; C+L: $4,3 \pm 1,5$; C+WS: $6,8 \pm 1,5$; WS: $10,4 \pm 2,8$ ml). W grupie kontrolnej WS istotnie wzrosło także spożycie wody (dzień „0” vs wartość w dniu 14 w grupie WS; $p < 0,05$; **Tabela 8**).

Podczas obserwacji zwierząt w klatkach metabolicznych każdorazowo pobierany był mocz do oznaczeń parametrów wydalniczych. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych oraz sodu i potasu zostało zebrane w **Tabeli 9**. Nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic między grupami w ciągu dwóch tygodni obserwacji.

W dniach poprzedzających obserwację w klatkach metabolicznych od każdego zwierzęcia pobierano próbkę krwi. Uzyskane wyniki zebrano w **Tabeli 10**. Nie zaobserwowano znamiennych różnic między grupami. Wszystkie mierzone parametry utrzymywały się w zakresie norm fizjologicznych dla szczurów SHR. Jednakże można było zauważyć, że stężenie sodu w osoczu nieznacznie obniżyło się tylko w grupie C+LP.



Ryc. 33. Masa ciała (BW) szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węglanu sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.) w ciągu dwutygodniowej obserwacji; * znamienne różnice w stosunku do wartości w dniu „0” w obrębie wszystkich grup (C+LP, C+L, C+WS, WS), $p < 0,05$;



Ryc. 34. Przyrost masy ciała (Δ BW) po 7 i 14 dniach obserwacji szczurów otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); * znamienne różnice w stosunku do grupy WS w odpowiadającym dniu doświadczenia, $p < 0,05$; # znamienne różnice od C+LP oraz WS w odpowiadającym dniu doświadczenia, $p < 0,05$;

Tabela 8. Bilans płynów, spożycie paszy i wydalanie kału w ciągu dwutygodniowej obserwacji szczurów SHR;

		Dzień		
		0	7	14
Spożycie wody (ml/24h)	C+LP	27±2	27±3	33±3
	C+L	31±1	29±1	35±2
	C+WS	30±1	34±2	35±2
	WS	31±2	34±3	41±4*
Diureza (ml/24h)	C+LP	12,3±0,7	18,3±1,1*	19,0±2,1*
	C+L	12,8±0,9	15,5±1,5	17,1±1,5
	C+WS	11,5±1,1	19,2±1,8*	18,3±1,6*
	WS	14,0±1,9	19,6±2,6	24,4±3,2*
Spożycie paszy (g/24h)	C+LP	15,6±1,7	15,2±1,1	16,4±0,5
	C+L	16,5±1,6	17,6±0,7	19,6±0,8
	C+WS	18,4±0,7	17,9±1,3	16,5±0,8
	WS	16,3±0,9	16,1±1,0	18,5±1,1
Wydalenie kału (g/24)	C+LP	8,7±0,9	8,6±0,6	8,1±0,8
	C+L	9,0±0,8	9,4±0,8	9,2±0,8
	C+WS	6,8±0,8	9,5±0,8	7,6±0,6
	WS	8,7±1,0	8,7±0,7	8,6±1,3

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); * znamienne różnice od dnia „0” w obrębie danej grupy ($p < 0,05$)

Tabela 9. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych ($U_{osm} \cdot V$), sodu ($U_{Na} \cdot V$) i potasu ($U_K \cdot V$) w ciągu dwutygodniowej obserwacji szczurów SHR;

		Dzień		
		0	7	14
$U_{osm} \cdot V$ (mOsm/24h)	C+LP	17,7±1,4	20,7±0,8	20,6±1,0
	C+L	17,7±1,8	21,1±1,2	21,0±1,5
	C+WS	18,8±0,9	21,4±1,1	19,3±0,8
	WS	19,1±1,1	21,0±1,0	22,8±1,0
$U_{Na} \cdot V$ (mmol /24h)	C+LP	1,2±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1
	C+L	1,2±0,1	1,1±0,2	1,2±0,2
	C+WS	1,4±0,2	1,6±0,1	1,3±0,1
	WS	1,2±0,1	1,5±0,1	1,6±0,2
$U_K \cdot V$ (mmol/24h)	C+LP	3,6±0,3	3,6±0,2	3,7±0,2
	C+L	3,6±0,3	3,7±0,3	3,8±0,2
	C+WS	3,7±0,2	4,0±0,3	3,6±0,1
	WS	3,4±0,2	3,7±0,2	4,0±0,3

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węglanu sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.)

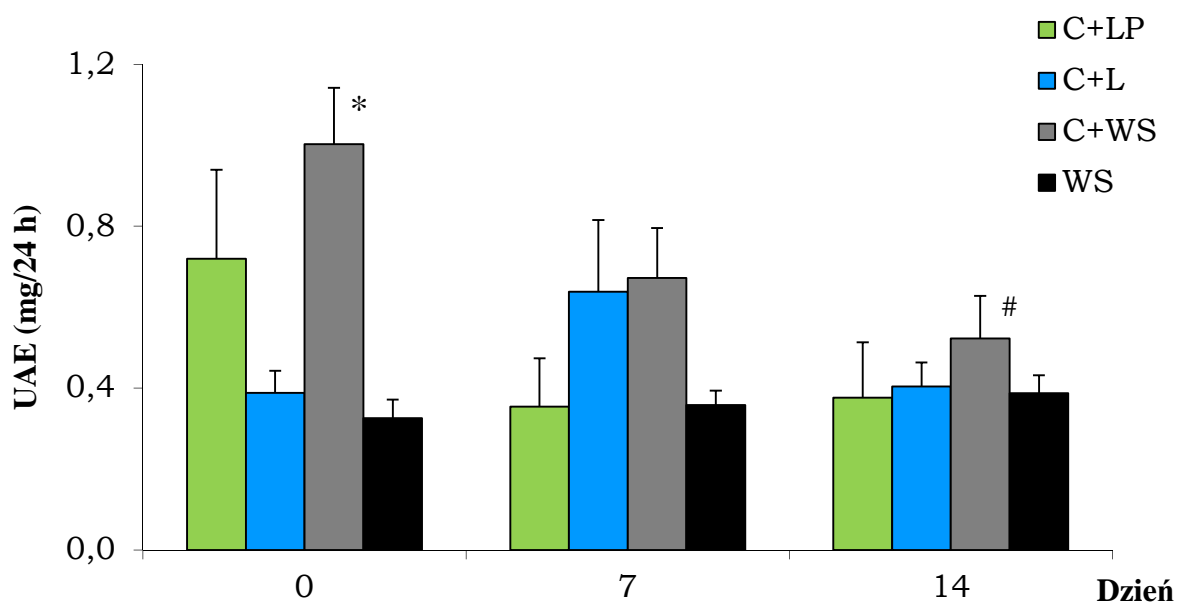
Tabela 10. Stężenie substancji osmotycznie czynnych w osoczu (P_{osm}), stężenie sodu (P_{Na}) i potasu (P_K) w osoczu oraz hematokryt (Ht) w ciągu dwutygodniowej obserwacji szczurów SHR;

		Dzień		
		0	7	14
P_{osm} (mOsm/l)	C+LP	309±1	306±1	309±2
	C+L	308±2	306±2	306±2
	C+WS	311±1	308±2	305±1
	WS	307±1	305±1	306±2
P_{Na} (mmol/l)	C+LP	143±2	136±1	136±1
	C+L	140±1	139±3	138±2
	C+WS	136±1	137±1	136±1
	WS	136±2	134±2	136±2
P_K (mmol/l)	C+LP	5,0±0,2	5,0±0,1	5,0±0,1
	C+L	4,9±0,2	4,9±0,2	4,7±0,2
	C+WS	5,2±0,1	5,3±0,2	5,3±0,3
	WS	4,9±0,1	4,9±0,2	5,2±0,2
Ht (%)	C+LP	50±1	45±1	44±1
	C+L	49±0	48±1	47±1
	C+WS	46±1	46±0	48±1
	WS	48±0	48±1	51±1

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węglanu sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.)

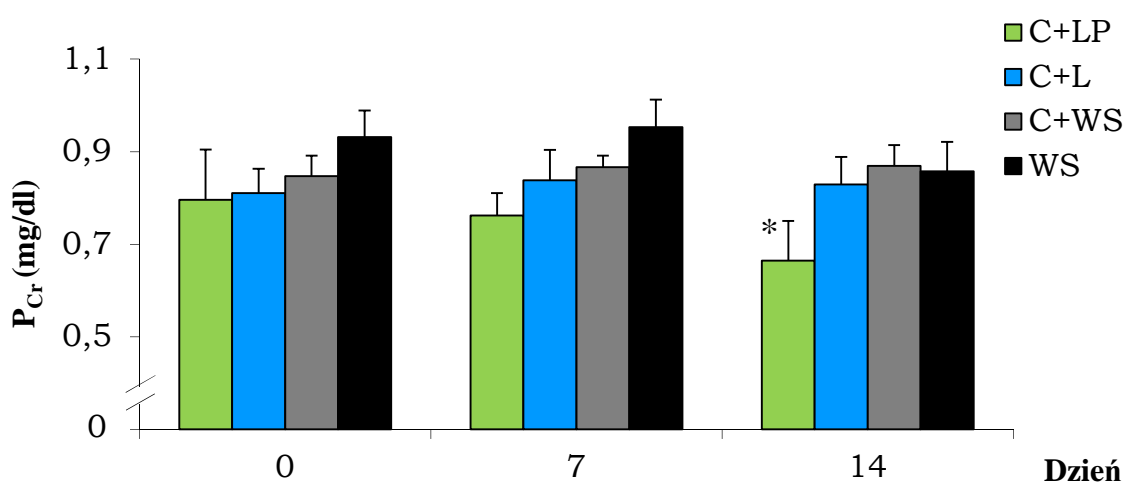
Dobowe wydalanie albuminy i stężenie kreatyniny w osoczu

W próbkach moczu zebranych w dniu „0” oraz po siedmiu i czternastu dniach obserwacji oznaczono również dobowe wydalanie albuminy (UAE, Ryc. 35). Wszystkie wartości (dla wszystkich grup) mieściły się w zakresie norm fizjologicznych dla szczurów SHR. Początkowy poziom UAE (w dniu „0”) dla grupy otrzymującej kandesartan w węglanie sodu (C+WS) był istotnie wyższy, w porównaniu do grupy otrzymującej kandesartan w „klasycznych” liposomach (C+L) oraz w stosunku do grupy otrzymującej sam rozpuszczalnik (WS). Różnice te utrzymywały się także po przeliczeniu wydalania albuminy na kilogram masy ciała (wyniki nie zamieszczone). Po dwóch tygodniach obserwacji, UAE w grupie C+WS uległo istotnemu obniżeniu i w ostatnim dniu doświadczenia chronicznego utrzymywało się na podobnym poziomie we wszystkich grupach.



Ryc. 35. Dobowe wydalanie albuminy (UAE) w dniu „0”, po 7 i 14 dniach obserwacji u szczurów SHR otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); * znamiennie różne w stosunku do grup C+L i W w dniu „0” ($p < 0,05$); # znamiennie różne względem dnia „0” dla grupy C+WS ($p < 0,05$);

Stężenie kreatyniny oznaczane w próbkach osocza pobranych w tych samych dniach (dzień „0”, 7 i 14) przedstawiono na **Ryc. 36**. Mimo braku istotnych różnic między grupami na przestrzeni dwóch tygodni, już po tygodniu zaobserwowano znaczące obniżenie stężenia kreatyniny w osoczu tylko w grupie otrzymującej kandesartan w liposomach z badanymi pochodnymi APren-7 (C+LP), a po dwóch tygodniach zmiana ta była bliska granicy istotności ($p = 0,06$). Przeliczono także stężenie kreatyniny w osoczu na masę ciała zwierząt (**Tabela 11**). Obniżenie stężenia tego parametru przeliczonego na masę ciała w grupie C+LP nabrało większej wagi statystycznej ze względu na przesunięcie się wartości p poniżej ustalonej granicy istotności ($p < 0,05$).



Ryc. 36. Stężenie kreatyniny w osoczu (P_{Cr}) w dniu „0”, po 7 i 14 dniach obserwacji u szczurów SHR otrzymujących codziennie podskórne zastrzyki z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7 ($n=7$); C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE ($n=7$); C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu ($n=7$); WS – sam rozpuszczalnik (jw., $n=7$); * bliskie granicy istotności w stosunku do dnia „0”; $p < 0,06$;

Tabela 11: Stężenie kreatyniny w osoczu (P_{Cr}) przeliczone na 100 g masy ciała w ciągu dwutygodniowej obserwacji szczurów SHR

		Dzień		
		0	7	14
P_{Cr} (mg/dl/100 g)	C+LP	0,27±0,01	0,25±0,01	0,21±0,03*
	C+L	0,27±0,02	0,27±0,02	0,26±0,02
	C+WS	0,29±0,01	0,28±0,00	0,27±0,01
	WS	0,30±0,02	0,30±0,02	0,26±0,02

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: : C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7 ($n=7$); C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE ($n=7$); C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu ($n=7$); WS – sam rozpuszczalnik (jw., $n=7$); * znamienne różnice w stosunku do wartości w dniu „0” ($p < 0,05$)

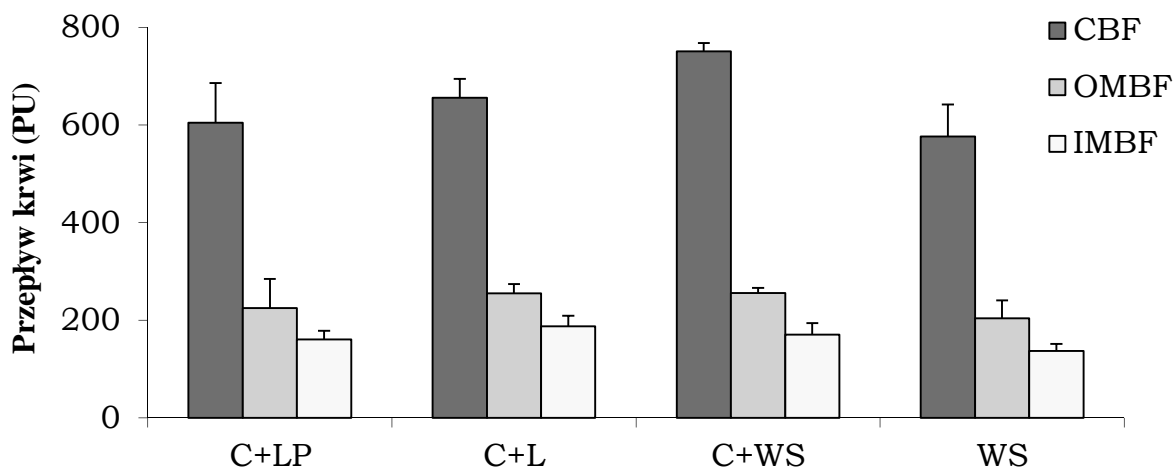
4.3.2 Doświadczenia ostre

Po zakończeniu doświadczeń chronicznych u części zwierząt przeprowadzono doświadczenia ostre w narkozie, w których mierzono parametry charakteryzujące układ krążenia, wydalanie nerkowe oraz hemodynamikę nerek. Średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP, **Tabela 12**) kształtowało się na podobnym poziomie we wszystkich grupach otrzymujących kandesartan (C+LP, C+L oraz C+WS). Najwyższe MBP odnotowano dla grupy kontrolnej otrzymującej sam rozpuszczalnik (WS). Całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF), diureza (V) oraz przesączanie kłębuszkowe (GFR) we wszystkich grupach utrzymywały się na podobnym poziomie (**Tabela 12**). Ukrwienie poszczególnych stref nerek, przedstawione na **Ryc. 37**, również kształtowało się na podobnym poziomie we wszystkich grupach. We wszystkich grupach stosunek OMBF/IMBF utrzymywał się na tym samym poziomie (C+LP: 1,3±0,2; C+L: 1,4±0,2; C+WS: 1,6±0,2; WS: 1,6±0,3, NS).

Tabela 12. Średnie ciśnienie krwi tętniczej (MBP), przepływ całkowity krwi przez nerkę (RBF), diureza (V) oraz przesączanie kłębuszkowe (GFR) mierzone w doświadczeniach ostrych u uśpionych szczurów po dwutygodniowej obserwacji, które otrzymywały badane związki

	C+LP	C+L	C+WS	WS
MBP, (mmHg)	128±9	136±8	131±8	150±10
RBF, (ml/min)	7,1±1,1	7,3±1,4	6,2±1,4	7,5±0,3
V, (μl/min)	3,4±0,3	5,8±1,2	4,1±0,5	3,8±0,6
GFR, (ml/min)	0,9±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	0,8±0,0

Raz dziennie w iniekcji podskórnej podawano: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7 (n=5); C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE (n=6); C+WS – kandesartan w roztworze węglanu sodu (n=5); WS – sam rozpuszczalnik (jw. n=4)



Ryc. 37. Przepływ krwi przez strefy nerki u szczurów w uśpieniu otrzymujących przez dwa tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7 (n=5); C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE (n=6); C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu (n=5); WS – sam rozpuszczalnik (jw. n=4); CBF – przepływ krwi przez korę nerki; OMBF – przepływ krwi przez rdzeń zewnętrzny nerki; IMBF – przepływ krwi przez rdzeń wewnętrzny nerki;

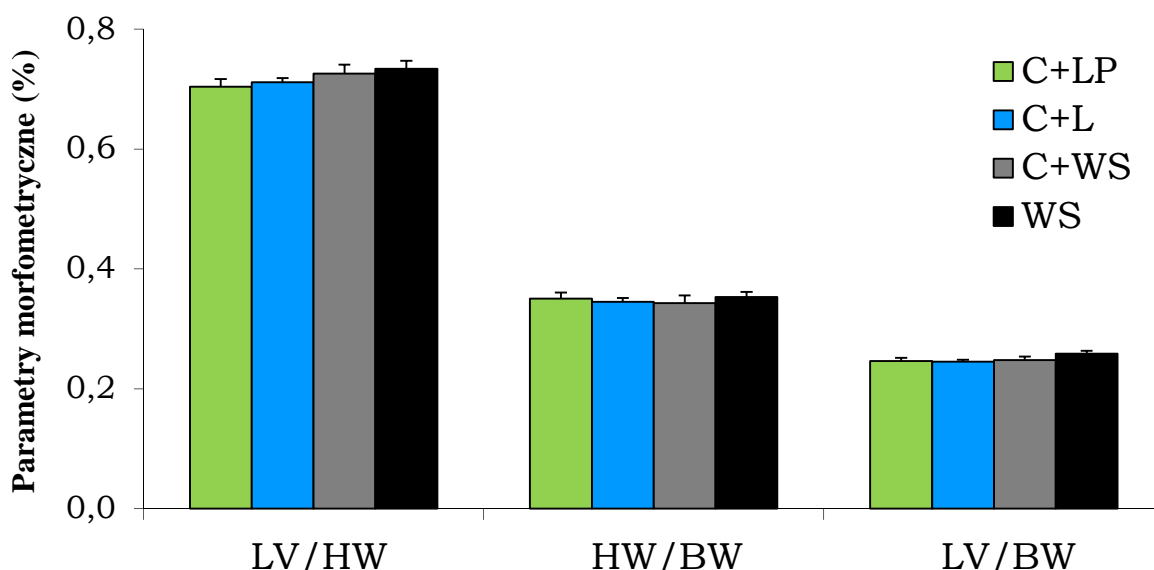
4.3.3 Analiza histopatologiczna, parametry morfologiczne i morfometryczne

Od części zwierząt po doświadczeniach chronicznych pobierano narządy (nie przeprowadzono doświadczenia ostrego) w celu wykonania analizy morfometrycznej i morfologicznej. Masa prawej nerki wyrażona jako procent masy ciała była bardzo zbliżona we wszystkich grupach (C+LP: $0,36 \pm 0,02$; C+L: $0,36 \pm 0,01$; C+WS: $0,34 \pm 0,01$; WS: $0,34 \pm 0,01\%$, NS). Pozostałe mierzone parametry takie jak stosunek masy lewej komory serca do masy serca, masa serca do masy ciała i masa lewej komory serca do masy ciała zostały przedstawione na **Ryc. 38**. Nie zaobserwowano żadnych znamienych różnic między grupami.

Analiza preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną ujawniła znaczne zmiany histopatologiczne w nerkach pobranych od niektórych zwierząt. Na **Ryc. 39** przedstawiono makroskopowe ujęcie wszystkich skrawków nerek, pobranych od szczurów po dwóch tygodniach leczenia. W części utrwalonych preparatów nerkowych, zamiast zwartej trzy-strefowej struktury, zaobserwowano puste przestrzenie, które mogą świadczyć o postępującym procesie zapalnym prowadzącym do ubytku tkanki. Te patologiczne zmiany wystąpiły w każdej z badanych grup, jednakże na podstawie dość subiektywnej oceny (zarówno mikroskopowej jak i makroskopowej) można było zauważyć, że w grupie otrzymującej kandesartan w nośnikach z APren-7 (C+LP) tych zmian było najmniej. W

czterech na osiem ocenianych nerek w grupie C+LP zaobserwowano ubytek tkanki, podczas gdy w grupie otrzymującej kandesartan w „klasycznych” liposomach (C+L) takich nerek było pięć, w tym w dwóch przypadkach zmiany obejmowały już prawie całą strukturę rdzenia. W grupie otrzymującej kandesartan w węglanie sodu (C+WS) nerek dotkniętych zmianami było sześć na osiem, w tym w dwóch przypadkach zaobserwowano znaczny zanik tkanki, ale nie tak rozległy jak w grupie C+L. Co ciekawe w grupie kontrolnej (WS) nie zaobserwowano największych zmian histopatologicznych, a raczej porównywalne ze zmianami w grupach C+L oraz C+WS (w pięciu nerkach w grupie WS można było dostrzec wczesne objawy uszkodzenia, w tym w dwóch zaobserwowano znaczny ubytek tkanki). Na **Ryc. 40** przedstawiono makroskopowe ujęcia wybranych nerek z każdej grupy, dotkniętych największym ubytkiem tkanki.

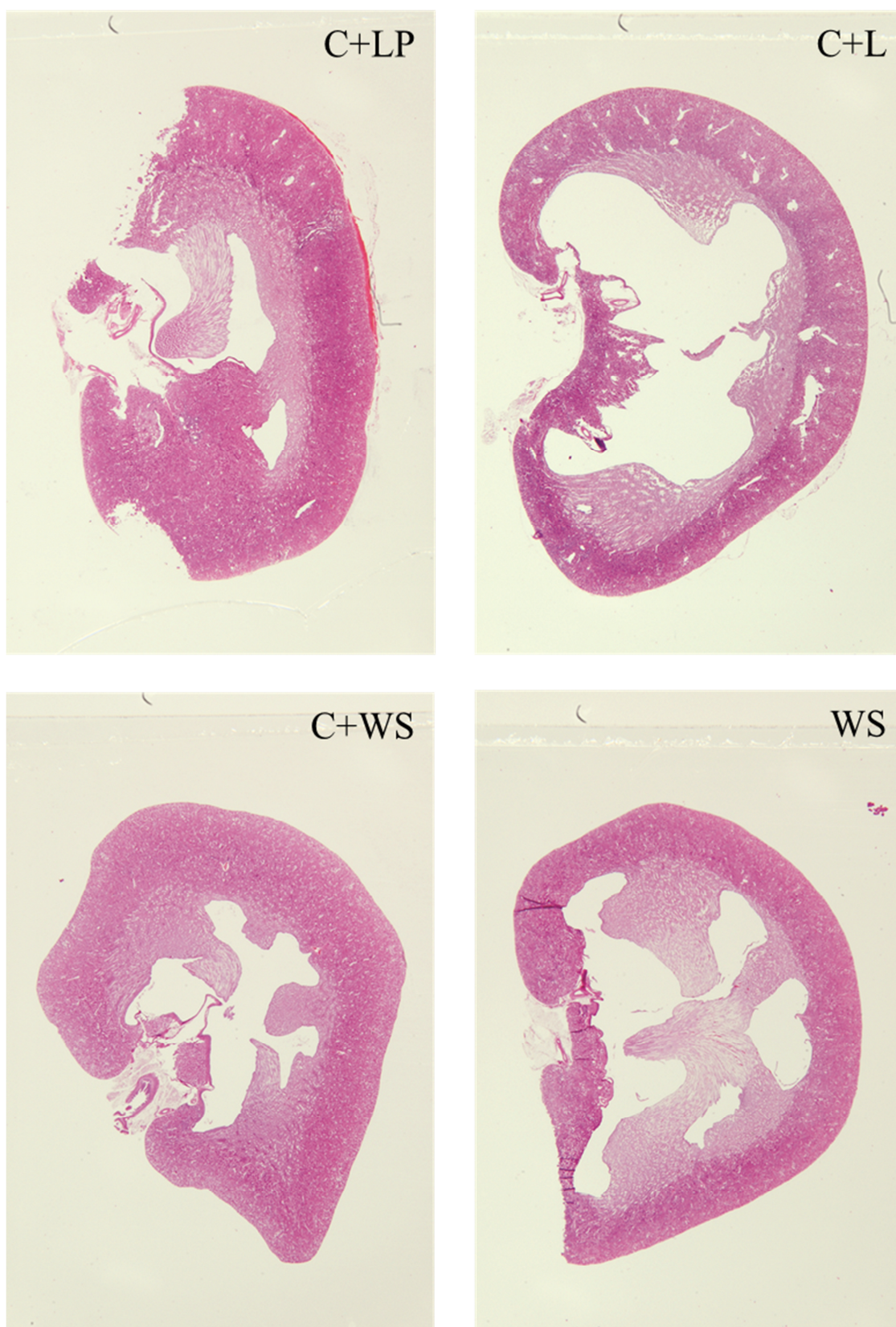
W nerkach, w których jeszcze nie rozwinęły się patologiczne zmiany zaobserwowano prawidłowy obraz morfologiczny typowy dla szczurów SHR. Wybrane zdjęcia mikroskopowe z fragmentami kory oraz rdzenia zewnętrznego przedstawiono na **Ryc. 41**.



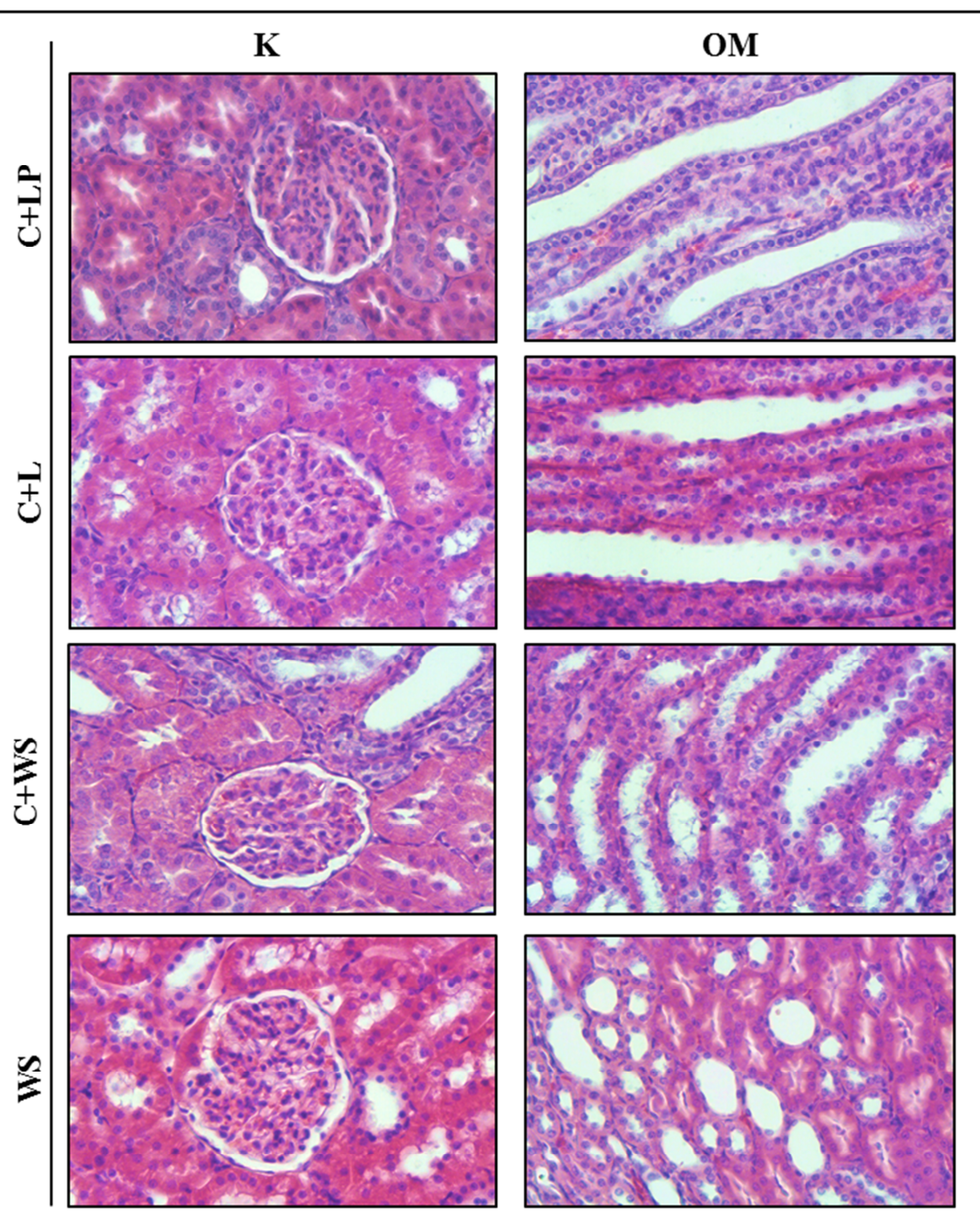
Ryc. 38. Parametry morfometryczne narządów pobranych od szczurów otrzymujących przez dwa tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węglańca sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); LV/BW – stosunek masy lewej komory serca do masy ciała; HW/BW – stosunek masy serca do masy ciała; LV/BW – stosunek masy lewej komory serca do masy serca;



Ryc. 39. Preparaty parafinowe nerek (barwione hematoksylina i eozyna) pobranych od szczurów otrzymujących przez dwa tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węglańku sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.);



Ryc. 40. Wybrane preparaty parafinowe nerek barwione hematoksyliną i eozyną pobrane od szczurów otrzymujących przez dwa tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.);



Ryc. 41. Preparaty parafinowe nerek barwione hematoksyliną i eozyną pobrane od szczurów otrzymujących przez dwa tygodnie codziennie podskórne zastrzyki jednego z następujących roztworów: C+LP – kandesartan zamknięty w liposomach zbudowanych z DOPE i APren-7; C+L – kandesartan zamknięty w „klasycznych” liposomach zbudowanych z DOPE; C+WS – kandesartan w roztworze węgla sodu; WS – sam rozpuszczalnik (jw.); K – kora nerki (powiększenie 200x); OM – rdzeń zewnętrzny (powiększenie 200x);

5. DYSKUSJA

5.1 TOKSYCZNOŚĆ APren-7 (ETAP 1)

Wszystkie zwierzęta traktowane przez cztery tygodnie badanymi amino-prenolami, rozwijały się prawidłowo. W ciągu czterech tygodni obserwacji nie zaobserwowano żadnych odbiegających od normy oznak dotyczących zdrowia zwierząt. Do doświadczeń były użyte stosunkowo młode szczury, których wybór był uwarunkowany dwoma względami. Planowano zbadanie wpływu podawanych substancji na dojrzewanie i zachowanie zwierząt w okresie wzrostu. Parametry takie jak przyrost masy ciała są rutynowo analizowane w badaniach toksykologicznych na zwierzętach [115] i dają dodatkowe informacje o działaniu podawanych substancji. Dodatkowym argumentem była potrzeba przeprowadzenia doświadczeń ostrych po zakończeniu obserwacji chronicznych, w których oceniano hemodynamikę nerek i ich czynność oraz parametry krążeniowe. Wyposażenie do przeprowadzania doświadczeń ostrych dostępne w naszym Zakładzie, dostosowane jest do szczurów o masie ciała ok. 250-350 g. Z tego więc względu w doświadczeniach zostały użyte szczury 5-6 tygodniowe, które po upływie 4 tygodni osiągały masę ciała około 300 g.

Przyrost masy ciała był zbliżony we wszystkich grupach. Według Maitaniego i współpracowników [116] podawane szczurom podskórnie liposomy zbudowane tylko z dipalmitoylofosfatydylocholino (DPPC) nie powodują zmian w masie ciała szczurów. Można przypuszczać, że samo DOPE, czyli analog wyżej wymienionego związku również nie będzie wpływał na masę ciała zwierząt, ale nie znaleziono potwierdzających to doniesień literaturowych. Uzyskane wyniki wskazują, że ani badane pochodne amino-prenolowe, ani same użyte lipidy nie powodują zmian w dojrzewaniu czy przyroście masy ciała zwierząt.

Przeważająca większość otrzymanych wyników dotyczących poszczególnych parametrów pozostawała na zbliżonym poziomie, niezależnie od rodzaju podawanej substancji (brak różnic między grupami). Co istotne z punktu oceny toksyczności samych amino-prenoli, dla obu grup otrzymujących liposomy (L oraz LP) zaobserwowano bardzo zbliżoną charakterystykę mierzonych parametrów, zarówno przy porównaniu wartości bezwzględnych jak i przyrostów wartości poszczególnych parametrów w ciągu czterech tygodni obserwacji.

Stężenie substancji osmotycznie czynnych oraz sodu w osoczu, tak samo jak hematokryt w ciągu czterotygodniowej obserwacji mieściły się w normalnym zakresie dla tych szczurów ustalonym przez Harlan Laboratories Inc., uznanej na całym świecie firmy zajmującej się hodowlą

zwierząt doświadczalnych [117], oraz zgodnie z innymi doniesieniami w literaturze przedmiotu [118].

Ciśnienie krwi tętniczej mierzono zarówno podczas doświadczeń chronicznych u szczurów czuwających (skurczowe ciśnienie krwi tętniczej, SBP), jak i w doświadczeniach ostrych w narkozie (średnie ciśnienie krwi tętniczej, MBP). Zaobserwowany wzrost SBP dla wszystkich grup, podczas czterech tygodni doświadczenia, związany był prawdopodobnie z niedoskonałością i uciążliwością wykorzystywanej metody. Pomiar na ogonie szczura jest jedyną nieinwazyjną metodą pomiaru ciśnienia krwi tętniczej, ale wymaga unieruchomienia zwierzęcia, co wiąże się ze stresem i może prowadzić do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej [119] (pomimo przyzwyczajania zwierząt do procedury pomiaru). Największy wzrost SBP odnotowano w grupie otrzymującej liposomy z APren-7 (LP), ale nie zaobserwowano statystycznie znamiennych różnic między grupami. Zaobserwowane zmiany były jednak niewielkie i z fizjologicznego punktu widzenia mało znaczące. Jednocześnie ciśnienie krwi tętniczej mierzone bezpośrednio w aorcie podczas doświadczeń ostrych, było najniższe w grupie otrzymującej liposomy z APren-7 (LP), co również wskazuje na brak wpływu samych amino-prenoli na ciśnienie krwi tętniczej.

Warto podkreślić, że pomiary wykonane w narkozie mają swoje ograniczenia. W interpretacji wyników należy uwzględnić wpływ samej operacji na analizowane parametry (uwalnianie różnych czynników hormonalnych, zniesienie wielu odruchów pod wpływem działania środka usypiającego).

Dobowe wydalanie albuminy (UAE) jest uznane za bardzo dobry wskaźnik nie tylko stanu czynności nerek, ale też stanowi czynnik ryzyka chorób układu krążenia [84, 120, 121]. Wszystkie otrzymane wartości utrzymywały się w normalnym zakresie UAE dla zdrowych szczurów Sprague-Dawley (0-1 mg/24 h) [122, 123], co sugeruje brak negatywnych zmian w strukturach czy funkcjonowaniu układu wydalania i krążenia zależnych od podawania amino-prenoli. Co ciekawe największy przyrost UAE zaobserwowano w grupie otrzymującej roztwór kontrolny (W), a w grupie otrzymującej liposomy z APren-7 ten przyrost był najniższy. Można spekulować czy badane amino-prenole nie wykazują pewnego protekcyjnego działania na czynność nerek. W trzecim etapie (podrozdział 4.3.1), w którym badano efektywność kandesartanu zamkniętego w nośnikach z APren-7, mierzono również stężenie kreatyniny w pobranych próbkach osocza i tylko w grupie otrzymującej amino-prenole zaobserwowano obniżenie wartości tego parametru w czasie, podczas gdy w pozostałych grupach kreatynina osocza utrzymała się na podobnym poziomie lub nawet zaobserwowano jej niewielki wzrost. Istnieje możliwość, że oprócz antyhipertensyjnego działania leku, same amino-

presole przyczyniły się do zaobserwowanego obniżenia stężenia kreatyniny, wskazując na pewne ochronne właściwości. Na podstawie otrzymanych wyników nie można jednak wyciągnąć ostatecznych wniosków. Aby stwierdzić czy amino-presole wykazują protekcyjne działanie, należałoby porównać ich aktywność z działaniem substancji o dobrze poznanej nefroprotekcyjnej aktywności. Zakładamy, że podawanie samej wody do iniekcji nie jest szkodliwe dla zwierząt. Największy przyrost UAE zaobserwowany w grupie otrzymującej wodę, mógł być spowodowany największym przyrostem masy ciała w tej grupie. Z tego względu porównano także dobowe wydalanie albuminy w przeliczeniu na kilogram masy ciała, mimo iż nie jest to typowy sposób przedstawiania tego wskaźnika. W przypadku UAE przeliczonego na kilogram masy ciała nie zaobserwowano tak wyraźnych różnic między grupami. Ponieważ jednak wzrost tego parametru w czasie utrzymał się tylko dla grupy W, podczas gdy dla obu grup otrzymujących liposomy (L i LP) zaobserwowano tendencję spadkową UAE po czterech tygodniach, można przypuszczać, że różnice w tym parametrze nie wynikają jedynie z różnic w masie ciała zwierząt.

Kolejnym biomarkerem, mierzonym w zebranych materiale było stężenie metabolitów tlenku azotu (NO). Tlenek azotu jest produkowany z L-argininy przez trzy różne izoformy syntazy tlenku azotu (endotelialną, eNOS; neuronalną, nNOS oraz indukowalną, iNOS) w bardzo wielu komórkach. Ten stosunkowo niewielki związek odgrywa znaczącą rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak kontrola napięcia ściany naczyń, ciśnienia krwi tętniczej, hemodynamiki czy wydalania nerkowego [124, 125]. Znana jest również jego patofizjologiczna rola w różnych stanach chorobowych, takich jak szok septyczny, astma czy zespół poreperfuzyjny [126]. Aktywność NO można oszacować na podstawie pomiaru jego metabolitów w płynach ustrojowych – nitratów i nitrytów (NOx) [127]. Oznaczenie wydalania nitratów z moczem daje informacje o systemowej produkcji NO, natomiast poziom nitrytów oznaczany w osoczu odzwierciedla aktywność eNOS. Wydalanie metabolitów tlenku azotu z moczem utrzymywało się na podobnym poziomie przez całe doświadczenie i nie odnotowano istotnych różnic między grupami.

Wcześniejsze doniesienia literaturowe [128] sugerują antyoksydacyjne działanie innych pochodnych poliizoprenoidów (epoksydów), zachodzące poprzez stymulację biosyntezy koenzymu Q. Jednakże omawiane w niniejszej rozprawie wyniki nie wskazują jednoznacznie na antyoksydacyjną aktywność APren-7.

W doświadczeniach ostrych mierzono przepływ krwi przez poszczególne strefy nerki. W obu grupach otrzymujących liposomy, niezależnie od ich składu (L i LP) doszło do zrównania się przepływów przez rdzeń zewnętrzny (OMBF) i wewnętrzny (IMBF). Z ostatnich badań

przeprowadzonych w naszym Zakładzie [129] wynika, że obniżenie OMBF, przyczyniające się do obniżenia stosunku OMBF/IMBF, może być jednym z wczesnych sygnałów upośledzenia czynności nerki. Z naszych badań wynika, że zjawisko zrównania przepływów rdzeniowych może być bardzo czułym wskaźnikiem uszkodzeń nerek, wyprzedzającym inne zmiany i uszkodzenia jakie ocenia się w badaniach toksykologicznych. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że zjawisko to wystąpiło w obu grupach otrzymujących liposomy, co nie wskazuje na negatywne działanie samego APren-7. Jednocześnie samo DOPE, lipid który był użyty do skonstruowania obu typów liposomów, nie jest uważany za szkodliwy, ale może podnosić toksyczność innych lipidów kationowych, co zostało wykazane w badaniach na liniach komórkowych [130, 131]. Technika laser-Doppler pozwala na wykonanie bardzo precyzyjnych pomiarów, jednakże warto pamiętać, że stosowane do pomiarów sondy są sondami punktowymi, tzn. mierzą przepływ krwi tylko w niewielkim obszarze. Dodatkowo zbyt bliskie umiejscowienie dwóch sond obok siebie może prowadzić do zakłóceń w wyniku odbierania światła laserowego jednej sondy przez drugą. Aby uniknąć zafałszowania wyników po zakończeniu doświadczenia weryfikuje się położenie sond, niemniej jednak porównanie wyników z niezależnych grup nie zawsze jest wskazane, a otrzymane dane i stawiane hipotezy należy weryfikować przy pomocy innych metod.

Po zakończeniu obserwacji chronicznych od części szczurów pobrano narządy w celu przeprowadzenia analizy histologicznej, morfologicznej oraz w celu określenia pewnych parametrów morfometrycznych, takich jak stosunek masy pobranych narządów do masy ciała. Ocenę zmian masy narządów takich jak serce, nerki czy wątroba przeprowadza się rutynowo w badaniach toksykologicznych i stanowi ona integralną część badań nad nowymi związkami o potencjale terapeutycznym [132]. Uważa się, że zmiana w masie niektórych organów jest jednym z najbardziej czułych wskaźników toksyczności [133, 134]. Zmieniona masa nerek może świadczyć o nefrotoksyczności podanych związków, hipertrofii kanalików czy przewlekłej postępującej nefropatii (*ang.* chronic progressive nephropathy) [135].

Masa nerek pobranych od szczurów po czterech tygodniach obserwacji, wyrażona jako procent masy ciała, była na tym samym poziomie we wszystkich grupach i zgodna z danymi dla szczurów Sprague-Dawley podanymi przez Harlan Laboratories Inc. [117]. Wskazuje to pośrednio na brak zmian w morfologii i czynności nerek.

Nerki pobrane po zakończeniu doświadczeń chronicznych od części szczurów (nie poddanych doświadczeniom ostrym) zostały użyte do oceny ogólnej morfologii struktur nerkowych (barwienie hematoksyliną i eozyną). Kora nerek szczurów we wszystkich grupach wykazywała prawidłową i uporządkowaną strukturę, w której łatwo można było

wyróżnić odpowiednie elementy (kłębuszki i kanaliki). Także mikroskopowy obraz struktur rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego był prawidłowy oraz zgodny z obrazem przedstawianym w literaturze dla zdrowych szczurów [136, 137]. Brak zmian w morfologii struktur nerkowych świadczy na korzyść badanych amino-prenoli.

Od części szczurów pobierano także serce w celu oceny stanu lewej komory serca (LVH). Przerost lewej komory serca może być objawem wielu chorób układu krążenia, w tym przede wszystkim nadciśnienia tętniczego [138, 139], dlatego jest użytecznym narzędziem w ocenie szkodliwości potencjalnych leków. Zaobserwowaną różnicę, tj. większy stosunek LV/BW w grupie otrzymującej liposomy „klasyczne” w porównaniu do grupy otrzymującej rozpuszczalnik, można uzasadnić kilkoma czynnikami. Mało prawdopodobne jest, że obserwowany w tej grupie niewielki wzrost ciśnienia krwi tętniczej u szczurów czuwających przyczynił się do przerostu lewej komory serca u tych zwierząt. Warto zwrócić uwagę, że masa ciała w grupie kontrolnej była statystycznie większa niż w obu pozostałych grupach, podczas gdy wartość bezwzględna LV była na podobnym poziomie, co mogło skutkować szczególnie niskimi wartościami tego wskaźnika w tej grupie. Może to również być następstwem większej całkowitej masy serca w grupie L (stosunek masy lewej komory serca do masy całego serca był taki sam we wszystkich grupach), co może wynikać ze specyfiki samych szczurów Sprague-Dawley. McAdams i współpracownicy donoszą, że u szczurów Sprague-Dawley przerost lewej komory serca jest dość powszechny i może nie być następstwem stanów chorobowych (do przerostu dochodziło u 38% badanych szczurów SD) [140]. Wyniki opublikowane przez McAdamsa wzbudziły jednak pewne wątpliwości innych naukowców, co do wniosków wysuwanych przez autora oraz używanych przez niego metod [141]. Należy podkreślić, że zaobserwowane różnice w LV/BW nie dotyczyły grupy otrzymującej liposomy z APren-7, a więc nie są istotne dla oceny toksyczności samych amino-prenoli. Otrzymane wyniki ponownie sugerują brak toksyczności badanych pochodnych, nie tylko w porównaniu z efektem innego typu liposomów, ale także w porównaniu do efektu rozpuszczalnika.

Podsumowanie

Toksyczność kationowej pochodnej alkoholi poliizoprenoidowych APren-7 była oceniana na podstawie badań na szczurach Sprague-Dawley. Model ten jest uznany przez badaczy na całym świecie i bardzo dobrze sprawdza się w badaniach toksykologicznych. Co ważne ogromna liczba badań przeprowadzonych z użyciem szczurów Sprague-Dawley dostarcza też obszerną pulę informacji na temat wartości wielu parametrów charakteryzujących zdrowe szczury [118]. Badania skupiono

na ocenie morfologii i funkcji układu wydalniczego, ponieważ jak wykazano we wstępie (podrozdział 1.4), nerki są szczególnie podatne i wrażliwe na toksyczne działanie ksenobiotyków, a jednocześnie istnieje wiele dobrze poznanych biomarkerów, których analiza pozwala na szybkie wykrycie nawet subtelnych zmian powstałych na skutek podawania toksycznych związków. Oceniano także wybrane parametry układu krążenia.

Przeważająca większość pozostałych badanych wartości była na podobnym poziomie we wszystkich grupach. Zaobserwowano niewielkie różnice między grupami, ale dotyczyły one głównie porównania obu grup otrzymujących liposomy (L i LP) do grupy, której podawano rozpuszczalnik (W). Większość uznanych w badaniach toksykologicznych wskaźników, takich jak stan lewej komory serca, dobowe wydalanie albuminy czy wydalanie metabolitów tlenu azotu, mieściły się w normalnym zakresie dla zdrowych szczurów Sprague-Dawley. Analiza morfologii struktur nerkowych również nie wykazała żadnych zmian w badanych tkankach.

Podsumowując, APren-7 podawany podskórnie przez cztery tygodnie szczurom Sprague-Dawley nie spowodował żadnych zmian w strukturach i czynności układu wydalniczego oraz krążenia. Nie miał też wpływu na dojrzewanie i wzrost zwierząt, dlatego wydaje się, że nie jest on szkodliwy dla organizmów żywych w zakresie badanych parametrów i mógłby być stosowany jako składnik liposomowych nośników leków.

5.2 EFEKTYWNOŚĆ DESMOPRESYNY ZAMKNIĘTEJ W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7

Na tym etapie badań oceniano antydiuretyczną skuteczność desmopresyny podanej szczurom w uśpieniu w dwóch nośnikach: w liposomach z APren-7 oraz w wodzie. Aby zablokować działanie endogennej wazopresyny oraz aby móc lepiej odróżnić efekt desmopresyny podanej w różnych nośnikach, wywoływano u wszystkich zwierząt diurezę wodną, czyli stan, w którym wydalana jest duża ilość hipotonicznego moczu. Wywołanie podobnego poziomu diurezy wodnej u szczurów okazało się dość trudnym zadaniem, ze względu na bardzo duże zróżnicowanie osobnicze poszczególnych zwierząt. Wydaje się, że szczury z wyjściowo niskim poziomem diurezy reagowały w sposób opóźniony na infuzję glukozy, z kolei te u których ten początkowy poziom był wyższy, stosunkowo szybko rozwijały wysoki poziom wydalania moczu. Jednakże można stwierdzić, że prawie każdy badany osobnik reagował w nieco odmienny sposób, co znacznie utrudniło interpretację uzyskanych wyników. Duże odchylenia od średnich wartości diurezy, wpłynęły na dość skomplikowany obraz statystyczny, także trudny do interpretacji.

Analiza uzyskanych danych ujawniła zróżnicowany przebieg diurezy we wszystkich grupach. Co ciekawe nie tylko charakterystyki grup otrzymujących antydiuretyczny lek odróżniały się od grup kontrolnych, ale zaobserwowano także odmienne profile wydalania moczu między grupami, które nie otrzymywały leku hamującego wydalanie moczu (LP oraz W).

W grupie otrzymującej puste liposomy (LP) zaobserwowano spowolniony wzrost wydalania moczu w porównaniu do grupy W. Można spekulować, że efekt ten spowodowany był działaniem samych amino-prenoli. W badaniach biofizycznych opisanych w literaturze wykazano, że poliprenole odgrywają rolę modulatorów właściwości błon biologicznych, wpływając na ich przepuszczalność i płynność [26]. Amino-prenole, w których zastąpiono grupę wodorotlenową czwartorzędową grupą amoniową posiadają fuzjogenne właściwości, dzięki którym te kationowe lipidy jeszcze lepiej oddziałują z błonami biologicznymi. Ponadto, jak już wspomniano we wstępie (1.2.1) dolichole, także należące do rodziny alkoholi poliizoprenoidowych, uczestniczą w transporcie postępowym pęcherzyków (w kierunku do błony komórkowej; *ang.* anterograde transport) [2]. Można postawić pytanie, czy opóźnienie diurezy wodnej u szczurów, które otrzymywały puste liposomy z APren-7 nie było spowodowane zwiększeniem przepuszczalności błony kanalików zbiorczych dla wody przez same badane pochodne oraz czy nie ułatwiają one procesu przyłączania kanałów wodnych (akwaporyn, AQP2),

przyspieszając ich wbudowywanie w błonę luminalną, dzięki czemu staje się ona bardziej przepuszczalna dla wody.

W celu lepszego odróżnienia zaistniałych zmian w poszczególnych grupach, planowano ocenę lokalizacji AQP2 poprzez wyznakowanie przeciwciałami skierowanymi przeciwko temu białku, w preparatach parafinowych przygotowanych z nerek pobranych od szczurów po doświadczeniach. Akwaporyny, jak wspomniano we wstępie (podrozdział 1.5.1), są to wyspecjalizowane białka błonowe, które umożliwiają transport wody przez błony biologiczne w wielu komórkach i tkankach [101]. Po podaniu leku i pobudzeniu receptorów V_2 dla wazopresyny powinno dojść do przemieszczania kanałów wodnych i ich wbudowywania w błonę, co czyni ją bardziej przepuszczalną dla wody. W grupach które otrzymywały desmopresynę, stopień wyznakowania nie był wyraźniejszy prawdopodobnie z powodu czasu który upłynął do momentu pobrania nerki do badań (120 min od podania badanych roztworów). Czas ten był na tyle odległy, że także w grupach kontrolnych dochodziło do spontanicznego wygaszania diurezy a więc wzmożonej retencji wody na skutek wbudowywania akwaporyn w błony kanalika. Należy zauważyć, że w takim układzie doświadczalnym (badania czynnościowe) nie było możliwe wcześniejsze pobieranie nerek. Wiadomo, że wbudowywanie AQP2 w odpowiedzi na dDAVP jest procesem stosunkowo szybkim (minuty). Z tego względu przeprowadzono dodatkową serię badań, w których nerki pobierano po 30 min od podania badanych roztworów, czyli jeszcze przed wystąpieniem samoistnego wygaszania diurezy w grupach kontrolnych (wyniki nie zamieszczone). Również w takim układzie doświadczalnym nie zaobserwowano różnego stopnia wyznakowania AQP2. Ocena zróżnicowanego efektu na podstawie wyznakowania kanałów wodnych prawdopodobnie wymagałaby osobnych badań z bardzo dużą liczbą zwierząt, od których pobierano by nerki np. po 3, 5, 10, 15 min od podania leku. Gdyby w przyszłości podjęto takie badania należałoby także wziąć pod uwagę wykorzystanie preparatów mrożeniowych, które pozwalają na lepsze zachowanie białek i ich dalszą analizę.

Obniżenie osmolalności osocza w grupie LP w ciągu pierwszej godziny od podania roztworu pustych liposomów (czyli po 90 min od momentu rozpoczęcia infuzji glukozy) kształtowało się podobnie jak w obu grupach otrzymujących desmopresynę. Dopiero po upływie 90 min od podania liposomów, poziom diurezy zaczął wyraźnie wzrastać, co także przełożyło się na zahamowanie efektu rozcieńczenia osocza. Tak jak już wspomniano powyżej, bardzo zróżnicowane reakcje poszczególnych zwierząt na intensywną infuzję glukozy ograniczają możliwość wyciągnięcia jednoznacznych wniosków.

Między grupami otrzymującymi desmopresynę nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic, ale można było zauważyć różny przebieg krzywych wydalania moczu. Opóźniony efekt antydiuretyczny leku podanego w liposomach z APren-7 (efekt widoczny w okresie do 60 min od podania) prawdopodobnie był wynikiem powolnego uwalniania się substancji aktywnej z nośnika. Wydaje się, że podanie desmopresyny w nośniku, z którego jest stopniowo uwalniana do układu krążenia, powoduje przedłużenie działania leku. Końcowy poziom diurezy oraz wydalanie substancji osmotycznie czynnych w obu grupach, które otrzymywały desmopresynę (dD+LP oraz dD+W) były na bardzo podobnym poziomie. Pomimo tego, że desmopresyna podana klasycznie (dD+W) wywołała szybszy efekt antydiuretyczny, wydalanie moczu zaczęło ponownie wzrastać w tej grupie, już po godzinie od podania leku. W przypadku dDAVP podanej w liposomowych nośnikach z APren-7, efekt hamowania diurezy utrzymywał się do końca doświadczenia. Trudno stwierdzić, jak długo po podaniu dD+LP utrzymywałaby się tendencja spadkowa w diurezie, ponieważ obserwacje kończono po 2 godzinach od podania leku lub roztworów kontrolnych. W doświadczeniach wstępnych, które prowadzono w celu ustalenia protokołu wywołania diurezy wodnej wykazano, że przy tak intensywnej infuzji 2,5% roztworu glukozy (duża prędkość i objętość podawanego płynu) dochodziło do samoistnego obniżenia diurezy u szczurów, które nie otrzymywały antydiuretycznego leku. Z tego względu zdecydowano się na tylko 2 godzinne obserwacje, gdyż po dłuższym czasie jeszcze trudniej byłoby odróżnić efekt desmopresyny od samoistnego obniżenia diurezy. Niemniej jednak można przypuszczać, że efekt wywołany przez stopniowo uwalnianą desmopresynę z liposomów z APren-7 utrzymywał się dłużej niż po desmopresynie podanej klasycznie. Początkowo rozcieńczenie osocza na skutek retencji wody objawiające się obniżeniem jego osmolalności, kształtowało się podobnie w obu grupach otrzymujących desmopresynę. Jednakże po upływie 90 min od podania leku w grupie otrzymującej dDAVP w badanych nośnikach zaobserwowano pogłębienie się rozcieńczenia osocza (niższe wartości osmolalności) w porównaniu do grupy otrzymującej lek w wodzie. Na tej podstawie można przypuszczać, że zamknięcie dDAVP w liposomach z APren-7 wpływa na jej biodostępność, nieznacznie opóźniając antydiuretyczne działanie desmopresyny, ale jednocześnie przedłużając jej aktywność.

Problemy ze stosowaniem hydrofilowych leków peptydowych, do których należy desmopresyna, związane są z ich szybkim usuwaniem z ustroju (enzymatyczna i/lub chemiczna degradacja, eliminacja przez nerki). Skutkuje to często krótkim okresem półtrwania leków ($t_{1/2}$), co w konsekwencji prowadzi do skróconego działania terapeutycznego. Biologiczny okres półtrwania dDAVP zależy od postaci, w jakiej jest podawana ($T_{1/2}$ po

podaniu doustnym wynosi od 1,5 do 2,5 h; po podaniu dożylnym lub w postaci roztworu donosowego od 7,8 do 75,5 min; donosowo w postaci Stimat spray od 3,3 do 3,5h wg informacji podanych przez FDA [142]). We wszystkich przypadkach $T_{1/2}$ desmopresyny jest dość krótki, co stwarza potrzebę codziennego przyjmowania leku [143]. Nawet w przypadku dłużej działającego donosowego roztworu desmopresyny, ze względu na niedostateczną absorpcję biodostępność tego leku jest niska (od 2,0 do 11,3%) [144]. Na przestrzeni lat podjęto wiele prób poprawy właściwości tego antydiuretycznego leku, w tym badano aktywność lipidowanej (*ang.* lipidized) desmopresyny [143], czy desmopresyny podanej w postaci lepkich roztworów. Badano także efektywność różnych estrów desmopresyny. Podjęto również udane próby zamknięcia desmopresyny w liposomach [144], które są uważane za jedne z najlepszych nośników leków hydrofilowych [59]. Wykazano, że zamknięcie leków w liposomach chroni je przed degradacją enzymatyczną, poprawia ich penetrację i absorpcję po podaniu donosowym [144].

Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że podana dożylnie desmopresyna zamknięta w liposomach z APren-7 działała wolniej na skutek stopniowego uwalniania leku z nośnika, co przyczyniło się do przedłużenia jej efektywności. Takie uwalnianie może przedłużyć czas półtrwania desmopresyny, zapewnić ochronę przed enzymatyczną degradacją czy szybką eliminacją przez nerki. Desmopresyna jest lekiem dobrze znanym, stosunkowo rzadko wywołującym poważne skutki uboczne. Jednakże znanych jest wiele przypadków, w których działanie desmopresyny (szczególnie w postaci dłużej działającego aerozolu donosowego) spowodowało przewodnienie organizmu (*ang.* water intoxication), objawiające się wymiotami, bólami głowy, utratą przytomności i hiponatremią [145]. Podejrzewa się, że przedłużone działanie leku może zwiększać ryzyko przewodnienia organizmu, szczególnie gdy nie przestrzegane są restrykcje w przyjmowaniu płynów. Dlatego tak ważne jest odpowiednie dawkowanie desmopresyny i zapewnienie jej optymalnego czasu przebywania w ustroju. Wydaje się, że podanie desmopresyny w nowo zaprojektowanych liposomach z APren-7 może być korzystne i umożliwić rzadsze podawanie leku, przy zachowaniu tego samego efektu terapeutycznego i uniknięciu skutków ubocznych.

W celu ustalenia dokładnej farmakokinetyki desmopresyny (tempa jej uwalniania z nośników), co jest niezmiernie istotną kwestią przy badaniu nowych nośników leków, przeprowadzono serię doświadczeń na czuwających szczurach, umieszczonych w klatkach metabolicznych z zastosowaniem automatycznego systemu do infuzji leków oraz pobierania próbek krwi. Podjęto próby oznaczenia stężenia desmopresyny w zebranych próbkach krwi, niestety wszystkie z zastosowanych metod okazały się nieskuteczne. W przyszłości planowane jest dalsze

poszukiwanie możliwości oznaczenia dDAVP w małych stężeniach i w małych objętościowo próbkach osocza jakie można pobrać od szczurów. Jednocześnie planujemy przeprowadzenie kolejnych serii badań farmakokinetycznych z większą dawką leku, tak aby łatwiej go było wykryć dostępnymi metodami.

W doświadczeniach mierzono także inne parametry, takie jak przepływy przez poszczególne strefy nerki, tempo filtracji kłębuszkowej, czy ciśnienie krwi tętniczej. Nie zaobserwowano znaczących różnic między grupami, ani istotnych różnic w obrębie poszczególnych grup. Wyniki te są kolejnym potwierdzeniem, że amino-prenole, także po podaniu dożylnym, nie wpływają negatywnie na funkcjonowanie układu krążenia czy wydalania przynajmniej w zakresie badanych parametrów.

Podsumowanie

Ostateczny efekt antydiuretyczny desmopresyny podanej w dwóch nośnikach – liposomach z APren-7 oraz wodzie – był bardzo zbliżony w obu grupach. Zaobserwowano jednak różny przebieg hamowania wydalania moczu. dDAVP podana w liposomach z APren-7, działała wolniej niż dDAVP rozpuszczona w wodzie. Jednakże dzięki stopniowemu uwalnianiu desmopresyny z nośnika, wydaje się, że jej działanie zostało wydłużone. Można przypuszczać, że zastosowanie nowych nośników zmieniających profil biodostępności (przedłużenie biologicznego okresu półtrwania leku w ustroju, ochrona przed szybkim wydalaniem nerkowym i degradacją enzymatyczną) może przynieść wymierne korzyści (rzadsze dawkowanie leku, przy zachowaniu tego samego efektu terapeutycznego i uniknięcie skutków ubocznych). Jednak do wysunięcia ostatecznych wniosków potrzeba jeszcze kolejnych badań, w celu ustalenia tempa uwalniania substancji aktywnej w nowo zaprojektowanych liposomach.

Drugim aspektem, na który warto zwrócić uwagę, jest potencjalny wpływ badanych pochodnych na retencję wody w organizmie. Uzyskane wyniki (opóźnienie wywołania stanu diurezy wodnej w porównaniu do grupy otrzymującej sam rozpuszczalnik) mogą sugerować, że amino-prenole wpływają na przepuszczalność błon biologicznych po podaniu dożylnym (poprzez bezpośredni wpływ na błony biologiczne i wbudowywanie AQP2). Na podstawie otrzymanych wyników nie można jednak definitywnie potwierdzić ani odrzucić tej hipotezy, ze względu na różną reaktywność poszczególnych zwierząt i duże odchylenia od wartości średniej. Do postawienia konkretnych wniosków niezbędne jest przeprowadzenie kolejnych doświadczeń, w których porównywany byłby sam wpływ amino-prenoli na wydalanie moczu.

5.3 EFEKTYWNOŚĆ KANDESARTANU ZAMKNIĘTEGO W NOŚNIKACH ZAWIERAJĄCYCH APren-7

Na tym etapie badań oceniano antyhipertensyjną skuteczność kandesartanu podanego w nowo zaprojektowanych liposomach zawierających badane pochodne (amino-prenole) w porównaniu do efektywności leku podanego w innych nośnikach. U wszystkich zwierząt, które otrzymywały kandesartan, zaobserwowano znaczne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Analiza zebranego materiału wykazała największy wpływ leku (niezależnie od nośnika) na skurczowe ciśnienie krwi tętniczej. Do niedawna sądzono, że to wartość rozkurczowego ciśnienia krwi tętniczej (DBP) jest wskaźnikiem prognostycznym o największym znaczeniu u pacjentów z nadciśnieniem [146]. Dopiero obszerne badania epidemiologiczne wykazały, że zmiany skurczowego ciśnienia krwi (SBP) stanowią tak samo istotny, o ile nie bardziej znaczący czynnik ryzyka w chorobie nadciśnieniowej [146]. Wiadomo, że te dwie składowe podlegają wpływom różnych czynników [147], dlatego substancje o antyhipertensyjnej aktywności mogą w różny sposób oddziaływać na SBP i DBP. W 2005 roku opublikowano wyniki meta-analizy obszernej bazy danych, które wskazują, że skuteczność antyhipertensyjną wielu leków zachodzi poprzez dominujący wpływ na skurczowe ciśnienie krwi [148]. Biorąc pod uwagę powyższe informacje uznano, że analiza zmian SBP na skutek blokowania receptorów AT₁ jest odpowiednim narzędziem do oceny wpływu zamknięcia kandesartanu w różnych nośnikach.

Na podstawie analizy zmian ciśnienia krwi tętniczej można przypuszczać, że zastosowanie nowo zaprojektowanych nośników z badanymi amino-prenolami (C+LP) korzystnie wpłynęło na skuteczność terapeutyczną leku. Początkowy antyhipertensyjny efekt wywołany podawaniem kandesartanu w liposomach z APren-7 (C+LP) był podobny do efektu uzyskanego w grupie otrzymującej kandesartan w węglanie sodu (C+WS) i szybszy niż zaobserwowany w grupie otrzymującej kandesartan w „klasycznych” liposomach (C+L). Wyraźne różnice między poszczególnymi grupami, które ujawniło dopiero porównanie wielkości samego obniżenia skurczowego ciśnienia tętniczego (Δ SBP), były widoczne już od 6 dnia podawania leku (istotne obniżenie SBP w grupie C+LP w porównaniu do pozostałych grup). Obniżenie SBP pogłębiało się w tej grupie prawie do końca doświadczenia, osiągając maksymalną wartość w 13 dniu doświadczenia. Dodatkowo pole pod krzywą SBP było największe w tej grupie. Na podstawie zaobserwowanych różnic można sugerować, że kandesartan wykazuje lepszą skuteczność antyhipertensyjną po podaniu w nośniku z APren-7. Wydaje się, że lepsza efektywność leku podanego w nowych nośnikach wynika z obecności

samych amino-prenoli. Efekt wywołany podaniem kandesartanu w „klasycznych” liposomach (C+L) był widoczny później niż dla pozostałych grup, a wielkość obniżenia SBP w kolejnych dniach doświadczenia była zbliżona do zaobserwowanej w grupie otrzymującej kandesartan w węglanie sodu (C+WS).

Najwyższą skuteczność kandesartanu podanego w liposomach z APren-7 (C+LP) spośród wszystkich zastosowanych nośników potwierdza także analiza zmian poziomu kreatyniny w osoczu (P_{Cr}). Jak wykazano we wstępie (podrozdział 1.4.2), kreatynina jest historycznie jednym z najstarszych i najczęściej badanych biomarkerów układu wydalniczego. Tylko w grupie C+LP zaobserwowano znaczące obniżenie P_{Cr} . Wartość w tej grupie po 14 dniach leczenia była najbardziej zbliżona do fizjologicznych norm dla SHR (0,3 – 0,7 mg/dl). Zakres P_{Cr} oszacowany został na podstawie opublikowanych wyników badań innych naukowców, uzyskanych w grupach kontrolnych, nieleczonych szczurów SHR [149, 150, 151, 152, 153]. Większość otrzymanych wartości P_{Cr} we wszystkich grupach, była powyżej oszacowanego zakresu, bądź w pobliżu jego górnej granicy. Uzyskanie wyższych wartości prawdopodobnie wynika z różnych metod stosowanych przez badaczy. Porównanie różnych technik oznaczania kreatyniny wykazało duży wpływ samej metody oznaczenia na uzyskane wyniki w tych samych próbkach [154, 155]. Niemniej jednak, obniżenie stężenia kreatyniny w grupie C+LP (bliskie granicy ustalonego poziomu istotności, $p=0,06$) może świadczyć o wystąpieniu poprawy czynności nerek, zależnej od największego obniżenia ciśnienia krwi tętnicznej po podaniu leku w liposomach z APren-7.

Stężenie kreatyniny, jak już wspomniano, jest zależne od wielu czynników, między innymi od masy mięśniowej. W grupie C+LP zaobserwowano niższy przyrost masy ciała niż w pozostałych grupach otrzymujących kandesartan, dlatego rozważano, czy właśnie to nie jest przyczyną również najniższego stężenia kreatyniny w osoczu. Okazało się, że obniżenie P_{Cr} przeliczonej na 100 g masy ciała szczurów w grupie C+LP jest jeszcze bardziej wyraźne i zyskało moc statystyczną przekraczając ustalony próg istotności ($p<0,05$). Nieznaczące różnice w masie ciała szczurów także mogą być wynikiem działania samego kandesartanu. W badaniach na szczurach spontanicznie nadciśnieniowych, którym podawano kandesartan w postaci proleku (*ang.* candesartan cilexetil) wykazano, że jego duże dawki mogą nieznacznie obniżyć masę ciała zwierząt w porównaniu do szczurów nieleczonych lub otrzymujących lek w mniejszych dawkach [156]. Ze względu na inną postać leku i drogę jego podawania nie można jednak dokładnie porównać dawek stosowanych w przytoczonych badaniach, do tych użytych w prezentowanej rozprawie. Stąd wpływ kandesartanu na przyrost masy ciała pozostaje tylko hipotezą. Przyrost masy ciała w grupie kontrolnej otrzymującej sam

rozpuszczalnik (WS) kształtował się na podobnym poziomie jak w grupie badanej (C+LP). Sugeruje to, że zaobserwowane różnice były prawdopodobnie przypadkowe. Dodatkowo, w pierwszej części (ETAP 1) porównywano wpływ pustych liposomów z APren-7 do liposomów „klasycznych” na przyrost masy ciała szczurów i nie znaleziono różnic pomiędzy tymi grupami (podrozdział 4.1.1), co sugeruje, że również badane pochodne nie są przyczyną niższej masy ciała tych zwierząt.

Drugim biomarkerem, którego użyto do oceny skuteczności kandesartanu w liposomach z APren-7, było dobowe wydalanie albuminy (UAE). Na podstawie analizy profilu UAE na przestrzeni dwóch tygodni nie zaobserwowano wpływu kandesartanu w badanych nośnikach z APren-7 na ten parametr. Wartości we wszystkich grupach utrzymywały się w normalnym zakresie dla nieleczonych szczurów spontanicznie nadciśnieniowych, ustalonym na podstawie opublikowanych do tej pory wyników badań z użyciem SHR [153, 157, 158]. Przyjmuje się, że poziom albuminy wydalanej z moczem powyżej 5 mg/24 h świadczy o albuminurii u tych szczurów [157]. Zaobserwowane wartości były znacznie poniżej tej granicy u wszystkich zwierząt we wszystkich punktach czasowych. W grupie otrzymującej kandesartan w węglanie sodu (C+WS) odnotowano istotne obniżenie UAE po 14 dniach leczenia, ale nie wydaje się, że było to spowodowane skuteczniejszym działaniem samego leku podanego w węglanie sodu. Z trudnych do ustalenia przyczyn wyjściowy poziom UAE, jeszcze przed rozpoczęciem leczenia (dzień „0”), w tej grupie był istotnie wyższy od pozostałych (C+L oraz WS). Po dwóch tygodniach wartości UAE we wszystkich grupach były bardzo zbliżone do siebie i nie różniły się od grupy kontrolnej (WS).

Uważa się, że szczep SHR stanowi obecnie najlepszy model odzwierciedlający nefropatie pojawiające się u pacjentów na skutek choroby nadciśnieniowej [159, 160]. Jednakże Garrett i współpracownicy [157] twierdzą, że szczury SHR są ciekawą alternatywą dla sodowrażliwych szczurów Dahl (*ang.* Dahl salt-sensitive), ponieważ uszkodzenie nerek u tych szczurów nie pojawia się jednocześnie wraz z rozwijającym się nadciśnieniem. Stwierdzenie to nie jest jednak do końca zasadne. Wyniki wielu badań przeprowadzonych na całym świecie [159, 161], w tym eksperymentów w prezentowanej dysertacji (histopatologiczne zmiany w nerkach omówione poniżej) oraz charakterystyka SHR podana przez Harlan Laboratories [162] wskazują na postępujące uszkodzenie nerek u tych szczurów. Mimo dość znacznych różnic w opublikowanych wynikach eksperymentów, kluczowym czynnikiem wydaje się być tutaj wiek badanych szczurów [163, 164]. Inoue i współpracownicy [165] wykazali, że starsze szczury z utrwalonym nadciśnieniem charakteryzują się znacznie wyższym poziomem albuminy wydalanej z moczem. W badaniach tych autorów już

u 12-tygodniowych zwierząt poziom UAE znacznie przekraczał wartości tego parametru mierzone u młodych szczurów. W przedstawionej rozprawie nie zaobserwowano jednak tego zjawiska. Przyczyną braku różnic w UAE po dwóch tygodniach leczenia prawdopodobnie był fakt, że szczury dopiero wchodziły w ustaloną fazę nadciśnienia, stąd postępujące uszkodzenie nerek nie przełożyło się jeszcze na zwiększone wydalanie albuminy.

Analiza histopatologiczna wykazała zmiany strukturalne nerek (preparaty barwione hematoksyliną i eozyną) u niektórych badanych zwierząt. Znaczne uszkodzenie nerek, skutkujące zanikiem tkanki nerkowej (*ang. nephrosclerosis*), jest zjawiskiem powszechnie występującym u szczurów spontanicznie nadciśnieniowych [162]. Nerki szczurów SHR charakteryzują się zmniejszoną liczbą nefronów [166] w porównaniu do nerek szczurów szczepu Wistar-Kyoto, które stanowią normotensyjny odpowiednik SHR. Zjawisko to powiązано z rozwojem nadciśnienia (na podstawie wyników badań zarówno w modelach zwierzęcych jak i na ludziach) [167]. Jednocześnie wykazano, że szczury SHR cechują się wrodzonym zwichnięciem światła tętniczki doprowadzającej kłębuszków, co może bezpośrednio powodować niedokrwienie tkanki śródmiąższowej i jej naciekanie przez komórki odpowiedzi zapalnej (limfocyty T i makrofagi), które lokalnie generują ANG II oraz reaktywne formy tlenu. To wszystko może prowadzić do kanalikowo-śródmiąższowego zapalenia nerek [168]. Subiektywna ocena skrawków parafinowych nerek barwionych hematoksyliną i eozyną pobranych od szczurów wykazała, że w grupie otrzymującej kandesartan w nośnikach z APren-7 (C+LP) było najmniej dotkniętych zmianami nerek oraz że zmiany te nie były tak rozległe jak w pozostałych grupach. Można przypuszczać, że patologiczny proces zapalny prowadzący do ubytków tkanki został w tej grupie zahamowany w największym stopniu. Trzeba mieć jednak na uwadze, że przypuszczenie to oparte jest jedynie na subiektywnej ocenie, a nie na ilościowym oszacowaniu zmian. W przyszłości planowane jest użycie wybranego modelu matematycznego oraz analizy statystycznej do oceny różnic powstałych uszkodzeń i ubytku tkanki, co powinno ułatwić ocenę skuteczności leku podanego w różnych nośnikach.

Analiza parametrów morfometrycznych, takich jak stan lewej komory serca czy stosunek masy nerek do masy ciała, nie wykazała różnic między grupami. Wszystkie wartości utrzymywały się na podobnym poziomie oraz były zgodne z wynikami innych badaczy [153].

Zwrócono uwagę na nieznaczne obniżenie stężenia sodu w osoczu szczurów otrzymujących lek w badanych nośnikach (C+LP), co może sugerować większą aktywność kandesartanu w blokowaniu angiotensyny II. Jak wiadomo, ANG II stymuluje reabsorbcję sodu w kanaliku proksymalnym, a także stymuluje syntezę i wydzielanie aldosteronu,

który wzmacnia reabsorpcję sodu w kanalikule zbiorczym nerki [169]. Blokowanie działania ANG II powinno w konsekwencji prowadzić do zwiększonego wydalania sodu, jednak w przedstawianych badaniach nie zaobserwowano tego zjawiska. Z drugiej strony obniżenie ciśnienia krwi tętniczej (skutkujące zmniejszonym wydalaniem sodu) mogło przeciwstawić się temu procesowi, prowadząc do braku zmian w wydalaniu sodu. Obniżenie stężenia jonów sodu w osoczu w grupie C+LP mogło też być niezwiązane z reabsorbacją tego jonu w kanalikach, a być wynikiem pewnej redystrybucji puli sodu (np. w wyniku tzw. nieaktywnego gromadzenia sodu w skórze). Trzeba jednak mieć na uwadze, że zjawisko to jest procesem bardzo złożonym, podlegającym skomplikowanej i wieloczynnikowej regulacji. Zatem na podstawie tylko jednego parametru – obniżenia sodu w osoczu – nie można wyciągnąć żadnych stanowczych wniosków ani sugerować mechanizmu tej zmiany.

Ocena pozostałych mierzonych parametrów nie ujawniła istotnych różnic między grupami otrzymującymi kandesartan, ani w stosunku do grupy kontrolnej (WS). Przeważająca większość uzyskanych wartości (wyniki z klatek metabolicznych, pozostałe parametry osocza, wyniki otrzymane w doświadczeniach ostrych) utrzymywała się na podobnym poziomie i nie odbiegała od norm fizjologicznych dla nieleczonych szczurów SHR. Jedną z niewielu zaobserwowanych różnic był wzrost diurezy po dwóch tygodniach leczenia w grupach C+LP, C+WS oraz WS. Ponadto w grupie kontrolnej zaobserwowano istotny wzrost spożycia wody. Podwyższenie tych wartości prawdopodobnie związane było z fizjologicznym przyrostem wagi szczurów. Porównanie zmian (przyrostów) tych parametrów w czasie między poszczególnymi grupami nie ujawniło żadnych różnic (dane nie zamieszczone).

Podsumowanie

Analiza zebranych danych sugeruje, że największą efektywność wykazywał kandesartan podany w nowo zaprojektowanych nośnikach, zawierających badane pochodne – amino-prenole. W tej grupie zaobserwowano największe obniżenie skurczowego ciśnienia krwi tętniczej, obniżenie stężenia kreatyniny we krwi oraz najmniejsze zmiany histopatologiczne w nerkach. Lek podany w „klasycznych” liposomach wykazywał niższą skuteczność, porównywalną z kandesartanem podanym w węglanie sodu. Na tej podstawie można przypuszczać, że najwyższa skuteczność antyhipertensyjna kandesartanu była wynikiem zamknięcia w nośnikach zawierających badane pochodne. Modyfikując działanie liposomowych nośników, dzięki fuzjogennym właściwościom, amino-prenole mogły ułatwić im penetrację błon biologicznych w tkankach, dzięki czemu lek najszybciej i w największym stężeniu przechodził do

krwioobieg, a stamtąd do swojego miejsca uchwytu, w tym przypadku receptorów AT₁ dla angiotensyny II, powodując obniżenie ciśnienia krwi.

Dodatkowym argumentem przemawiającym na korzyść badanych pochodnych jako składników liposomowych nośników leków, są wyniki otrzymane w ZBL IBB PAN podczas przygotowywania zawiesin liposomowych. APren-7, jako składnik liposomów sprawiał, że w tę samą ilość lipidów wbudowywało się trzy razy więcej hydrofobowego kandesartanu w porównaniu do liposomów zbudowanych tylko z DOPE (wspomniane wyniki będą częścią przygotowywanej rozprawy doktorskiej Katarzyny Gawareckiej). Taka modyfikacja właściwości liposomowych nośników poprzez zwiększenie ich „ładowności” wydaje się być niezwykle korzystna.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W przedstawionej rozprawie badano właściwości półsyntetycznych pochodnych alkoholi poliizoprenoidowych (amino-prenole) i ich przydatność, jako składników liposomowych nośników leków. Przedstawione powyżej badania można podsumować następująco:

1. APren-7 podawany podskórnie przez cztery tygodnie szczurom Sprague-Dawley nie miał wpływu na dojrzewanie i wzrost zwierząt ani nie spowodował zmian w strukturach i czynności układu wydalniczego oraz krążenia. Także po podaniu dożylnym szczurom w uśpieniu nie zaobserwowano negatywnych zmian w badanych parametrach.

Otrzymane wyniki pozwalają sądzić, że APren-7 nie jest szkodliwy dla organizmów żywych, przynajmniej w zakresie badanych parametrów i można podjąć dalsze badania prowadzące do jego zastosowania w medycynie.

2. Zamknięcie desmopresyny w liposomach z APren-7 spowodowało opóźnienie w jej działaniu, ale końcowy efekt hamowania diurezy był bardzo zbliżony do zaobserwowanego w grupie otrzymującej desmopresynę w klasycznym rozpuszczalniku. Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że lek podany w liposomach zawierających badane amino-prenole wykazywał przedłużone działanie ze względu na stopniowe uwalnianie z nośnika.

Taka modyfikacja biodostępności (przedłużenie działania leku, ochrona przed usuwaniem przez nerki, czy degradacją enzymatyczną) może być w wielu przypadkach bardzo korzystna i umożliwić rzadsze podawanie leku oraz redukcję występujących skutków ubocznych.

3. Zamknięcie kandesartanu w liposomach z APren-7 poprawiło jego antyhipertensyjną aktywność, w porównaniu do skuteczności leku podanego w liposomach klasycznych i do rozpuszczonego w węglanie sodu.

Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że lepsze właściwości nowych nośników wynikają z obecności samych amino-prenoli, które wydają się wspomagać zarówno hipotensyjne jak i nefroprotektoryjne działanie kandesartanu.

Powyższe wnioski oparte na przeprowadzonych badaniach pozwalają sądzić, że amino-prenole mogą znaleźć zastosowanie w medycynie i farmakologii jako nośniki substancji aktywnych farmakologicznie.

7. PERSPEKTYWY

Analiza zebranego materiału pozwala sądzić, że badane amino-prenole mogą znaleźć zastosowanie jako składniki liposomowych nośników leków. Aby potwierdzić ich właściwości należy przeprowadzić jeszcze szereg badań. Przede wszystkim, dość istotnym zagadnieniem wydaje się ustalenie tempa uwalniania leku z nośnika. Należałoby także określić metabolizm nowych pochodnych w ustroju, szczególnie, że są to związki, które nie były wcześniej badane. Widomo, że endogenne dolichole są magazynowane w niektórych tkankach, głównie w mózgu i gruczołach wydzielniczych (np. jądra, trzustka), a także w pewnym stopniu w wątrobie. Chociaż pobieranie poliprenoli z diety zachodzi w niewielkim stopniu [170], to można przypuszczać, że nienasycone poliprenole mogą ulegać różnym przekształceniom, np. enzymatycznej modyfikacji do dolicholi i ewentualnie brać udział w procesie glikozylacji białek. Wiadomo również, że czas półtrwania dolicholi w większości tkanek jest podobny do czasu półtrwania innych składników błonowych (około 3 dni). W kolejnych etapach badań należałoby zbadać katabolizm amino-prenoli i sprawdzić, czy metabolizm pochodnych jest zbliżony do naturalnie występujących związków, czy też modyfikacja chemiczna w postaci wprowadzenia czwartorzędowej grupy amoniowej znacznie wpływa na losy cząsteczki w ustroju.

Kolejnym etapem mogłaby być także modyfikacja składu liposomów, tak aby poprawić ich stabilność (dodanie kolejnych substancji pomocniczych, np. cholesterolu czy jego pochodnych). Na podstawie badań przeprowadzonych przez Katarzynę Gawarecką (ZBL IBB PAN), która przygotowywała wszystkie mieszaniny liposomowe, można sądzić, że amino-prenole poprawiają „ładowność” liposomów, co wydaje się bardzo korzystne. Można się zastanowić, czy zmiana stosunku amino-prenoli do reszty składników nośników mogłaby poprawić ich właściwości.

Pochodnym alkoholi poliizoprenoidowych przypisuje się antyoksydacyjne właściwości [171] (oraz badania pozostałych konsorcjantów). W przedstawionych badaniach zauważono, że w grupach otrzymujących badane pochodne wystąpiły pewne zjawiska mogące sugerować ich działanie protekcyjne w stosunku do niektórych narządów i tkanek. Do potwierdzenia tej hipotezy należałoby przeprowadzić kolejne badania mierzące do bezpośredniego pomiaru właściwości antyoksydacyjnych amino-prenoli, a także porównać ich efekt do

działania związków o dobrze scharakteryzowanych właściwościach antyoksydacyjnych.

Kolejnym elementem, na który zwrócono szczególną uwagę był wpływ pustych liposomów z APren-7 na opóźnienie wywołania stanu diurezy wodnej w badaniach ETAPU 2. Aby sprawdzić, czy amino-prenole mają wpływ na reabsorpcję wody w kanaliku zbiorczym nerki (poprzez bezpośredni wpływ na przepuszczalność błon i wbudowywanie kanałów wodnych) należałoby także przeprowadzić dalsze szczegółowe badania.

8 PIŚMIENNICTWO

- [1] Skorupinska-Tudek K, Wojcik J, Swiezewska E: Polyisoprenoid alcohols-recent results of structural studies. *Chem Rec.* **2008**, 8, 1, 33-45
- [2] Surmacz L, Swiezewska E: Polyisoprenoids - Secondary metabolites or physiologically important superlipids? *Biochem Biophys Res Commun.* **2011**, 407, 4, 627-632
- [3] Swiezewska E, Danikiewicz W: Polyisoprenoids: Structure, biosynthesis and function. *Prog Lipid Res.* **2005**, 44, 235-258
- [4] Kera K, Takahashi S, Sutoh T, Koyama T, Nakayama T: Identification and characterization of a *cis,trans*-mixed heptaprenyl diphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* **2012**, 279, 20, 3813-3827
- [5] Ciepichal E, Jemiola-Rzeminska M, Hertel J, Swiezewska E, Strzalka K: Configuration of polyisoprenoids affects the permeability and thermotropic properties of phospholipid/polyisoprenoid model membranes. *Chem Phys Lipids.* **2011**, 164, 4, 300-306
- [6] Radomińska-Pyrek A, Chojnacki T, Pyrek JS: Fully unsaturated decaprenol from bovine pituitary glands. *Biochem Biophys Res Commun.* **1979**, 86, 2, 395-340
- [7] Chojnacki T, Dallner G: The biological role of dolichol. *Biochem J.* **1988**, 251,1, 1-9
- [8] Skorupińska-Tudek K, Bieńkowski T, Olszowska O, Furmanowa M, Chojnacki T, Danikiewicz W, Swiezewska E: Divergent pattern of polyisoprenoid alcohols in the tissues of *Coluriageoides*: a new electrospray ionization MS approach. *Lipids.* **2003**, 38, 9, 981-990
- [9] Skorupinska-Tudek K, Poznanski J, Wojcik J, Bienkowski T, Szostkiewicz I, Zelman-Femiak M, Bajda A, Chojnacki T, Olszowska O, Grunler J, Meyer O, Rohmer M, Danikiewicz W, Swiezewska E: Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of dolichols in plants. *J Biol Chem.* **2008**, 283, 30, 21024-21035

- [10] Rodríguez-Concepción M: Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochem Rev*, **2006**, 5, 1-15
- [11] Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J: The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Natl Acad Sci USA*, **2005**, 102, 3, 933-938
- [12] Gea X, Wu J: Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. *Plant Science*, **2005**, 168, 2, 487-491
- [13] Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, Lehle L, Hombauer H, Adamowicz M, Swiezewska E, De Brouwer AP, Blümel P, Sykut-Cegielska J, Houliston S, Swistun D, Ali BR, Dobyns WB, Babovic-Vuksanovic D, van Bokhoven H, Wevers RA, Raetz CR, Freeze HH, Morava E, Al-Gazali L, Gleeson JG: SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*. **2010**, 142, 2, 203-217
- [14] Bajda A, Chojnacki T, Hertel J, Swiezewska E, Wójcik J, Kaczkowska A, Marczewski A, Bojarczuk T, Karolewski P, Oleksyn J: Light conditions alter accumulation of long chain polyprenols in leaves of trees and shrubs throughout the vegetation season. *Acta Biochim Pol*. **2005**, 52, 1, 233-241
- [15] Bajda A, Konopka-Postupolska D, Krzymowska M, Hennig J, Skorupinska-Tudek K, Surmacz L, Wójcik J, Matysiak Z, Chojnacki T, Skorzynska-Polit E, Drazkiewicz M, Patrzylas P, Tomaszewska M, Kania M, Swist M, Danikiewicz W, Piotrowska W, Swiezewska E: Role of polyisoprenoids in tobacco resistance against biotic stresses. *Physiol Plant*. **2009**, 135, 4, 351-364
- [16] Bach TJ, Rohmer M: Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms, New Concepts and Experimental Approaches. *Springer Science+Business Media*, New York. **2013**
- [17] Janas T, Walińska K, Chojnacki T, Swiezewska E, Janas T: Modulation of properties of phospholipid membranes by the long-chain polyprenol (C(160)). *Chem Phys Lipids*. **2000**, 106, 1, 31-40

- [18] Loreto F, Pinelli P, Manes F, Kollist H: Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol.* **2004**, *24*, 4, 361-367
- [19] Sakakihara Y, Imabayashi T, Suzuki Y, Kamoshita S: Elevated levels of dolichol in the brains of mucopolysaccharidosis and related disorders. *Mol Chem Neuropathol.* **1994**, *22*, 2, 97-103
- [20] Gajjar D, Jozwiak A, Swiezewska E, Alapure B, Parmar T, Johar K, Vasavada AR: Quantification of dolichol in the human lens with different types of cataracts. *Mol Vis.* **2009**, *15*, 1573-1579
- [21] Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **1998**, *33*, 3, 151-208
- [22] Zhang H, Ohyama K, Boudet J, Chen Z, Yang J, Zhang M, Muranaka T, Maurel C, Zhu JK, Gong Z: Dolichol biosynthesis and its effects on the unfolded protein response and abiotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2008**, *20*, 7, 1879-1898
- [23] Haeuptle MA, Hennet T: Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Hum Mutat.* **2009**, *30*, 12, 1628-1641
- [24] Valtersson C, van Duyn G, Verkleij AJ, Chojnacki T, de Kruijff B, Dallner G: The influence of dolichol, dolichol esters, and dolichyl phosphate on phospholipid polymorphism and fluidity in model membranes. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5, 2742-2751
- [25] Janas T, Kuczera J, Chojnacki T, Krajewska-Rychlik I: Properties of lecithin-dodecaprenol macrovesicular bilayer membranes. *Chem Phys Lipids.* **1986**, *39*, 4, 347-355
- [26] Hartley MD, Imperiali B: At the membrane frontier: a prospectus on the remarkable evolutionary conservation of polyprenols and polyprenyl-phosphates. *Arch Biochem Biophys.* **2012**, *517*, 2, 83-97

- [27] Madeja Z, Rak M, Wybieralska E, Rozanski I, Masnyk M, Chmielewski M, Lysek R, Chojnacki T, Jankowski W, Ciepichał E, Swiezewska E, Tekle M, Dallner G: New cationic polyprenyl derivative proposed as a lipofecting agent. *Acta Biochim Pol.* **2007**, 54, 4, 873-876
- [28] Allen TM, Cullis PR: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* **2004**, 303, 5665, 1818-1822
- [29] Duncan R, Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI: Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr Relat Cancer.* **2005**, 12 Suppl 1:S189-S199
- [30] Ranade VV, Cannon JB: Drug Delivery Systems, Third Edition, *CRC Press, USA*, **2011**
- [31] Haag R, Kratz F: Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2006**, 45, 8, 1198-1215.
- [32] ur Rehman Z, Hoekstra D, Zuhorn IS: Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS Nano.* **2013**, 7, 5, 3767-3777
- [33] Mansoori MA, Agrawal S, Jawade S, Khan MI: A review on liposome. *IJARPB*, **2012**, 2, 4, 453-464
- [34] Bangham AD, Horne RW: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol.* **1964**, 8, 660-668
- [35] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K: Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* **2013**, 8, 1,102.
- [36] Kozubek A: Wstęp do technologii liposomowej. *Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław.* **2004**, 35-36

- [37] Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H: Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. **2012**, 1, 2, 147-168
- [38] Szoka F Jr, Papahadjopoulos D: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1978**, 75, 9, 4194-4198.
- [39] Zumbuehl O, Weder HG: Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochim Biophys Acta*. **1981**, 640, 1, 252-262.
- [40] Szebeni J, Breuer JH, Szelenyi JG, Bathori G, Lelkes G, Hollan SR: Oxidation and denaturation of hemoglobin encapsulated in liposomes. *Biochim Biophys Acta*. **1984**, 798, 1, 60-67
- [41] Gregoriadis G, Ryman BE: Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J*. **1971**, 124, 5, 58P
- [42] Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE: Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett*. **1971**, 14, 2, 95-99
- [43] Kobayashi T, Tsukagoshi S, Sakurai Y: Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect of cytosine arabinoside entrapped in liposomes on mouse leukemia L-1210. *Gan*. **1975**, 66, 6, 719-720
- [44] Allen TM, Cullis PR: Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. **2013**, 65, 1 36-48
- [45] Gabizon A, Peretz T, Sulkes A, Amselem S, Ben-Yosef R, Ben-Baruch N, Catane R, Biran S, Barenholz Y: Systemic administration of doxorubicin-containing liposomes in cancer patients: a phase I study. *Eur J Cancer ClinOncol*. **1989**, 25, 12, 1795-1803
- [46] Madni A, Sarfraz M, Rehman M, Ahmad M, Akhtar N, Ahmad S, Tahir N, Ijaz S, Al-Kassas R, Löbenberg R: Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Pharm Sci*. **2014**, 17, 3, 401-426

- [47] van Rooijen N, van Nieuwmegen R: Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own. *Immunol Commun.* **1980**, 9, 3, 243-256
- [48] Cullis PR: Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle membranes: effects of cholesterol and hydrocarbon phase transitions. *FEBS Lett.* **1976**, 70, 1, 223-228
- [49] Cullis PR, Hope MJ: The bilayer stabilizing role of sphingomyelin in the presence of cholesterol: a ³¹P NMR study. *Biochim Biophys Acta.* **1980**, 597, 3, 533-542
- [50] Johnston MJ, Semple SC, Klimuk SK, Edwards K, Eisenhardt ML, Leng EC, Karlsson G, Yanko D, Cullis PR: Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations. *Biochim Biophys Acta.* **2006**, 1758, 1, 55-64
- [51] Abra RM, Bosworth ME, Hunt CA: Liposome disposition in vivo: effects of pre-dosing with liposomes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **1980**, 29, 2, 349-360
- [52] Proffitt RT, Williams LE, Presant CA, Tin GW, Uliana JA, Gamble RC, Baldeschwieler JD: Liposomal blockade of the reticuloendothelial system: improved tumor imaging with small unilamellar vesicles. *Science.* **1983**, 220, 4596, 502-505
- [53] Juliano RL, Stamp D: The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* **1975**, 63, 3, 651-658
- [54] Allen TM, Chonn A: Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* **1987**, 223, 1, 42-46
- [55] Allen TM: The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv Drug Deliv Rev.* **1994**, 13, 3, 285-309
- [56] James ND, Coker RJ, Tomlinson D, Harris JR, Gompels M, Pinching AJ, Stewart JS: Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* **1994**, 6, 5, 294-296

- [57] Nevozhay D, Kańska U, Budzyńska R, Boratyński J: Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. *Postepy Hig Med Dosw.* **2007**, 61, 350-360
- [58] Bibi S, Lattmann E, Mohammed AR, Perrie Y: Trigger release liposome systems: local and remote controlled delivery? *J Microencapsul.* **2012**, 29, 3, 262-276
- [59] Eloy JO, Claro de Souza M, Petrilli R, Barcellos JP, Lee RJ, Marchetti JM: Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **2014**, 123, 345-363
- [60] Maruyama K: Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev.* **2011**, 63, 3, 161-169
- [61] Dhandapani NV, Thapa A, Sandip G, Shrestha A, Shrestha N, Bhattarai RS: Liposomes as novel drug delivery system: A comprehensive review. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **2013**, 4, 2, 187-193
- [62] Guyton AC, Hall JE: Textbook Of Medical Physiology 11th Edition. *Elsevier Inc.* Philadelphia, **2006**
- [63] Perazella MA: Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* **2009**, 4, 7, 1275-1283
- [64] Choudhury D, Ahmed Z: Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nat Clin Pract Nephrol.* **2006**, 2, 2, 80-91
- [65] Bonventre JV, Vaidya VS, Schmouder R, Feig P, Dieterle F: Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat Biotechnol.* **2010**, 28, 5, 436-440
- [66] Pazhayattil GS, Shirali AC: Drug-induced impairment of renal function. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* **2014**, 7, 457-468
- [67] Aleksa K, Matsell D, Krausz K, Gelboin H, Ito S, Koren G: Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol.* **2005**, 20, 7, 872-885

- [68] Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* **2001**, 69, 3, 89-95
- [69] Mischak H, Delles C, Vlahou A, Vanholder R: Proteomic biomarkers in kidney disease: issues in development and implementation. *Nat Rev Nephrol.* **2015** [Epub ahead of print]
- [70] Mutlib AE, Gerson RJ, Meunier PC, Haley PJ, Chen H, Gan LS, Davies MH, Gemzik B, Christ DD, Krahn DF, Markwalder JA, Seitz SP, Robertson RT, Miwa GT: The species-dependent metabolism of efavirenz produces a nephrotoxic glutathione conjugate in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2000**, 169, 1, 102-113
- [71] van Meer L, Moerland M, Cohen AF, Burggraaf J: Urinary kidney biomarkers for early detection of nephrotoxicity in clinical drug development. *Br J Clin Pharmacol.* **2014**, 77, 6, 947-957
- [72] Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R: Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* **2008**, 2008:pdb.prot4986. doi: 10.1101/pdb.prot4986.
- [73] Waikar SS, Liu KD, Chertow GM: Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* **2008**, 3, 3, 844-861
- [74] Lopez-Giacoman S, Madero M: Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J Nephrol.* **2015**, 4, 1, 57-73
- [75] Waikar SS, Betensky RA, Bonventre JV: Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies? *Nephrol Dial Transplant.* **2009**, 24, 11, 3263-3265
- [76] Traczyk W, Trzebski A: Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. Wydanie III. PZWL, Warszawa. **2001**
- [77] Gaspari F, Perico N, Remuzzi G: Application of newer clearance techniques for the determination of glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **1998**, 7, 6, 675-680
- [78] Levey AS, Inker LA, Coresh J: GFR estimation: from physiology to public health. *Am J Kidney Dis.* **2014**, 63, 5, 820-834

- [79] Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. **1976**, 16, 1, 31-41
- [80] Hunsicker LG, Adler S, Caggiula A, England BK, Greene T, Kusek JW, Rogers NL, Teschan PE: Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int*. 1997, 51, 6, 1908-1919
- [81] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med*. **1999**, 130, 6, 461-470
- [82] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, Feldman HI, Froissart M, Kusek J, Rossert J, Van Lente F, Bruce RD 3rd, Zhang YL, Greene T, Levey AS: Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3,418 individuals with CKD. *Am J Kidney Dis*. **2008**, 51, 3, 395-406
- [83] Boudonck KJ, Rose DJ, Karoly ED, Lee DP, Lawton KA, Lapinskas PJ: Metabolomics for early detection of drug-induced kidney injury: review of the current status. *Bioanalysis*. **2009**, 1, 9, 1645-1663
- [84] Dyer AR, Greenland P, Elliott P, Daviglius ML, Claeys G, Kesteloot H, Ueshima H, Stamler J; INTERMAP Research Group: Evaluation of measures of urinary albumin excretion in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*. **2004**, 160, 11, 1122-1131
- [85] Chavan VU, Sayyed AK, Durgawale PP, Sontakke AV, Nilakhe SD: Practical Aspects of Calculation, Expression and Interpretation Of Urine Albumin Measurement. *Natl J Integr Res Med*. **2011**, 2,1, 29-34
- [86] Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV: Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2008**;48, 463-493
- [87] Charlton JR, Portilla D, Okusa MD: A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant*. 2014, 29, 7, 1301-1311
- [88] Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A: Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*. **2004**, 66, 3, 1115-1122

- [89] Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G: Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* **2002**, 40, 2, 221-226
- [90] Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, Kusek JW, Manzi J, Van Lente F, Zhang YL, Coresh J, Levey AS; CKD-EPI Investigators: Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med.* **2012**, 367, 1, 20-29
- [91] Uchida K, Gotoh A: Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta.* **2002**, 323, 1-2, 121-128
- [92] Herget-Rosenthal S, van Wijk JA, Bröcker-Preuss M, Bökenkamp A: Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate. *Clin Biochem.* **2007**, 40, 13-14, 946-951
- [93] Fuchs TC, Frick K, Emde B, Czasch S, von Landenberg F, Hewitt P. Evaluation of novel acute urinary rat kidney toxicity biomarker for subacute toxicity studies in preclinical trials. *Toxicol Pathol.* **2012**, 40, 7, 1031-1048
- [94] Navar LG: Regulation of Renal Hemodynamics. *Adv Physiol Educ.* **1998**, 275, 6, 221-235
- [95] Naughton CA: Drug-induced nephrotoxicity. *Am Fam Physician.* **2008**, 78, 6, 743-750
- [96] Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM: Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management. *Drug Saf.* **1999**, 21, 6, 471-488
- [97] Caiazza A, Russo L, Sabbatini M, Russo D: Hemodynamic and tubular changes induced by contrast media. *Biomed Res Int.* **2014**, 2014: 578974, stron 7
- [98] Vande Walle J, Stockner M, Raes A, Nørgaard JP: Desmopressin 30 years in clinical use: a safety review. *Curr Drug Saf.* **2007**, 2, 3, 232-238

- [99] Holmes CL, Landry DW, Granton JT: Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care*. **2003**, 7, 6, 427-434
- [100] Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Günther G, Rosenthal W, Vischer UM: Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2R receptors and cAMP. *J Clin Invest*. **2000**, 106, 1, 107-116
- [101] Wilson JL, Miranda CA, Knepper MA: Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin Exp Nephrol*. **2013**, 17, 6, 751-764
- [102] Gonen T, Walz T: The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys*. **2006**, 39, 4, 361-396
- [103] Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA: Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*. **2002**, 82, 1, 205-244
- [104] Boone M, Deen PM: Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch*. **2008**, 456, 6, 1005-1024
- [105] Friedman FM, Weiss JP: Desmopressin in the treatment of nocturia: clinical evidence and experience. *Ther Adv Urol*. **2013**, 5, 6, 310-317
- [106] Eckford SD, Swami KS, Jackson SR, Abrams PH: Desmopressin in the treatment of nocturia and enuresis in patients with multiple sclerosis. *Br J Urol*. **1994**, 74, 6, 733-735
- [107] Mannucci PM: Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. *Blood*. **1997**, 90, 7, 2515-2521
- [108] Favalaro EJ, Bodó I, Israels SJ, Brown SA: von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia*. **2014**, 20, 59-64
- [109] Gleiter CH, Mörike KE: Clinical pharmacokinetics of candesartan. *Clin Pharmacokinet*. **2002**, 41, 1, 7-17
- [110] Atlas SA: The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. **2007**, 13, 9-20

- [111] van Lier JJ, van Heiningen PN, Sunzel M: Absorption, metabolism and excretion of ¹⁴C-candesartan and ¹⁴C-candesartan cilexetil in healthy volunteers. *J Hum Hypertens*. **1997**, 11, 2, 27-28
- [112] Khawaja Z, Wilcox CS: An overview of candesartan in clinical practice. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. **2011**, 9, 8, 975-982
- [113] Dubourg L, Hadj-Aïssa A, Ferrier B: Adaptation of an enzymatic polyfructosan assay to clinical practice. *Anal Biochem*. **2010**, 405, 2, 266-268
- [114] Nolin TD, Colaizzi IV, Palevsky PM, Matzke GR, Frye RF: Rapid microtiter plate assay for determination of inulin in human plasma and dialysate. *J Pharm Biomed Anal*. **2002**, 28, 209-215
- [115] Hoffman WP, Ness DK, van Lier RB: Analysis of rodent growth data in toxicology studies. *Toxicol Sci*. **2002**, 66, 2, 313-319
- [116] Maitani Y, Hazama M, Tojo H, Qi XR, Nagai T: Effects of orally administered liposomes with soybean-derived sterols and their glucosides on rat body weight. *Biol Pharm Bull*. **1995**, 18, 11, 1551-1555.
- [117] http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/sprague_dawley_outbred_rat.html
- [118] Petterino C, Argentino-Storino A: Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exp Toxicol Pathol*. 2006, 57, 3, 213-219
- [119] Henry JP, Liu YY, Nadra WE, Qian CG, Mormede P, Lemaire V, Ely D, Hendley ED: Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. *Hypertension*. **1993**, 21, 714-723
- [120] Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Hallé JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, Yusuf S; HOPE Study Investigators: Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*. **2001**, 286, 4, 421-426

- [121] Tojo A, Kinugasa S: Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol.* **2012**, 481520
- [122] Kohei U, Kazo K, Osamu H, Norikuni K, Sumiya E: Acute and chronic effects of thromboxane A2 inhibition on the renal hemodynamics in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int.* **1994**, 45, 794–802
- [123] Lu L, Peng W, Wei W, Wang L, Chen Q, Shen W: Effects of atorvastatin on progression of diabetic nephropathy and local RAGE and soluble RAGE expressions in rats. *Biomed & Biotechnol.* **2011**, 12, 8, 652–659
- [124] Borgonio A, Witte K, Stahrenberg R, Lemmer B: Influence of circadian time, ageing, and hypertension on the urinary excretion of nitric oxide metabolites in rats. *Mech Ageing Dev.* **1999**, 111, 23–37
- [125] Herrera M, Garvin JL: Recent Advances in the Regulation of Nitric Oxide in the Kidney. *Hypertension.* **2005**, 45, 1062–1067
- [126] Kannan MS, Guiang S, Johnson DE. Nitric oxide: biological role and clinical uses. *Indian J Pediatr.* **1998**, 65, 3, 333–345
- [127] Tsikas D: Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.* **2005**, 39, 8, 797–815
- [128] Bentinger M, Tekle M, Brismar K, Chojnacki T, Swiezewska E, Dallner G: Polyisoprenoid epoxides stimulate biosynthesis of CoQ and inhibit cholesterol synthesis. *J BiolChem.* **2008**, 283, 14645–14653
- [129] Olszyński KH: Modyfikacja czynności i struktury nerki w zależności od wysokiej podaży sodu – udział wybranych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Rozprawa doktorska. Warszawa. **2013**
- [130] Filion MC, Phillips NC: Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys Acta.* **1997**, 1329, 2, 345–356
- [131] Filion MC, Phillips NC: Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. *Int J Pharm.* **1998**, 162, 159–170

- [132] Sellers RS, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, Perry R, Schafer K: Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *J Toxicol Pathol.* **2007**, 35, 5, 751-755
- [133] Piao Y, Liu Y, Xie X: Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. *J Toxicol Pathol.* **2013**, 26, 1, 29-34
- [134] Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, Johnson JK, Schafer K, Pitsch S: Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol Pathol.* **2007**, 35, 5, 742-750
- [135] Greaves P: Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation. *Elsevier Science*, Amsterdam. **2000**
- [136] Vickers AE, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P: Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. *Toxicol Pathol.* **2004**, 32, 5, 577-590
- [137] Gross ML, Ritz E, Schoof A, Adamczak M, Koch A, Tulp O, Parkman A, El-Shakmak A, Szabo A, Amann K: Comparison of renal morphology in the Streptozotocin and the SHR/N-cp models of diabetes. *Lab Invest.* **2004**, 84, 4, 452-464
- [138] Gardin JM, Lauer MS. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *JAMA.* **2004**, 292, 19, 2396-2398
- [139] Meijs MF, Bots ML, Voncken EJ, Cramer MJ, Melman PG, Velthuis BK, van der Graaf Y, Mali WP, Doevendans PA: Rationale and design of the SMART Heart study: A prediction model for left ventricular hypertrophy in hypertension. *Neth Heart J.* **2007**, 15, 9, 295-298
- [140] McAdams RM, McPherson RJ, Dabestani NM, Gleason CA, Juul SE. Left ventricular hypertrophy is prevalent in Sprague-Dawley rats. *Comp Med.* **2010**, 60, 5, 357-363

- [141] Clifford CB, Pritchett-Corning K, Mulder GB: Left ventricular hypertrophy is prevalent in sprague-dawley rats. *Comp Med.* **2011**, *61*, 1, 11-12; *author reply 12*
- [142] <http://www.fda.gov/>
- [143] Wang J, Shen D, Shen WC: Preparation, purification, and characterization of a reversibly lipidized desmopressin with potentiated anti-diuretic activity. *Pharm Res.* **1999**, *16*, 11, 1674-1679
- [144] Law SL, Huang KJ, Chou HY: Preparation of desmopressin-containing liposomes for intranasal delivery. *J Control Release.* **2001**, *70*, 3, 375-382
- [145] Dehoorne JL, Raes AM, van Laecke E, Hoebeke P, Vande Walle JG: Desmopressin toxicity due to prolonged half-life in 18 patients with nocturnal enuresis. *J Urol.* **2006**, *176*, 2, 754-757
- [146] van Zwieten PA: Drug treatment of isolated systolic hypertension. *Nephrol Dial Transplant.* **2001**, *16*, 6, 1095-1097
- [147] Safar ME, Rudnichi A, Asmar R. Drug treatment of hypertension: the reduction of pulse pressure does not necessarily parallel that of systolic and diastolic blood pressure. *J Hypertens.* **2000**, *18*, 9, 1159-1163
- [148] Wang JG, Staessen JA, Franklin SS, Fagard R, Gueyffier F: Systolic and diastolic blood pressure lowering as determinants of cardiovascular outcome. *Hypertension.* **2005**, *45*, 5, 907-913
- [149] Barbuto N, Almeida JR, Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA: Renal cortex remodeling in nitric oxide deficient rats treated with enalapril. *J Cell Mol Med.* **2004**, *8*, 1, 102-108
- [150] Cao J, Inoue K, Sodhi K, Puri N, Peterson SJ, Rezzani R, Abraham NG: High-fat diet exacerbates renal dysfunction in SHR: reversal by induction of HO-1-adiponectin axis. *Obesity (Silver Spring).* **2012**, *20*, 5, 945-953

- [151] Kim SW, Wang W, Kwon TH, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S: Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2005**, 289, 5, 957-968
- [152] Pinto V, Pinho MJ, Silva E, Simão S, Igreja B, Afonso J, Serrão MP, Gomes P, Soares-da-Silva P: Long-term food restriction attenuates age-related changes in the expression of renal aldosterone-sensitive sodium transporters in Wistar-Kyoto rats: a comparison with SHR. *Exp Gerontol.* **2012**, 47, 8, 644-653
- [153] Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R: Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Frömter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J Am Soc Nephrol.* **2007**, 18, 1, 113-121
- [154] Keppler A, Gretz N, Schmidt R, Kloetzer HM, Groene HJ, Lelongt B, Meyer M, Sadick M, Pill J: Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int.* **2007**, 71, 1, 74-78
- [155] Palm M, Lundblad A: Creatinine concentration in plasma from dog, rat, and mouse: a comparison of 3 different methods. *Vet Clin Pathol.* **2005**, 34, 3, 232- 236
- [156] Skov K, Mogensen S, Michael J Mulvany MJ: Persistent effect of treatment with candesartan cilexetil on blood pressure in spontaneously hypertensive rats: *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2001**, 2, 1, 91-94
- [157] Garrett MR, Joe B, Yerga-Woolwine S: Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. *Physiol Genomics.* **2006**, 25, 1, 39-49
- [158] Panzacchi G, Pieruzzi F, Castoldi G, Busca G, Bolla GB, Buccianti G, Radice F, Fava C, Martini I, Zanchetti A, Golin R, Stella A: Effects of erythropoietin administration on blood pressure and urinary albumin excretion in rats. *Am J Hypertens.* **1997**, 10, 7, 772-778

- [159] Feld LG, Cachero S, Van Liew JB, Zamlauski-Tucker M, Noble B: Enalapril and renal injury in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. **1990**, 16, 5, 544-554
- [160] Komatsu K, Frohlich ED, Ono H, Ono Y, Numabe A, Willis GW: Glomerular dynamics and morphology of aged spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*. **1995**, 25, 2, 207-213
- [161] Linz W, Becker RH, Schölkens BA, Wiemer G, Keil M, Langer KH: Nephroprotection by long-term ACE inhibition with ramipril in spontaneously hypertensive stroke prone rats. *Kidney Int*. **1998**, 54, 6, 2037-2044
- [162] http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/spontaneously_hypertensive_inbred_rat/shrnhsd/us.hl
- [163] Zhou XJ, Vaziri ND, Zhang J, Wang HW, Wang XQ: Association of renal injury with nitric oxide deficiency in aged SHR: prevention by hypertension control with AT1 blockade. *Kidney Int*. **2002**, 62, 3, 914-921
- [164] Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP: Decline in renal hemodynamic function in aging SHR: role of androgens. *Hypertension*. **1997**, 30, 3, 677-681
- [165] Inoue BH, Arruda-Junior DF, Campos LC, Barreto AL, Rodrigues MV, Krieger JE, Girardi AC: Progression of microalbuminuria in SHR is associated with lower expression of critical components of the apical endocytic machinery in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. **2013**, 305, 2, 216-226
- [166] Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ: Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. **1994**, 12, 12, 1373-1376
- [167] Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B: Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens*. **2008**, 26, 3, 381-391

- [168] Rodríguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, Bonet L, Chávez M, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, Pons HA: Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* **2002**, 282, 2, F191-201
- [169] Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A: The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* **2007**, 59, 3, 251-287
- [170] Jakobsson A, Swiezewska E, Chojnacki T, Dallner G: Uptake and modification of dietary polyprenols and dolichols in rat liver. *FEBS Lett.* **1989**, 255, 1, 32-36
- [171] Bergamini E, Bizzarri R, Cavallini G, Cerbai B, Chiellini E, Donati A, Gori Z, Manfrini A, Parentini I, Signori F, Tamburini I: Ageing and oxidative stress: a role for dolichol in the antioxidant machinery of cell membranes? *J Alzheimers Dis.* **2004**, 6, 2, 129-135