

POLSKA AKADEMIA NAUK  
INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
IM. MIROŚŁAWA MOSSAKOWSKIEGO

**PRACOWNIA FIZJOLOGII NEREK I PŁYNÓW  
USTROJOWYCH**

**Marta Kuczeriszka**



25 294

44219

**Tlenek azotu a pochodne kwasu arachidonowego w  
metabolizmie zależnym od CYT P-450 w nerce szczura –  
korelacja z ukrwieniem i czynnością wydalniczą nerki w  
zależności od podaży sodu w diecie**

*Rozprawa doktorska*

Promotor:  
Doc.dr hab. n. med. Elżbieta Kompanowska-Jeziarska

**Warszawa 2008**



*Spośród wszystkich, którzy wspierali mnie w czasie pracy nad rozprawą szczególne podziękowania należą się mojej promotor, Doc. Elżbiecie Kompanowskiej-Jezińskiej. Chciałabym także podziękować Bożenie Bądryńskiej za konstruktywną krytykę oraz wszechstronną pomoc.*

*Panu profesorowi Januszowi Sadowskiemu za wyrozumiałość, oraz wszystkim dzięki uprzejmości których praca ta mogła powstać.*



**WSTĘP**

1.1. Rola nerek w regulacji składu i objętości płynów ustrojowych	9
1.2. Rola nerek w regulacji ciśnienia krwi	13
1.3 Zmiany podaży sodu – wpływ na czynność nerki i ciśnienie tętnicze krwi	18
1.4 Tlenek azotu w organizmie	20
1.4.1. Syntazy tlenku azotu	22
1.4.2 Działanie <i>NO</i> na czynność nerki	28
5. Szlaki metaboliczne kwasu arachidonowego	30
Szlak monooksygenacji zależnej od CYP-450	34
Szlak epoksygenacji zależnej od CYP-450	35
Szlak $\omega$ -hydroksylacji zależnej od CYP-450	39

**CEL PRACY**

46

**MATERIAŁ I METODY**

3.1 Materiał doświadczalny	47
Wstępne przygotowanie zwierząt	47
Doświadczenia ostre: przygotowanie chirurgiczne	52
Pomiary ukrwienia nerki	53
Pomiary tlenku azotu ( <i>NO</i> ) w nerce In situ	53
Przebieg doświadczenia ostrego	54
3.2 Protokoły doświadczeń	56
3.2.1 Wpływ ostrej blokady NOS na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki	56
3.2.2 wpływ ostrej blokady monooksygenacji CYP-450 na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki	58
3.3 Metody analityczne i obliczenia	60
3.3.1 Analiza statystyczna	61



**WYNIKI**

4.1 Wpływ diet o różnej zawartości sodu na średnie ciśnienie krwi oraz na parametry hemodynamiczne i czynność wydalnicza nerki	62
4.2 Wpływ chronicznego zablokowania syntaz tlenku azotu (NOS) na średnie ciśnienie krwi, parametry hemodynamiczne i czynność wydalnicza nerki	66
4.3 Wpływ chronicznego zablokowania szlaku monoooksygenacji kwasu arachidonowego zależnej od cytochromu P-450 na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki	71
4.4 Wpływ ostrego zablokowania syntaz tlenku azotu na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki	76
4.4.1 Wpływ L-NAME na tle diety standardowej	76
4.4.2 Wpływ L-NAME na tle diety niskosodowej	80
4.4.3 Wpływ L-NAME na tle diety wysokosodowej	86
4.5 Wpływ ostrego zablokowania enzymów CYP-450 na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki	91
4.5.1 Wpływ ABT na tle diety standardowej	91
4.5.2 Wpływ ABT na tle diety niskosodowej	95
4.5.3 Wpływ ABT na tle diety wysokosodowej	98
4.6 Podsumowanie wyników	103

**DYSKUSJA**

5.1 Uwagi metodyczne	108
5.1.1 Dobór długości diety	108
5.1.2 Dobór dawki i drogi podawania stosowanych przewlekle inhibitorów	108
5.2 Sód w diecie oraz aktywność szlaków NOS i CYP-450 – czynniki modyfikujące MAP i parametry czynności nerek	111
5.2.1 Czynniki kształtujące ciśnienie krwi na diecie wysokosodowej	113
5.2.2 Ukrwienie rdzenia nerki a podaż sodu – uderzający brak zależności. Wstępne wyniki z blokowania NOS i CYP-450	119
5.2.3 Podaż sodu a wydalanie nerkowe	125
5.2.4 NOS i CYP-450 w kontroli ciśnienia krwi	131
5.2.5 Modyfikacje interakcji NOS i CYP-450 przez dietę niskosodową	136



***-SPIS TREŚCI-***

5

**PODSUMOWANIE I WNIOSKI**

140

**PIŚMIENNICTWO**

142



**INDEKS SKRÓTÓW**

20-HETE – kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy

7NI - 7-nitroindazol, względnie selektywny inhibitor nNOS

AA – kwas arachidonowy (*ang. Arachidonic Acid*)

ADH - hormon antydiuretyczny (wazopresyna, VP)

ADP – adenzyno 5'-difosforan

Ang II - angiotensyna II

ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny

AQP 2 – akwaporyna 2

AT1 – receptor dla angiotensyny II

ATP - adenzyno 5'-trifosforan

ATP-aza  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  – pompa sodowo-potasowa

$\text{BH}_4\text{-(6R)-5,6,7,8}$  - tetrahydrobiopteryna

BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny

cAMP - cykliczny adenzynomonofosforan

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

cGMP - cykliczny guanozynomonofosforan

COX 1 – konstytutywna syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego,  
cyklooksygenaza kwasu arachidonowego

COX 2 – indukowana syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego, cyklooksygenaza  
kwasu arachidonowego

COX 3 – syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego,

CYP-450 – cytochrom P-450

DOCA – octan deoksykortykosteronu

EDHF – czynnik hiperpolaryzacyjny pochodzenia śródbłonkowego, (*ang. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*)

EETs – kwasy epoksyekozatrienowe

EP1 – receptor dla  $\text{PGE}_2$ , za pośrednictwem którego  $\text{PGE}_2$  hamuje transport kanalikowy

EP2 i EP4 – receptory za pośrednictwem, których  $\text{PGE}_2$  powoduje rozszerzenie naczyń  
krwionośnych

EP3 – receptor dla  $\text{PGE}_2$  za pośrednictwem którego  $\text{PGE}_2$  powoduje zwężenie naczyń  
krwionośnych



- eNOS - śródbłonkowa izoforma syntazy tlenku azotu (NOS III)
- FAD - dinukleotyd flawinoadeninowy
- FMN - mononukleotyd flawinoadeninowy
- GFR - tempo filtracji kłębuszkowej (*ang. Glomerular Filtration Rate*)
- IMCD – kanalik zbiorczy położony w rdzeniu wewnętrznym (*ang. Inner Medullary Collecting Duct*)
- iNOS – indukowana izoforma syntazy tlenku azotu (NOS II)
- ISO-NOP200 - sonda do pomiaru *NO* w rdzeniu nerki (średnica 200µm)
- L-NAME – ester metylowy nitro-L-argininy, nieselektywny inhibitor syntezy *NO*
- L-type  $K_{Ca}$  channel/  $BK_{Ca}$  – kanał potasowy aktywowany wapniem
- MD – plamka gęsta aparatu przykłębuszkowego (*Macula Densa*)
- MBF – przepływ krwi przez rdzeń nerki (*ang. Medullary Blood Flow*)
- MAP – średnie ciśnienie krwi (*ang. Mean Arterial Pressure*)
- mRNA – messenger RNA, informacyjny RNA
- mTAL – rdzeniowy odcinek grubego wstępującego ramienia pętli Henlego (*ang. Medullary Thick Ascending Limb of Henle's Loop*)
- NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (forma zredukowana)
- NANC – włókna nerwowe nie wydzielające na swoich zakończeniach ani noradrenaliny, ani acetolocholiny, np. tzw. włókna nitrergiczne, (*ang. non-adrenergic, non-cholinergic*)
- NMDA – receptor metabotropowy związany z kanałem wapniowym
- nNOS – neuronalna izoforma syntazy tlenku azotu (NOS I)
- NO* – tlenek azotu (*ang. Nitric Oxide*)
- ONNO<sup>-</sup> - nadtlenoazotyn, peroksynitryt, (*ang. peroxy nitrite*)
- PGE<sub>2</sub> – prostaglandyna E<sub>2</sub>
- RAAS – układ renina-angiotenyna-aldosteron (*ang. Renin-Angiotensin-Aldosterone System*)
- RBF – całkowity przepływ krwi przez nerkę (*ang. Renal Blood Flow*)
- RPP – ciśnienie perfuzyjne nerki (*ang. Renal Perfusion Pressure*)
- SHR – szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie tętnicze (*ang. Spontaneously Hypertensive Rats*)
- TGF – kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne (*ang. Tubulo-Glomerular Feedback*)
- TXA<sub>2</sub> – trombosan A<sub>2</sub>
- PGI<sub>2</sub> – prostaglandyna I<sub>2</sub>, prostacyklina
- PGF<sub>2α</sub> - prostaglandyna 2α
- PGD<sub>2</sub> – prostaglandyna D<sub>2</sub>



LT – leukotrieny

HPETE – kwasy hydroperoksyekozatetraenowe

$U_{Na}V$  – wydalanie sodu

$U_{osm}V$  – wydalanie substancji osmotycznie czynnych



## **WSTĘP**

### **1.1. Rola nerek w regulacji składu i objętości płynów ustrojowych**

Nerki spełniają w organizmie trzy zasadnicze funkcje: wydalniczą, regulacyjną i endokrynną. Funkcja wydalnicza nerek sprowadza się do usuwania z organizmu końcowych produktów przemiany materii (zwłaszcza przemiany azotowej) oraz nieprzyswajalnych lub toksycznych substancji pochodzenia egzogennego. Funkcja regulacyjna nerek polega na utrzymaniu homeostazy wodno-elektrolitowej tj. stałej objętości wody w organizmie, stężenia poszczególnych elektrolitów, ciśnienia osmotycznego płynów ustrojowych, oraz stężenia jonów wodorowych. Znaczenie nerek w utrzymaniu stałości środowiska wewnętrznego wynika z ich zdolności do wybiórczego wydalania jednych, a zatrzymywania innych elektrolitów oraz wody. Funkcja endokrynną nerek sprowadza się do produkcji hormonów lub ich prekursorów, a także do degradacji hormonów bądź innych biologicznie aktywnych substancji.

Nerki pełnią swoje funkcje pod kontrolą czynników pochodzących spoza nerki (bodźce humoralne i nerwowe) oraz w sposób autonomiczny (syntetyzując miejscowo działające regulatory).

Nerka jest jednym z lepiej unerwionych narządów. W nerwach nerkowych wyraźnie przeważają włókna adrenergiczne układu współczulnego a ich stymulacja powoduje, poprzez receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne, nasilenie resorpcji sodu w kanaliku proksymalnym i dystalnym, oraz obniżenie całkowitego przepływu krwi przez nerkę (ang. Renal Blood Flow, RBF); wpływa także na wielkość filtracji kłębuszkowej (ang. Glomerular Filtration Rate, GFR).



Stymulacja receptorów  $\beta$ -adrenergicznych w aparacie przykłębuszkowym powoduje wzrost sekrecji reniny i aktywację układu renina-angiotensyna-aldosteron (ang. Renin-Angiotensin-Aldosteron System, RAAS). Obok nerwów nerkowych wyraźny wpływ na czynność nerek wykazują krążące hormony: angiotensyna II (Ang II), aldosteron oraz wazopresyna (VP lub inaczej hormon antydiuretyczny - ADH). Uczestniczą one głównie w procesach transportowych zachodzących w kanalikach nerkowych. Ang II i aldosteron są odpowiedzialne za zwrotne wchłanianie sodu, natomiast wazopresyna kontroluje reabsorpcję wody i jest odpowiedzialna za utrzymanie bilansu płynów. Zarówno Ang II jak i wazopresyna wykazują silne działanie naczyniokurczące.

Zmiany ciśnienia osmotycznego krwi są sygnalizowane przez tzw. osmoreceptory podwzgórza, które pobudzają przysadkę do wydzielania VP. Wazopresyna jest czynnikiem stymulującym wbudowywanie akwaporyny 2 (AQP2) w błonę komórkową od strony światła kanalika w jego części dystalnej i zbiorczej, co powoduje wzrost jego przepuszczalności dla wody i w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia objętości wydalanego moczu.

Na mineralny skład moczu wpływają hormony nadnerczy – mineralokortykoidy, głównie aldosteron. Zwiększa on wchłanianie zwrotne sodu w kanalikach dystalnych oraz jego wymianę na jon potasu i jon wodorowy, co doprowadza do zwiększenia zawartości sodu we krwi i tkankach. Wzrost stężenia sodu w różnych przestrzeniach płynów ustrojowych powoduje wzrost ich ciśnienia osmotycznego, a to pociąga za sobą zwiększenie wydzielania wazopresyny, retencję wody i przywrócenie prawidłowego ciśnienia osmotycznego płynów ustrojowych. Jednak wraz ze wzrostem ich objętości pojawia się tendencja do podwyższenia wartości ciśnienia tętniczego krwi.

Nerki również w sposób autonomiczny uczestniczą w regulacji składu i objętości płynów ustrojowych. Dzieje się to dzięki działaniu specyficznych wewnątrznerkowych



mechanizmów, do których można zaliczyć: autoregulację przepływu krwi przez nerkę, równowagę kłębuszkowo-kanalikową oraz kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne (ang. Tubulo-Glomerular Feedback, TGF).

Również substancje parakryne, powstające lokalnie w nerce, m.in.: renina – enzym niezbędny do powstania Ang II, endoteliny, *NO*, eikozanoidy: prostaglandyny, tromboksany, produkty metabolizmu zależnego od cytochromu P-450 ( np. EET, 20-HETE) wpływają na ukrwienie i czynność nerek.

Działania poszczególnych czynników są często przeciwstawne; wiadomo, że np. kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy (20-HETE) i endotelina wykazują silne działanie naczyniokurczące, podczas gdy niektóre związki z grupy kwasy epoksyekozatrienowe (EET) i *NO* wykazują silne działanie naczyniorozszerzające. Pośród wspomnianych metabolitów kwasu arachidonowego obserwuje się antagonistyczne działanie w obrębie naczyń, natomiast w obrębie kanalików nerkowych wykazują one synergistyczne działanie natriuretyczne. Tlenek azotu działa naczyniorozszerzająco oraz wpływa na transport sodu i wody. Wielu autorów uważa, że *NO* działa natriuretyczne, jednak istnieją również dane potwierdzające zarówno antynatriuretyczne jak i antydiuretyczne efekty działania tlenu azotu (Bouley, 2000; Martin, 2002).

Prawidłowa czynność nerek uwarunkowana jest należywym ich ukrwieniem. Zaopatrzenie w krew poszczególnych części nerki nie jest jednakowe. Kora nerki jest znacznie silniej ukrwiona niż rdzeń; tylko ok. 20% krwi dopływającej do nerki przepływa przez rdzeń, co po uwzględnieniu jego masy daje około pięciokrotnie mniejsze ukrwienie rdzenia niż kory nerki. Wymienione wyżej czynniki parakryne i hormonalne wydają się mieć istotny wpływ na wewnątrznerkowy rozdział ukrwienia.

Jak już wspomniano istnieją specyficzne wewnątrznerkowe mechanizmy wpływające na regulację objętości i składu płynów ustrojowych. Pierwszym z nich jest autoregulacja



przepływu krwi przez nerkę. Zjawisko autoregulacji występuje w wielu łożyskach naczyniowych, ale w nerkach wyrażona jest ona najsilniej i ma kluczowe znaczenie dla funkcji narządu. Dzięki zmianom średnicy tętniczek doprowadzających kłębuszków, przepływ krwi przez nerkę jest utrzymywany na stałym poziomie w zakresie ciśnień panujących w tętnicy nerkowej pomiędzy 80 a 180 mmHg. Autoregulacja RBF uniezależnia hemodynamikę nerek od wahań ciśnienia tętniczego krwi; przy braku autoregulacji każdemu wzrostowi ciśnienia towarzyszyłby nie tylko wzrost RBF, ale także wzrost filtracji oraz wydalania wody i elektrolitów. Także mechanizmy regulujące filtrację kłębuszkową, np. kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne wtórnie przyczyniają się do autoregulacji przepływu.

Warto podkreślić, że rdzeń nerki coraz częściej uważany jest za istotny obszar odgrywający ważną rolę w regulacji ciśnienia krwi. Wiadomo, że ukrwienie rdzenia podlega zjawisku autoregulacji w dużo mniejszym stopniu niż całkowite ukrwienie nerki. Mattson i Cowley (2003) sugerują, że obniżenie przepływu krwi przez rdzeń nerki (ang. Medullary Blood Flow, MBF) o 15-30% prowadzi do rozwoju nadciśnienia. Należy także wspomnieć, że poza wymienionymi czynnikami humoralnymi i parakrynnymi, wpływ na ukrwienie rdzenia nerki ma także tonicznosc jego śródmiaższu *per se* (Dobrowolski i wsp. 2000).

Drugim specyficznym dla nerki mechanizmem regulującym jej czynność jest kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne. Jest to proces, w którym komórki płamki gęstej grubego ramienia wstępującego pętli Henlego stykające się z komórkami bieguna naczyniowego tego samego nefronu, reagują na zmiany stężenia NaCl dopływającego do tego odcinka kanalika, wywołując zmiany średnicy tętniczki doprowadzającej. Zwiększenie tzw. ładunku dystalnego sodu docierającego do komórek płamki gęstej powoduje skurcz tętniczki doprowadzającej oraz zmniejszenie przepływu krwi przez kłębuszek i zmniejszenie filtracji.



Zjawisko tzw. równowagi kłębuszkowo-kanalikowej polega na zachowaniu stałego stosunku objętości przesączonej w kłębuszkach nerkowych do objętości zresorbowanej w kanaliku bliższym. Przy zmianach filtracji kłębuszkowej resorpcja zwiększa się lub zmniejsza w sposób proporcjonalny tak, że nadal ok. 70% przesączu ulega wchłonięciu. Zjawisko to zapobiega większym wahaniom objętości płynu nie zresorbowanego w kanaliku bliższym i dostarczonego do kanalika dalszego.

Już ten bardzo krótki przegląd pokazuje, że budowa nerki, oraz wspomniane mechanizmy regulacyjne umożliwiają bardzo precyzyjną kontrolę wydalania sodu i objętości płynu pozakomórkowego przez ten narząd. W warunkach fizjologicznych objętość krwi utrzymywana jest na stałym poziomie w wyniku zrównoważenia ilości spożytych i wydalanych przez nerkę płynów i sodu. Jak wiadomo, objętość krwi krążącej i opór naczyniowy są głównymi czynnikami określającymi wielkość ciśnienia tętniczego krwi.

## **1.2. Rola nerek w regulacji ciśnienia krwi**

Dominująca rola nerki w kontroli ciśnienia krwi jest od wielu lat forsowana przez Guytona i zwolenników jego teorii, w myśl której wzrost ciśnienia krwi umożliwia zwiększenie wydalania chlorku sodu (NaCl) i wody przez nerkę z następczym zmniejszeniem objętości wewnątrznaczyniowej, prowadząc do normalizacji ciśnienia. Nawet niewielkie zmiany ciśnienia powodują znaczne wahania w wydalaniu, co w warunkach fizjologicznych stanowi mechanizm zabezpieczający stałość objętości wewnątrznaczyniowej i ciśnienia krwi. Zjawisko to określane jest nazwą diurezy i natriurezy z nadciśnienia (ang. pressure diuresis and pressure natriuresis).

Spełnienie zadań regulacyjnych przez nerkę jest możliwe dzięki ogromnym zdolnościom adaptacyjnym tego narządu. Wyrazem tych możliwości jest wydalanie przez



nerki różnych objętości moczu o zróżnicowanym składzie, zależnie od aktywności organizmu, składu pobieranego pokarmu oraz dostawy wody. Utrata tych zdolności występuje także w niewydolności nerek, co prowadzi między innymi do rozwoju nadciśnienia a także zaburzeń czynności wielu innych narządów.

Według Guytona, u podłoża nadciśnienia pierwotnego mogą leżeć zaburzenia mechanizmów nerkowego wydalania chlorku sodu i wody. Zmniejszenie ich wrażliwości wymaga przestawienia ciśnienia krwi na wyższy poziom, umożliwiając przywrócenie normalnej zależności między podażą i wydalaniem sodu. Wzmoczona retencja sodu powoduje przejściową hiperwolemię, której skutkiem jest zwiększenie objętości minutowej serca, a następnie wzrost oporu obwodowego prowadzący do podwyższonych wartości ciśnienia krwi. Skuteczne zwiększenie wydalania płynu przez nerki musi być więc skojarzone ze stopniowym wzrostem ciśnienia tętniczego krwi (Guyton, 1991). Równowaga między podażą i wydalaniem płynów i sodu zostaje wreszcie przywrócona, niestety kosztem dalszego wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, który ulega stopniowo utrwaleniu.

Badania molekularno-genetyczne wydają się potwierdzać hipotezę Guytona: defekt genetyczny występujący w pierwotnym nadciśnieniu tętniczym przejawia się w upośledzeniu funkcji nerek, prowadzącym do wzmoczonej retencji sodu i wody a być może również w zjawisku sodowrażliwości, czyli nieproporcjonalnie większym niż normalnie wzroście ciśnienia krwi pod wpływem dostarczonego ładunku sodu (Guyton, 1991).

W długofalowej regulacji ciśnienia tętniczego bierze udział także układ współczulny, a zwłaszcza eferentne włókna tego układu unerwiające nerkę. Wzrost ich aktywności może być czynnikiem inicjującym rozwój nadciśnienia tętniczego w wyniku przesunięcia w prawo krzywej zależności natriureza-ciśnienie tętnicze. Przesunięcie owej krzywej zależności może być osiągnięte poprzez:



- wzrost obwodowego oporu naczyniowego obserwowany także w krążeniu nerkowym (naczyniowy receptor  $\alpha$ -adrenergiczny),
- zwiększenie kanalikowej reabsorpcji sodu (kanalikowy receptor  $\alpha$ -adrenergiczny),
- wzrost uwalniania reniny (receptor  $\beta$ -adrenergiczny kom. przykłębuszkowych t. doprowadzającej).

Aktywacja układu współczulnego, np. w przebiegu krwotoku, wstrząsu lub intensywnego wysiłku fizycznego, prowadzi drogą odśrodkowych włókien nerwowych, a także drogą krwi (adrenalina z rdzenia nadnerczy) do pobudzenia receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych w tętniczkach wewnątrznerkowych, skurczu tych naczyń i obniżenia przepływu krwi przez nerkę i filtracji kłębuszkowej. Wzrost aktywności współczulnych nerwów nerkowych prowadzi również do zwiększenia reabsorpcji kanalikowej  $\text{Na}^+$ .

Podwyższona aktywność układu współczulnego jest charakterystyczną cechą nadciśnienia tętniczego, niezależnie od jego przyczyny. Wiadomo również, że w wielu postaciach nadciśnienia aktywność współczulnych nerwów nerkowych wzrasta pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak dieta wysokosodowa lub stres emocjonalny, w nieporównywalnie większym stopniu niż u osobników zdrowych. Zarówno Ang II jak i aldosteron bardzo aktywnie stymulują układ współczulny, przewyższając toniczne hamowanie tego układu przez impulsację z receptorów sercowo-płucnych. Impulsacja w włóknach współczulnych unerwiających nerki wzrasta również pod wpływem urazu tkanek i środków używanych do znieczulenia ogólnego.

Również u zwierząt z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem (ang. Spontaneously Hypertensive Rats, SHR) opisano wzrost bioelektrycznej aktywności odśrodkowych włókien współczulnych unerwiających nerkę. Wzrost aktywności nerwów



nerkowych u tych zwierząt nasilał się jeszcze bardziej, jeśli zastosowano dietę wysokosodową i był odpowiedzialny za dalszy wzrost kumulacji sodu w organizmie.

Wśród hormonów naczyniokurczących, do wytwarzania których niezbędne są substancje powstające w nerkach, należy przede wszystkim angiotensyna II, która ponadto stymuluje produkcję aldosteronu w nadnerczach. Angiotensyna II wywiera bardzo silnie działanie naczyniokurczące; obok bezpośredniego wpływu na napięcie naczyń za pośrednictwem receptora ATI, Ang II powoduje zmiany morfotyczne w układzie sercowo-naczyniowym: rozrost ściany naczyń, przerost lewej komory serca oraz zmianę stosunku grubości ściany naczynia do jego światła (McConaughy i wsp., 1999, Oikarinen i wsp., 2003, Schmieder, 1994).

Układ renina-angiotensyna-aldosteron jest istotnym czynnikiem biorącym udział w kontroli ciśnienia krwi. Wywiera on zarówno bezpośredni jak i pośredni wpływ na wartość tego parametru. Bezpośredni wpływ polega na naczyniokurczącym i mitogennym działaniu angiotensyny II, natomiast pośredni wpływ na ciśnienie krwi wywierają zarówno angiotensyna jak i stymulowany przez nią aldosteron, które to czynniki stymulują kanalikowy transport sodu, przez co przyczyniają się do wzrostu objętości płynów ustrojowych. Zwiększona reaktywność tej osi hormonalnej jest zarówno jedną z przyczyn jak i objawów bardzo często towarzyszących nadciśnieniu tętniczemu u ludzi. Do aktywacji układu RAA dochodzi także w przypadku zwężenia tętnic nerkowych.

Tlenek azotu jako substancja naczyniorozszerzająca ma naturalnie działanie przeciwstawne do angiotensyny (Romero i Strick, 1993); wywiera jednak także specyficzny wpływ na aktywność RAAS. Dokładne zależności występujące pomiędzy *NO* a RAAS opisane zostały w rozdziale „*Działanie NO na czynność nerek*”. Istnieje również zależność pomiędzy układem RAA a pochodnymi kwasu arachidonowego, mianowicie angiotensyna II stymuluje syntezę naczyniokurczącego 20-HETE (Roman, 2002).



Jak już wspomniano nerka jest miejscem syntezy wielu substancji parakrynych mających istotny wpływ na transport kanalikowy i krążenie nerkowe a tym samym na ostateczną czynność wydalniczą narządu. Substancje parakryne leżące w sferze zainteresowań prezentowanych badań to: tlenek azotu (*NO*) i pochodne kwasu arachidonowego (AA) - EETs i 20-HETE.

Tlenek azotu jest molekułą silnie rozszerzającą naczynia w całym układzie krążenia. W warunkach fizjologicznych można mówić o bezpośrednim wpływie *NO* na hemodynamikę nerek i procesy transportowe oraz o wpływie pośrednim (przede wszystkim poprzez regulację tempa filtracji kłębuszkowej) polegającym na modyfikacji kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego (TGF). *NO* wykazuje, antagonistyczne działanie w stosunku do silnie naczyniokurczącej Ang II i wazopresyny a także w stosunku do aktywności układu współczulnego.

Przynajmniej niektóre związki typu EET działają naczyniorozszerzająco a wszystkie hamują transport kanalikowy, przyczyniając się do zwiększenia wydalania nerkowego, przez co w dwojaki sposób przeciwstawiają się rozwojowi nadciśnienia. 20-HETE, najważniejszy spośród kwasów hydroksyeikozatetraenowych, działa naczyniokurcząco oraz zwiększa wrażliwość tzw. sprzężenia kanalikowo-kłębuszkowego przez co może przyczyniać się do rozwoju nadciśnienia. Z drugiej strony hamując transport kanalikowy wykazuje działanie antyhipertensyjne.

Wpływy poszczególnych czynników parakrynych często są przeciwstawne, tak np. *NO* antagonizuje naczyniokurczące działanie endoteliny i 20-HETE. Ponadto warto podkreślić, iż synteza wielu substancji parakrynych jest modulowana przez dostawę sodu, będącego istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby nadciśnieniowej.



### **1.3. Zmiany podaży sodu - wpływ na czynność nerki i ciśnienie tętnicze krwi**

Od niemal 100 lat rola spożycia sodu w patogenezie nadciśnienia tętniczego budzi żywe zainteresowanie. Już w latach 60-tych XX wieku, Lewis Dahl wykazał liniowy wzrost ciśnienia krwi w zależności od ilości spożytego sodu (Dahl, 1960). W badaniach epidemiologicznych i eksperymentalnych oraz badaniach klinicznych uzyskano wiele przekonujących dowodów na istotny udział zwiększonej podaży sodu w rozwoju tej choroby.

Głównymi próbami klinicznymi, które potwierdziły związek pomiędzy ilością spożywanej soli kuchennej (sodu) a wysokością ciśnienia krwi są programy: INTERSALT (International Study of Salt and Blood Pressure), TONE (Trial Of Nonpharmacological Intervention in the Elderly), TOHP (Trials of Hypertension Prevention) oraz DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), realizowane przez Treatment of Mild Hypertension Research Group oraz Intersalt Cooperative Research Group, (1988). Wykazano dodatnią zależność między spożyciem soli a wysokością ciśnienia skurczowego oraz rozkurczowego.

Znakomicie zaprojektowane i przeprowadzone badania Dentona i wsp. (1997) wykazały, że szympansy - zwierzęta filogenetycznie najbliższe człowiekowi – na podwyższoną podaż sodu reagowały podwyższeniem ciśnienia krwi, natomiast po przywróceniu diety o niskiej zawartości sodu, wartość ciśnienia krwi powracała do wartości kontrolnych.

Także w wielu badaniach populacyjnych wykazano istotny związek pomiędzy spożyciem soli a wartością ciśnienia tętniczego krwi. W populacjach o niższym spożyciu soli, np. u Indian brazylijskich, nie odnotowuje się tak dużej liczby pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, ani też ciśnienie tętnicze nie wzrasta w tej grupie wraz z wiekiem (Gleibermann, 1973; Froment i wsp., 1979).



Jak już wspomniano rozwój nadciśnienia tętniczego często wiązany jest z występowaniem zjawiska tzw. sodowrażliwości. U osobników sodowrażliwych zwiększone dostarczenie sodu (doustne czy parenteralne) powoduje podwyższenie ciśnienia tętniczego a ograniczenie podawania tego kationu wywołuje skutek odwrotny. U osób sodoniewrażliwych zmiany podawania sodu nie wpływają na ciśnienie tętnicze.

Zjawisko sodowrażliwości nie jest do końca wyjaśnione. Postulowane są takie mechanizmy jak upośledzenie wydalania sodu, zależne np. od zwiększonego wchłaniania zwrotnego w kanalikule proksymalnym, zwiększonej aktywności układu współczulnego oraz dysfunkcji śródbłonna prowadzącej do upośledzenia uwalniania tlenu azotu (Weinberg, 1996, Chimero, 2001). Podwyższone spożycie sodu oraz następczy wzrost objętości krwi może być do pewnego stopnia skorygowany przez wzmożone wydzielanie hormonów o działaniu natriuretycznym, takich jak: przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP), peptyd natriuretyczny C oraz urodylatyna a także poprzez hamowanie aktywności układu RAA oraz układu współczulnego.

Wiadomo jednak, że niewielki, sięgający 3 mmol/L wzrost stężenia Na w osoczu wywołuje proporcjonalny wzrost ciśnienia krwi, nawet przy zmniejszającej się objętości płynów pozakomórkowych (Friedman i wsp., 1990). Bardzo interesujące i mające praktyczne znaczenie są informacje na temat innych, także niezależnych od podwyższonego ciśnienia tętniczego, niekorzystnych następstw nadmiernego spożycia sodu. Wykazano np., że ilość przyjmowanego sodu (określana na podstawie jego wydalania z moczem) koreluje dodatnio z masą lewej komory serca zarówno u ludzi zdrowych jak i chorych na nadciśnienie tętnicze. Zależność tę potwierdziło badanie TOMHS (Treatment of Mild Hypertension Study). Warto również odnotować interesujące rezultaty badań populacyjnych, które wykazały, że sód bezpośrednio indukuje przerost kardiomiocytów i włóknienie mięśnia sercowego (przegląd: Januszewicz i wsp., 2004). Wiadomo również, że chorzy na nadciśnienie pierwotne wrażliwi



na sód reagują na zwiększenie jego podaży zwiększeniem filtracji kłębuszkowej, prawdopodobnie w wyniku skurczu naczyń odprowadzających. Wiąże się to ze zwiększonym przepływem krwi przez kłębuszki i wzrostem ciśnienia w naczyniach włosowatych kłębuszków. Badania doświadczalne wykazały, że te zmiany hemodynamiczne uszkadzają komórki śródbłonna naczyń, komórki nabłonkowe oraz mezangium. Końcowym efektem tych zmian jest stwardnienie kłębuszków. Można zatem przypuszczać, że wrażliwi na sód chorzy są bardziej narażeni na tego rodzaju zmianę narządową (Januszewicz i wsp. 2004).

O sprawnym usuwaniu nadmiaru sodu przez nerkę decydują również syntetyzowane w niej czynniki parakryne. Wiele badań wskazuje, że różna podaż sodu modyfikuje aktywność enzymów zaangażowanych w monooksygenację zależną od CYP-450 oraz syntaz *NO* (Roman, 2002). Wpływ podaży sodu na aktywność omawianych szlaków metabolicznych został szerzej opisany w rozdziałach „*Wpływ podaży sodu na aktywność syntaz NO w nerce szczura*” oraz „*Wpływ podaży sodu na aktywność metabolizmu AA w nerce szczura*”.

Zmiany w aktywności wybranych szlaków syntetyzujących lokalne mediatory i ich wpływ na regulację ciśnienia oraz czynność nerki stały się głównym przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

#### **1.4. Tlenek azotu w organizmie**

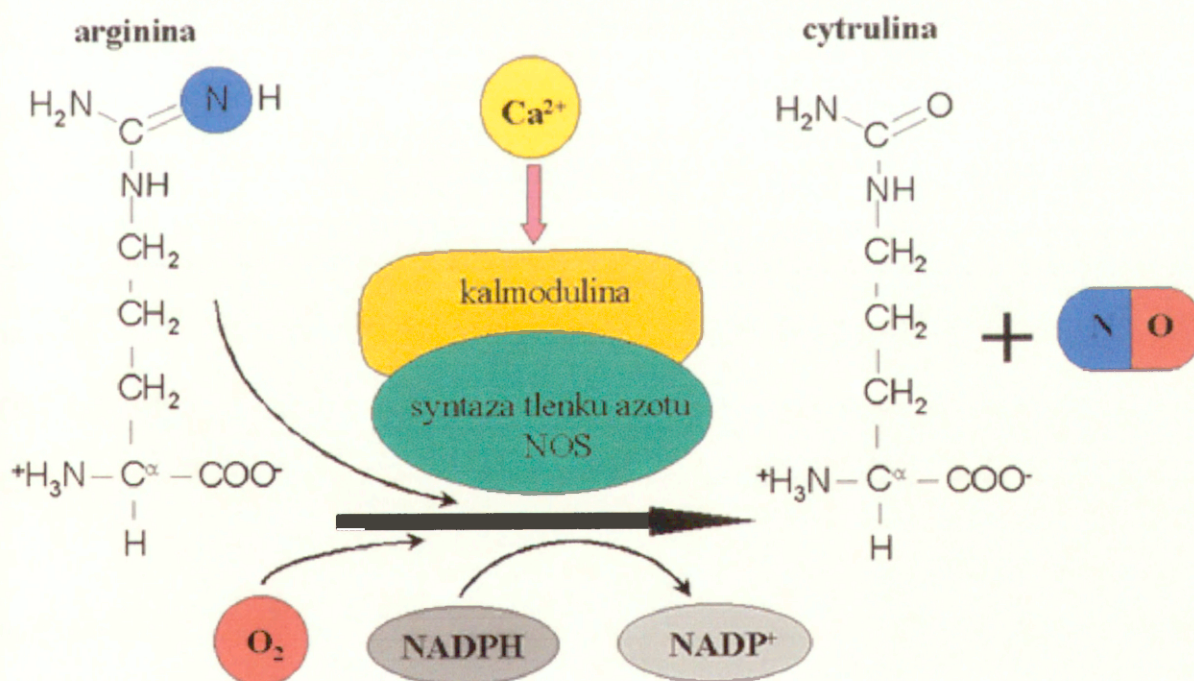
Cząsteczka *NO* jest wolnym, niestabilnym rodnikiem gazowym, łatwo przenikającym przez błony komórkowe, powstającym w wyniku utleniania L-argininy przez jedną z trzech izoform syntaz tlenku azotu. Mimo krótkiego czasu półtrwania, ograniczonego dodatkowo wiązaniem z grupami hemowymi, wędruje stosunkowo daleko (150-300µm) od miejsca swego powstawania.

Wytwarzany w organizmie *NO* wywiera bardzo różnorodne działanie, między innymi



wywołuje rozkurcz naczyń krwionośnych (endotelialna syntaza tlenu azotu, NOS-3), pośredniczy w komórkowej odpowiedzi immunologicznej (indukowana syntaza tlenu azotu, NOS-2) oraz modyfikuje neurotransmisję (neuronalna syntaza tlenu azotu, NOS-1).

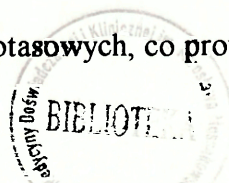
Białka syntaz *NO* są hemoproteinami, które w obecności tlenu cząsteczkowego i tetrahydrobiopteryny ( $BH_4$ ) katalizują utlenianie grupy guanidynowej L-argininy do *NO* i L-cytruliny. Kofaktorami reakcji syntezy *NO* są: wapń, kalmodulina, forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), dinukleotydy flawinoadeninowy (FAD), mononukleotydy flawinoadeninowy (FMN) i tetrahydrobiopteryna ( $BH_4$ ). Uproszczony schemat syntezy *NO* przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat syntezy *NO*.

W większości komórek działanie *NO* związane jest z aktywacją cytozolowej cykazy guanylanowej i wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego cGMP (Biondi i wsp., 1990).

Ponadto dochodzi do aktywacji kanałów potasowych, co prowadzi do hyperpolaryzacji





komórki, zamknięcia zależnych od potencjału kanałów wapniowych i nasilenia niedoboru  $Ca^{2+}$  w komórce. Brak stałego dostarczania wapnia do komórki powoduje defosforylację lekkich łańcuchów miozyny i doprowadza do rozkurczu mięśni gładkich naczyń.

*NO* uwalniany do światła naczynia przechodzi także do płytek krwi (w trakcie ich kontaktu ze ścianą naczynia) i w podobny sposób doprowadza w nich do zwiększenia stężenia cGMP i spadku poziomu wapnia, co zapobiega agregacji płytek (Rajj, 1993).

### **1.4.1. Syntazy tlenu azotu (NOS)**

Istnieją 3 główne izoformy syntazy *NO*: neuronalna (nNOS, NOS-1), indukowana (iNOS, NOS-2) i śródbłonkowa (eNOS, NOS-3). Wszystkie one są konstytutywnie obecne w nerce. Wszystkie syntazy są aktywne tylko jako dimery; pojedyncza jednostka nie jest zdolna do wytwarzania *NO*. Wykazują one budowę podobną do białek cytochromu P-450. *NOS* została odkryta jako enzym cytoplazmatyczny, ale pewne jej postranslacyjne modyfikacje mogą zmieniać lokalizację wewnątrzkomórkową a dotyczy to szczególnie izoformy śródbłonkowej. Pojedyncza podjednostka jest białkiem zawierającym flawiny (FAD, FMN) i przyłączoną kalmodulinę. Aktywny dimer wiąże dwa centra hemowe i dwie cząsteczki tetrahydrobiopteryny (Kiechle i wsp., 1993).

Tlenek azotu dzięki swojej dużej przenikalności wnika do wnętrza miocytów naczyniowych i za pośrednictwem cGMP powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych, istotnie obniżając ciśnienie krwi. W warunkach fizjologicznych w sposób bezpośredni wpływa zarówno na hemodynamikę jak i na procesy transportowe w nerce.

W nerkach *NO* reguluje regionalny przepływ w korze i rdzeniu m. in. także poprzez modyfikację kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego. Toniczny wpływ *NO* na krążenie nerkowe jest istotnym czynnikiem antagonizującym działanie wielu substancji naczyniokurczących takich jak angiotensyna II, wazopresyna, 20-HETE czy endotelina -



obecnych w łożysku naczyniowym nerki. Wpływa on także na filtrację kłębuszkową, wydzielanie reniny oraz transport jonów przez ścianę kanalika nerkowego. Wiadomo, że obniżenie syntezy *NO* zmniejsza zdolność wydalania sodu i wody w odpowiedzi na wzrost objętości płynów pozakomórkowych, natomiast podanie donorów tlenu azotu prowadzi do natriurezy (Majid i wsp., 1993). Badania *in vitro* potwierdzają, że *NO* wywiera bezpośredni wpływ na transport jonów, hamuje reabsorpcję sodu w kanaliku proksymalnym (Roczniak i Burns, 1996) i w kanaliku zbiorczym (Stoos i wsp., 1995). Istnieją również doniesienia, że *NO* powstający za pośrednictwem eNOS hamuje reabsorpcję sodu w kanaliku proksymalnym, ramieniu wstępującym pętli Henlego i kanaliku zbiorczym, natomiast *NO* produkowany przez nNOS wydaje się stymulować transport w kanaliku proksymalnym. Niejednoznaczne są także dane dotyczące roli *NO* w transporcie wody. Spotyka się zarówno doniesienia, że jest on substancją antagonizującą działanie wazopresyny jak i dane świadczące o tym, że *NO* naśladuje wpływ VP stymulując wbudowywanie akwaporyn w błonę luminalną kanalików zbiorczych (Ortiz i Garvin, 2002).

Poza wielością procesów regulowanych przez *NO*, dodatkowa trudność w badaniu jego roli wynika z faktu, że może on wywoływać efekty przeciwstawne, zależnie od lokalizacji produkującej go syntazy. Tak np. *NO* generowany przez eNOS w śródbłonku tętniczki doprowadzającej kłębuszków hamuje sekrecję reniny (He, 1995), podczas gdy *NO* powstający w płamce gęstej przy udziale nNOS stymuluje jej uwalnianie.

### **Neuronalna syntaza tlenu azotu (nNOS, NOS-1)**

Izofорма neuronalna NOS jest enzymem cytozolowym, zależnym od jonów wapnia i kalmoduliny, prawdopodobnie zlokalizowanym w komórce przybłonowo i związanym z nią za pośrednictwem białka PSD-95 i  $\alpha$ -syntrofiny (Brenman, 1996). Ludzka nNOS jest białkiem o ciężarze 155 kDa a szczurza - 160 kDa; jest konstytutywnie obecna w dużych stężeniach, głównie w mózgu, rdzeniu kręgowym i obwodowym układzie nerwowym. Jej



obecność stwierdza się w neuronach nitrergicznym mózgu i w pozazwojowych zakończeniach autonomicznych typu NANC (ang. non-adrenergic, non-cholinergic).

Najlepiej poznanym mechanizmem aktywacji nNOS jest pobudzenie receptora metabotropowego NMDA, związanego z kanałem wapniowym. Otwarcie kanału zwiększa stężenie jonów wapnia w komórce, który wiążąc się z kalmoduliną aktywuje nNOS do produkcji *NO*.

W nerce obecność neuronalnej syntazy *NO* (nNOS) stwierdzono w plamce gęstej (macula densa) kanalika dystalnego oraz w śródbłonku tętniczek doprowadzających kłębuszków (Wilcox, 1992; Bachmann, 1995). Wiadomo, że jest ona także obecna w okolicy zakończeń włókien nerwowych biegnących w sąsiedztwie tętnic łukowatych i międzypłatowych oraz we włóknach dochodzących do miedniczki nerkowej. Ponadto stwierdzono obecność nNOS w komórkach nabłonka torebki Bowmana, niektórych komórkach położonego w rdzeniu wewnętrznym odcinka pętli Henlego a także w odcinku rdzeniowym kanalików zbiorczych. W kanalik zbiorczym, białko dla nNOS jest znajdowane w komórkach głównych, które są odpowiedzialne za transport sodu, potasu i wody (Wang, 1998). Najwyższy poziom ekspresji mRNA dla nNOS odnotowano w odcinku kanalika zbiorczego położonym w rdzeniu wewnętrznym (ang. Inner Medullary Collecting Duct, IMCD) (Terada, 1992), natomiast najniższy w kanaliku proksymalnym (Wang, 2000; Baines i Ho, 2002). Doniesienia te zostały potwierdzone przez innych badaczy przy użyciu techniki Western blot, dzięki której ustalono, iż najwyższy poziom białek nNOS znajduje się w rdzeniu nerki, ze szczególnym uwzględnieniem rdzenia wewnętrznego (Martin, 2002). Nie do końca w zgodzie z przedstawioną lokalizacją pozostają informacje mówiące o niskim poziomie ekspresji nNOS w cienkim odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego (Wang, 2002). Powyższe dane o rozmieszczeniu neuronalnej syntazy *NO* odnoszą się do nerki gryzoni.



### **Indukowana syntaza tlenku azotu (iNOS, NOS-2)**

Indukowana izoforma NOS (iNOS) jest białkiem o ciężarze 130 kDa, geny dla niej zlokalizowane są u człowieka na chromosomie 17. Uważa się, że jest to enzym niezależny od kompleksu wapń-kalmodulina, choć niektórzy badacze podważają ten pogląd wykazując konieczność przyłączenia kalmoduliny do enzymu jako warunek jej prawidłowego działania (Knowles, Moncada, 1994; Cho, 1992). Indukowana NOS jest enzymem częściowo związanym z błonami komórkowymi a częściowo występuje jako enzym cytozolowy.

W warunkach równowagi fizjologicznej (bez indukcji, np. cytokinami) iNOS znajdowano w makrofagach, mięśniach gładkich naczyń, siatkówce, hepatocytach, fibroblastach, chondrocytach i komórkach gleju. Miejscem najwyższej podstawowej ekspresji mRNA dla iNOS w nerce jest rdzeniowy odcinek ramienia wstępującego pętli Henlego (ang. Thick Ascending Limb of Henle, TALH) (Mohaupt, 1994; Morrisem, 1994); w warunkach podstawowych nie stwierdza się istotnego wpływu *NO* pochodzącego z iNOS na krążenie czy transport nerkowy.

W warunkach patologicznych iNOS odpowiedzialna jest za wytwarzanie dużych ilości *NO*, powstawanie peroksynitrytu (nadtlenoazotynu, ONOO<sup>-</sup>), który ulegając rozszczepieniu doprowadza do powstania rodnika wodorotlenowego i wolnego rodnika azotanowego, uważanych za jedne z najbardziej cytotoksycznych cząsteczek w organizmie. Wspomniane rodniki blokują enzymy łańcucha oddechowego, hamują aktywność wielu enzymów zawierających metale, powodują oksydację kwasów tłuszczowych oraz nitrozylację białek i aminokwasów.



### **Śródbłonkowa/Endotelialna syntaza tlenku azotu (eNOS, NOS-3)**

U człowieka gen dla izoformy śródbłonkowej (eNOS) znajduje się na 7 chromosomie. Ta konstytutywnie występująca syntaza, znajdowana przede wszystkim w komórkach śródbłonkowych naczyń, jest enzymem zależnym od jonów wapnia i kalmoduliny. Jej budowa morfologiczna jest bardzo podobna do nNOS, zaś forma aktywna enzymu składa się z dwóch podjednostek. Endotelialna NOS jest enzymem związanym z błoną cytoplazmatyczną. W komórce następuje swoista wędrówka eNOS z miejsca jego składowania w błonie (nieaktywny kompleks z kaweoliną) do cytozolu (forma aktywna) pod wpływem zwiększenia stężenia jonów wapnia i tworzenia jego kompleksu z kalmoduliną. mRNA dla eNOS odnaleziono pierwotnie w komórkach śródbłonka naczyń, w hipokampie oraz komórkach mięśnia sercowego.

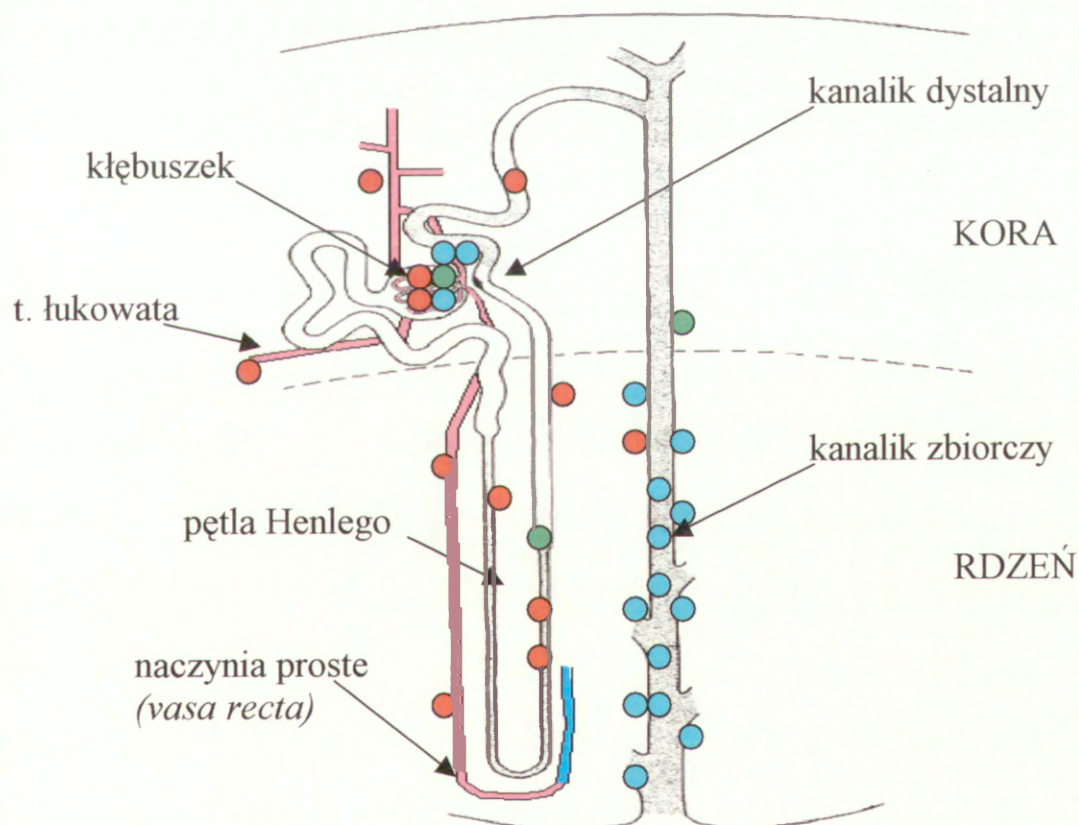
W nerce eNOS wykryto w śródbłonku naczyń włosowatych kłębuszka, tętniczek doprowadzających i odprowadzających, **śródbłonku tętnic wewnętrznerkowych (głównie w rdzeniu nerki)** oraz naczyń prostych (vasa recta) w rdzeniu. mRNA dla eNOS zlokalizowano także w kanalikule proksymalnym, w grubym odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego i w kanalikule zbiorczym.

Zwiększenie powstawania *NO* pochodzenia śródbłonkowego może zachodzić pod wpływem wielu czynników. Jednym z nich jest zjawisko tzw. stresu ścinającego (ang. shear stress). Laminarny przepływ krwi w naczyniu odkształca komórki śródbłonka, co powoduje zwiększoną transkrypcję genów dla eNOS. Stres ścinający jest jednym z najważniejszych czynników długotrwałej regulacji poziomu *NO* w naczyniach (Sessa, 1994). Ponadto aktywuje on kanały potasowe ( $K^+$ ) w komórkach śródbłonkowych, co dodatkowo uruchamia mechanizmy doprowadzające do nasilenia transkrypcji genów dla eNOS (Uematsu, 1995).



Wszystkie trzy izoformy NOS są konstytutywnie obecne w nerce, choć jak wspomniano ich rozmieszczenie w tym narządzie nie jest jednorodne. Dość wcześnie zwrócono uwagę na większą zdolność syntezy *NO* w rdzeniu nerki w porównaniu z korą.

Schemat rozmieszczenia poszczególnych typów syntaz *NO* w nefronie szczura przedstawiono na Ryc. 2.



Ryc. 2. Schemat lokalizacji syntaz tlenku azotu w nefronie nerki szczura. Kropki niebieskie oznaczają nNOS, kropki czerwone eNOS, zielone iNOS.

Biondi i Romero (1990) jako pierwsi stwierdzili, że w rdzeniu nerki psa wykrywa się znacznie większe ilości cGMP (drugi przekaźnik dla *NO*) niż w korze. Badania prowadzone



w naszej Pracowni również potwierdzają większą zdolność rdzenia nerki do syntezy *NO* (Grzelec-Mojzesowicz i Sadowski, 2007).

### **1.4.2. Działanie *NO* na czynność nerki**

Dzięki dość szerokiemu spektrum swojego działania *NO* odgrywa istotną rolę w wielu funkcjach nerek. Biologiczne działanie *NO* polega na pośredniczeniu w procesach rozkurczu naczyń krwionośnych, co powoduje wzrost przepływu krwi przez naczynia nerkowe przyczyniając się pośrednio do wzrostu wydalania sodu. Obserwuje się również bezpośredni wpływ *NO* na zwiększone wydalanie sodu; wiadomo, że *NO* powstający przy udziale eNOS hamuje transport kanalikowy.

Jak wspomniano wysoki poziom białek nNOS opisano w plamce gęstej gdzie produkowany przez nią *NO* jest ważnym czynnikiem modyfikującym sprzężenie kanalikowo-kłębuszkowe. Plamka gęsta jest miejscem zetknięcia końcowego odcinka ramienia wstępującego pętli nefronu z biegunem naczyniowym kłębuszka, oraz jak wiadomo, komórki plamki gęstej są detektorem stężenia NaCl, reagując na zmiany stężenia chlorku sodu dopływającego do tego odcinka kanalika. Zwiększenie dostawy soli do komórek plamki gęstej kanalika dystalnego prowadzi do nasilenia ko-transportu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  w jej komórkach, co uruchamia sygnał do skurczu tętniczki doprowadzającej, prowadząc do zmniejszenia przepływu krwi przez kłębuszek i zmniejszenia filtracji. Sygnał ten nie został do końca zidentyfikowany, przypuszcza się, że jest nim adenozylna lub/i ATP. *NO* powstający z udziałem zlokalizowanej tam nNOS przeciwdziała skurczowi tętniczki doprowadzającej występującemu w następstwie sygnału z plamki gęstej, czyli zmniejsza wrażliwość kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego. Ponadto *NO* wpływa na aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron. Wiadomo, że *NO* pochodzący z eNOS i nNOS wykazuje przeciwstawne działanie na aktywność układu RAA zależnie od różnej lokalizacji obu syntaz.



I tak *NO* powstający przy udziale eNOS hamuje sekrecję reniny przez komórki tętniczki doprowadzającej a więc hamuje aktywność RAAS, natomiast nNOS wykazuje działanie przeciwstawne w związku z pobudzeniem wydzielania reniny w tym samym obszarze (przez komórki aparatu przykłębuszkowego).

Innym ważnym działaniem *NO* jest zapobieganie powstawaniu skrzepów w obrębie kłębuszka nerkowego. Jest to o tyle istotne, że podczas filtracji krew ulega bardzo silnemu zagęszczeniu, zaś jej powolny przepływ w kłębuszkowych naczyniach włosowatych dodatkowo sprzyja krzepnięciu krwi (Marsden i wsp., 1996).

Szereg badaczy uważa, że tlenek azotu generowany przez nNOS odgrywa ważną funkcję w regulacji przepływu krwi w rdzeniu nerki. Według innych danych ukrwienie kory zależy niemal w równym stopniu od *NO* generowanego przez eNOS i nNOS, natomiast ukrwienie rdzenia i filtracja kłębuszkowa – głównie od *NO* generowanego przez eNOS (Kakoki i wsp., 2001; Grzelec-Mojzesowicz i Sadowski, 2007).

Stwierdzono również wpływ *NO* na procesy transportowe w nerce. Bech i wsp. (1996), stwierdzili, że zablokowanie syntezy *NO* nie powodujące zmian w ciśnieniu krwi prowadziło do obniżenia wydalania sodu; natomiast podanie donorów *NO* prowadziło do natriurezy (Majid i wsp., 1993). *NO*, prawdopodobnie pochodzący z nNOS zlokalizowanej w naczyniach prostych (*vasa recta*) i kanalikach zbiorczych, wydaje się mieć bezpośredni, hamujący wpływ na funkcje kanałów i transporterów jonowych. W badaniach Mattsona i wsp. (1996) potwierdzono, że zablokowanie nNOS wywołało nadciśnienie powodowane zwiększoną retencją sodu.



### **Wpływ podaży sodu na aktywność syntaz *NO* w nerce szczura**

Jak już wspomniano, rozmieszczenie poszczególnych typów syntaz *NO* jest w nerce nierównomierne a ponadto aktywność poszczególnych typów syntaz jest modulowana niezależnie, m.in. przez zróżnicowaną dostawę sodu. Z wielu badań wynika, że zwiększona podaż sodu prowadzi do podwyższonej ekspresji wszystkich trzech izoform NOS w rdzeniu nerki, natomiast w położonej w korze płamce gęstej zarówno zwiększenie jak i obniżenie spożycia sodu podwyższa aktywność nNOS (Wilcox i wsp., 1998). Na podstawie ostatnich badań Siragy i wsp. (2007) przeprowadzonych na młodych szczurach, stwierdzono, że dieta niskosodowa powoduje znamienny wzrost aktywności eNOS w kłębuszkach, aparacie przykłębuszkowym i w naczyniach oraz powoduje wzrost aktywności nNOS w kanalikach.

Szczególnie intensywnie badana jest rola *NO* w odpowiedzi na dietę wysokosodową; w badaniach na ludziach z umiarkowanym nadciśnieniem wywołanym podawaniem zwiększonej ilości NaCl stwierdzono zwiększenie oporu naczyniowego w krążeniu nerkowym zależne od zaburzeń w produkcji *NO* (Higashi i wsp., 1995).

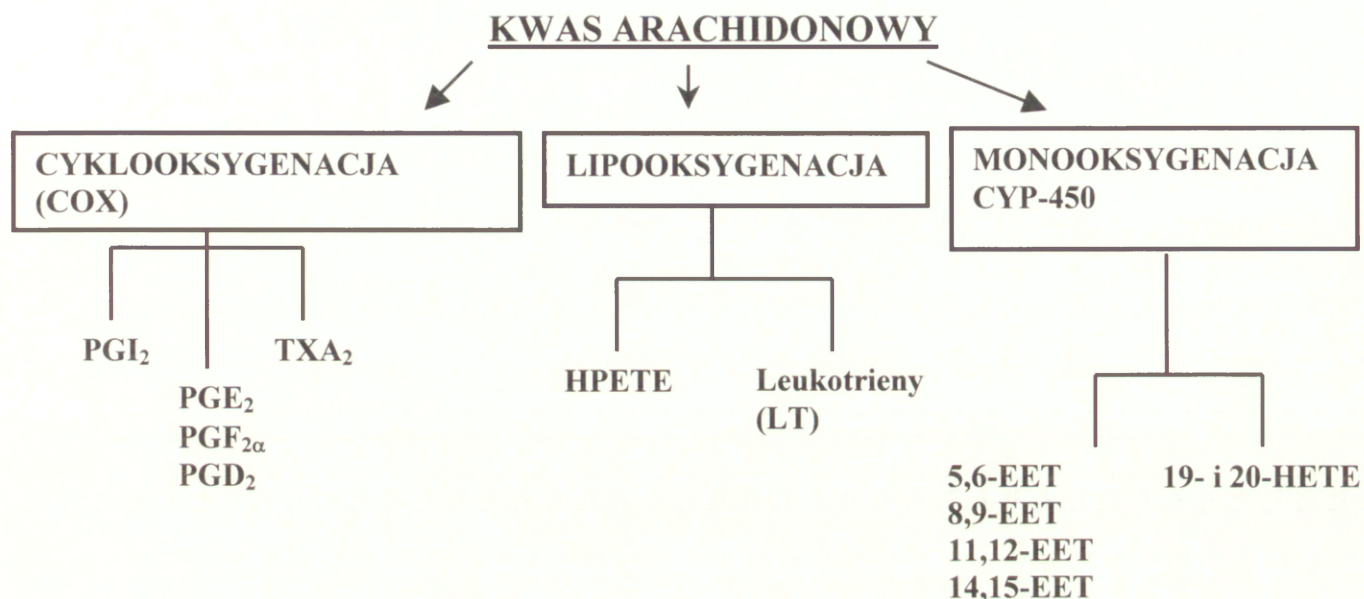
### **1.5. Szlaki metaboliczne kwasu arachidonowego**

Kwas arachidonowy (**AA**) uwalniany z fosfolipidów błonowych jest przekształcany enzymatycznie w całą rodzinę metabolitów zwanych **eikozanoidami**. Istnieją trzy szlaki prowadzące do wytworzenia biologicznie aktywnych eikozanoidów:

1. szlak cyklooksygenacji (COX)
2. szlak lipooksygenacji
3. szlak monoooksygenacji zależnej od cytochromu P-450 (CYP-450)

Liczne ich produkty, pokazane na poniższym rysunku, pełnią ważną rolę w regulacji ukrwienia nerki, filtracji kłębuszkowej i transportu kanalikowego.





**Ryc. 3. Uproszczony schemat przemian kwasu arachidonowego (AA) w organizmie.** PGI<sub>2</sub> – prostacyklina, PGE, PGF, PGD – prostaglandyny, TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>, LT – leukotrieny, HPETE – kwasy hydroperoksyeikozatetraenowe, 5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15- EET – kw. eikozatrienowe, 19- i 20- HETE – kw. hydroksyeikozatetraenowe. Zmodyfikowane wg. Roman, 2002.

### Szlak cyklooksygenacji w nerce

Wszystkie izoenzymy syntazy cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego (COX) zwanego także cyklooksygenazą są umiejscowione na wewnętrznej powierzchni siateczki śródplazmatycznej, a także na wewnętrznej i zewnętrznej powierzchni błony jądrowej. W nerce występują dwie odrębne cyklooksygenazy: cyklooksygenaza 1 i 2 (COX-1 i COX-2), przekształcające kwas arachidonowy (AA) w metabolity zwane prostanoidami.

COX-1 podlega ekspresji konstytutywnej; w warunkach fizjologicznych wykrywana jest w wielu tkankach; w nerce w komórkach kłębuszka i kanalika zbiorczego. U dorosłych ludzi aktywność COX-1 wykryto w komórkach śródbłonna oraz w mięśniach gładkich ścian



żył i tętnic, w komórkach nabłonkowych kanalików zbiorczych, a także w komórkach śródmiąższowych kory i rdzenia nerki. Zwiększenie ekspresji COX-1 może świadczyć o uszkodzeniu ściany naczynia, w tym o zapoczątkowaniu procesu miażdżycowego (Burdan, 2006).

**COX-2** zwana jest często izoformą indukowaną; wykrywana jest stale (w pewnych ilościach podstawowych) w komórkach plamki gęstej, w ramieniu wstępującym pętli Henlego oraz w rdzeniowym odcinku kanalika zbiorczego, co wskazuje na jej ekspresję konstytutywną w tych strukturach nerki (Khan, 1998).

Opisano istnienie trzeciej izoformy syntazy cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego - **COX-3**, której ekspresja została wykazana zwłaszcza w obrębie ośrodkowego układu nerwowego a ekspresję genów ją kodujących stwierdzano także w ścianie aorty (Botting i wsp., 2005; Burdan i wsp., 2006).

Stała ekspresja genów COX jest niezbędna do utrzymania prawidłowego przepływu krwi. Wykazano, że COX-2 obecna w śródbłonku naczyń odpowiada za syntezę prostacykliny (PGI<sub>2</sub>), która może być także syntetyzowana z udziałem COX-1. Prostacyklina jest również najsilniejszym antagonistą tromboksanów, przede wszystkim trombosanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) wytwarzanego przez płytki krwi.

Głównym produktem cykooksygenacji w nerce jest **prostaglandyna E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**, a jej receptory (EP) są najbardziej rozpowszechnionymi w nerce receptorami dla eikozanoidów. Za pośrednictwem receptorów EP1, PGE<sub>2</sub> hamuje reabsorpcję sodu w kanaliku zbiorczym, przyczyniając się do natriurezy. Za pośrednictwem receptorów EP2 i EP4 rozszerza a za pośrednictwem EP3 zwęża naczynia krwionośne. Na jej rozszerzające działanie szczególnie wrażliwe są naczynia krwionośne w rdzeniu nerki. Naczyniokurczące działanie takich substancji jak angiotensyna II, katecholaminy i wazopresyna buforowane jest przez prostaglandyny - dzięki czemu przepływ krwi, filtracja kłębuszkowa i wydalanie sodu



utrzymywane są na prawidłowym poziomie. Prostaglandyny mogą mieć także swój udział w utrzymywaniu prawidłowego ciśnienia krwi w warunkach niedoboru sodu poprzez stymulację uwalniania reniny (Breyer i Breyer, 2000).

Drugim istotnym dla nerki metabolitem szlaku cyklooksygenacji jest **prostaglandyna I<sub>2</sub>** (PGI<sub>2</sub>, prostacyklina) działająca naczyniorozszerzająco za pośrednictwem receptorów IP. W obrębie eikozanoidów jest ona bardzo istotnym czynnikiem łagodzącym naczyniokurczące efekty substancji presyjnych w obrębie naczyń kłębuszka, gdzie jej synteza zarówno w mięśniówce tętniczki odprowadzającej oraz naczyń kapilarnych jest istotnie większa niż synteza PGE<sub>2</sub>.

Trzecim ważnym metabolitem powstającym w procesie cyklooksygenacji AA jest **tromboksan A<sub>2</sub>** (TXA<sub>2</sub>). Ma on działanie naczyniokurczące, a powstaje głównie w komórkach mezangialnych i podocytach kłębuszków nerkowych, przy czym w warunkach normalnych jest produkowany w niewielkich ilościach. Na hemodynamikę nerek wpływa przez receptory TP a jego znaczenie istotnie rośnie w stanach patologicznych (Imig, 2000).

### **Szlak lipooksygenacji**

Głównym metabolitem szlaku lipooksygenazy w nerkach są **leukotrieny (LTs)** produkowane przez komórki śródbłonna i komórki mezangialne kłębuszków. Metabolity szlaku lipooksygenazy wpływają na hemodynamikę nerek i filtrację kłębuszkową jedynie w stanach chorobowych (np. w stanach zapalnych).



## **Szlak monoooksygenacji zależnej od cytochromu P-450**

W nerkach funkcjonują dwa szlaki monoooksygenacji kwasu arachidonowego zależne od cytochromu P-450:

- szlak epoksygenacji produkujący kwasy epoksyeikozatrienowe, (związki typu EETs, epoksydy) oraz
- szlak  $\omega$ -hydroksylacji produkujący kwasy hydrosyeikozatetraenowe (związki typu HETE)

Pod nazwą **cytochrom P-450** kryje się ogromna rodzina enzymów wykazujących aktywność monoooksygenazy. Występują one powszechnie w niemal wszystkich tkankach, największą aktywność wykazując jednak w wątrobie i rdzeniu nadnerczy. W genomie człowieka znanych jest około 150 różnych genów (ich nazwy zaczynają się od liter CYP) kodujących różne cytochromy P-450, które dodatkowo wykazują znaczny polimorfizm w obrębie populacji. Enzymy tej rodziny są transbłonowymi białkami o masie cząsteczkowej 50-55 kDa, związanymi z błoną siateczki śródplazmatycznej oraz z wewnętrzną błoną mitochondrialną. Zawierają hem jako grupę prostetyczną, a kofaktorami reakcji monoooksygenacji są NADPH i FAD/FMN.

Cytochrom P-450 jest ważnym elementem w metabolizmie ksenobiotyków, zwłaszcza o charakterze hydrofobowym. Bierze również udział w przemianach kwasów tłuszczowych i eikozanoidów. Cytochrom P-450 jest końcowym elementem łańcucha przekazu elektronów, z którego przenoszone są one na jeden atom tlenu w cząsteczce  $O_2$ , redukując i włączając go do cząsteczki  $H_2O$ . Drugi atom tlenu jest włączany w substrat.

Rozszyfrowany został mechanizm cyklicznego procesu hydroksylacji, który przebiega w siateczce śródplazmatycznej przy udziale cytochromu P-450 (Wolf, 1982) w następujących etapach:



1. połączenie się cząsteczki substratu z utlenioną formą cytochromu P-450  $^{Fe^{3+}}$ ,
2. redukcja kompleksu przez elektron pochodzący z NADPH, a przekazany przez reduktazę cytochromu P-450 (to właśnie zredukowana postać cytochromu P-450 może reagować z CO, tworząc kompleks łatwy do identyfikacji dzięki pasmu absorpcji 450 nm, stąd nazwa „cytochrom P-450”).
3. przyłączenie do kompleksu zredukowanego cytochromu P-450 i substratu. cząsteczki tlenu z utworzeniem trójskładnikowego układu cyt-P450 $^{Fe^{2+}}$  - O<sub>2</sub><sup>-</sup>-substrat.

Redukcja tego kompleksu przez elektron pochodzący z reduktazy cytochromu P-450.

Ten ostatni związek to tzw. nadtlenkowa forma cytochromu P-450 (ang. peroxy-cytochrome P-450), która tracąc cząsteczkę wody przekształca się w kompleks o wysokiej elektrofilności, a tym samym o wysokiej zdolności do interakcji z cząsteczką substratu.

### **Szlak epoksygenacji zależnej od CYP-450**

W szlaku epoksygenacji zależnej od cytochromu P-450, kwas arachidonowy przekształcany jest w grupę związków określanych jako kwasy epoksyeikozatrienowe (EETs) przy udziale epoksygenazy. Opisano 6 głównych rodzin enzymu epoksygenazy CYP: 1A, 2B, 2C, 2D, 2E i 2J, w wyniku działania których powstają 4 główne grupy produktów: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET i 14,15-EET. Kwasy epoksyeikozatrienowe, podobnie jak związki typu HETE, nie posiadają specyficznych receptorów, działają lokalnie, w pobliżu miejsca swego powstawania. Jednak w najnowszej pracy Spectora i wsp. (2007) proponowane są dwa modele receptorów dla EETs. Pierwszy z nich miałby być receptorem błonowym, umieszczonym w błonie komórkowej i aktywującym szereg wewnątrzkomórkowych szlaków. Drugim proponowanym modelem jest receptor wewnątrzkomórkowy. Według tej teorii EETs są obecne wewnątrz komórki w wyniku wychwytu produktów hydrolizy fosolipidów



zawierających EETs lub w wyniku ich syntezy z AA. Według tej teorii pozostają one w komórce wystarczająco długo aby wywołać reakcję autokrynną.

### **Mechanizm działania związków typu EET**

Powstające w komórkach śródbłonka kwasy epoksyekozaatrienowe przyczyniają się do rozkurczu naczyń, poprzez otwarcie kanału potasowego aktywowanego wapniem (L-type  $K_{Ca}$  channel/ $BK_{Ca}$ ). Wywołują one hiperpolaryzację komórek śródbłonka i mięśni gładkich ścian naczyń, poprzez aktywację kanałów potasowych zależnych od wapnia ( $K_{Ca}$ ) oraz ATP-azy  $Na^+ - K^+$  (Pratt i wsp., 2001; Fleming, 2001). Związki typu EETs wykazują szereg efektów biologicznych. Do najważniejszych działań EETs należą m.in.: rozszerzenie naczyń, modyfikowanie aktywności kanałów jonowych, działania przeciwzapalne, angiogeneza i mitogeneza oraz szereg innych (Spector, 2007).

Ponieważ uwalniane w śródbłonku kwasy epoksyekozaatrienowe powodują hiperpolaryzację miocytów ścian naczyń krwionośnych, związki typu EET uznaje się za tak zwany **śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzacyjny** (Endothelial Dependent Hyperpolarizing Factor - EDHF). Pośredniczą one także w naczyniorozszerzającym działaniu bradykininy i acetylocholinyl (Roman, 2002) .

### **Występowanie i działanie związków typu EET w organizmie**

Kwasy epoksyekozaatrienowe są wykrywane w miocytach serca oraz komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych szczurów, psów, kotów, świń i królików, w których wykazują działanie naczyniorozszerzające. Stwierdzono, że związki te działają z różnym nasileniem w zależności od gatunku zwierzęcia oraz miejsca ich syntezy.



Enzymy podrodziny CYP2J2 odpowiedzialne są głównie za powstawanie EETs w kardiomiocytach (Wu i wsp., 1996), osłabiając ich kurczliwość poprzez zahamowanie aktywności kanałów sodowych oraz kanałów wapniowych typu L (Lee i wsp., 1999; Chen i wsp., 1999). Badania z użyciem oligonukleotydów nonsensownych wykazały, że enzymy z rodziny CYP2C8 oraz 2C9 są odpowiedzialne za powstawanie kwasów epoksyekoizatrienowych w komórkach śródbłona u ludzi (Fisslthaler i wsp., 1999). Białka z rodziny CYP2J3 wykrywa się w sercu, trzustce, wątrobie, płucach i nerkach szczurów. Obecność białek CYP2C1 i 2C4 stwierdzono również w komórkach wątroby królików (Chataigneau i wsp., 1998; Laethem i wsp., 1992). Obecność białek CYP2B, 2E, 2J, 1A, 2C i 4A stwierdza się w tętnicach płucnych oraz w oskrzelikach płucnych u królika (Zhu i wsp., 2000).

Najlepiej poznanym działaniem EETs jest ich wpływ wazorelaksacyjny w małych naczyniach oporowych. Dla przykładu w izolowanych mikronaczyniach wieńcowych 14,15-EET wykazuje działanie naczyniorozszerzające już w stężeniu 10 pM (Fang, 2005). Wpływ EETs na aktywność kanałów jonowych polega na zwiększeniu prawdopodobieństwa otwarcia kanałów BK<sub>Ca</sub>, co powoduje hiperpolaryzację mięśni gładkich ścian naczyń (ang. vascular smooth muscle cells, VSMC) i rozszerzenie naczynia (Hu, 1993). EETs aktywując kanały BK<sub>Ca</sub> także w innych komórkach, np. w płytkach krwi, powodują obniżenie ich agregacji (Kretz, 2004), w mięśniach gładkich dróg oddechowych, stymulują rozkurcz oskrzeli. Ponadto opisywany jest wpływ EETs na aktywność innych kanałów, np. K<sub>ATP</sub>, Na<sup>+</sup>, L-type Ca<sup>2+</sup>.

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że EETs stymulują angiogenezę; jednak ścieżka sygnału modelującego ten proces różni się zależnie od gatunku, typu śródbłona i regioizomeru EET, inicjującego ten proces (Fleming, 2006; Michaelis, 2006). Stwierdzono również, że EETs stymulują mitogenezę nerkowych komórek nabłonkowych, poprzez



złożony mechanizm transdukcji sygnału. Najbardziej aktywnym mitogenem wydaje się być 14,15-EET. Poza stymulacją proliferacji komórek zdaje się dodatkowo wzmacniać swoje działanie poprzez zahamowanie ich apoptozy (Chen, 2001).

### **Lokalizacja i działanie związków typu EET w nerce**

Za powstawanie EETs odpowiedzialna jest duża rodzina enzymów CYP-450, m.in. 1A, 2B, 2C, 2D, 2E i 2J aczkolwiek szczegółowy udział każdego z nich w produkcji eikozanoidów w nerce nie został określony (Sarkis i Roman, 2004). Podstawowe metabolity szlaku epoksygenacji występujące w nerce to: 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET. Związki te działają lokalnie w pobliżu miejsca powstawania wpływając między innymi na przepływ krwi oraz filtrację kłębuszkową. W nerce produkowane są one głównie w kanaliku proksymalnym i kanaliku zbiorczym, gdzie hamują reabsorpcję sodu i wody, bezpośrednio a także pośrednio, hamując antydiuretyczne działanie wazopresyny w korowym odcinku kanalika zbiorczego (Roman, 2002).

Opisywane są także różnice w sile oraz kierunku działania różnych izoform związków EETs na krążenie nerkowe. 11,12-, 14,15-, oraz 8,9-EET rozszerzają naczynia w mikrokrażeniu nerkowym (Imig i wsp., 1996), podczas gdy 5,6-EET działają na nie naczyniokurcząco (Caroll i wsp., 1990; Imig i wsp., 1996). Infuzja 8,9- i 5,6-EET bezpośrednio do tętnicy nerkowej szczura *in vivo* obniża filtrację oraz całkowity przepływ krwi przez nerkę (Katoch i wsp., 1991; Takahashi i wsp., 1990).



### **Szlak $\omega$ -hydroksylacji zależnej od CYP-450**

$\omega$ -hydroksylaza jest enzymem katalizującym proces przekształcania kwasu arachidonowego, w szlaku monooksygenacji zależnej od cytochromu P-450, w związku typu HETE. Głównymi powstającymi tak metabolitami są kwasy 19- i 20-hydroksyeikozatetraenowe (19- i 20-HETE), przy czym ten ostatni jest szczególnie interesujący ze względu na swoje działanie wewnątrznerkowe.

Opisano cztery główne rodziny enzymu  $\omega$ -hydroksylazy: 4A, 4F, 4B, 2J. W obrębie rodzin opisano izoformy (podrodziny), występujące odpowiednio w różnych narządach; np. enzymy z podrodzin CYP4F2, CYP4A11 oraz 4F12 wydają się być głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za powstawanie 20-HETE w ludzkiej nerce oraz w wątrobie, natomiast enzymy z rodziny CYP4A (CYP: 4A1, 4A2, 4A3, 4A8) poza wątrobą lokalizowane są również w mózgu szczurów (Gibson, 1989; Helvig, 1989; Stec, 1996).

### **Mechanizm działania 20-HETE**

Kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy jest syntetyzowany przez komórki mięśni gładkich naczyń. Jest on czynnikiem kurczącym drobne tętniczki, o średnicy do 100 $\mu$ m, natomiast wywiera mały lub wręcz zerowy efekt naczyniokurczący w większych tętnicach. Wydaje się, że brak aktywności 20-HETE w dużych naczyniach może mieć związek z różnicami w ekspresji kanałów potasowych w dużych i małych naczyniach (Roman, 2002). Dotychczas nie stwierdzono obecności specyficznych receptorów dla 20-HETE, wydaje się, że działa on w najbliższej okolicy miejsca swej syntezy (Roman, 2002). Związek ten wykazuje naczyniokurczące działanie na łożyska naczyniowe nerek, mózgu oraz mięśni szkieletowych. Mechanizm jego działania polega na depolaryzacji komórek mięśni gładkich



ścian naczyń, wtórnym zahamowaniu aktywności przewodnictwa kanałów potasowych zależnych od wapnia oraz na zwiększeniu przewodnictwa kanałów wapniowych typu-L (ang. Large-conductance).

### **Lokalizacja i działanie 20-HETE w nerce**

Enzymy CYP-450 z rodziny 4A i 4F produkujące 20-HETE zlokalizowane są w tętniczkach nerkowych, kłębuszkach, w perycytach otaczających rdzeniowe naczynia proste (vasa recta), ponadto ich obecność stwierdza się w kanaliku proksymalnym oraz korowym i rdzeniowym odcinku ramienia wstępującego pętli Henlego (Hoagland i wsp., 2001).

Powstający w komórkach mięśni gładkich naczyń 20-HETE, jest potężnym czynnikiem naczyniokurczącym wpływającym na proces autoregulacji przepływu krwi w nerce (Hoagland i wsp., 2001). 20-HETE powstający w płamce gęstej kanalika dystalnego oraz w tętniczce doprowadzającej kłębuszka kurczy tę ostatnią, co sugeruje, że na poziomie tętniczki doprowadzającej, jest on drugim przekaźnikiem dla innych mediatorów powstających w tym obszarze (Roman, 2002). Ponadto 20-HETE wykazuje istotne działanie natriuretyczne poprzez hamowanie ATP-azy sodowo-potasowej w błonie podstawnobocznej komórek kanalika proksymalnego oraz ko-transportu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  w ramieniu wstępującym pętli (Maier i Roman, 2001).

Powstawanie produktów  $\omega$ -hydroksylacji w nerce jest regulowane przez czynniki hormonalne i parakryne oraz jest wyraźnie zależne od zawartości sodu w diecie (Imig, 2000a). Aktywność enzymów metabolizujących AA modulowana jest, poza sodem również przez inne czynniki takie jak dieta wysokotłuszczowa, cukrzyca oraz zatrucie ciężowe. Do czynników stymulujących syntezę i uwalnianie 20-HETE zaliczamy angiotensynę II, endotelinę i serotoninę.



### **Pochodne kwasu arachidonowego a TGF**

Jak już wspomniano, autoregulacja przepływu przez nerkę jest modulowana przez kanalikowo-kłębuszkowe sprzężenie zwrotne. Ito i wsp. (1998) ustalili, że enzym  $\omega$ -hydroksylaza, odpowiedzialny za powstawanie 20-HETE jest obecny w tętniczkach doprowadzających i płamce gęstej, a Zou i wsp. (1994) potwierdzili jego istotne znaczenie jako czynnika wpływającego na aktywność kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego. Franco i wsp. (1988) potwierdzili, że pochodne AA wzmacniają odpowiedź TGF; dodanie 17-ODYA (17-octadecynoic acid, nieselektywny inhibitor szlaku monooksygenacji CYP-450) do płynu kanalikowego całkowicie odwracało działanie AA oraz całkowicie blokowało odpowiedź TGF (Zou i wsp., 1994).

### **Wpływ podaży sodu na aktywność metabolizmu AA w nerce szczura**

Jak wspomniano wcześniej, pochodne kwasu arachidonowego odgrywają ważną rolę w długoterminowej kontroli ciśnienia krwi. Pochodne szlaku epoksygenacji - EETs wykazują działanie naczyniorozszerzające oraz poprzez zahamowanie transportu kanalikowego przyczyniają się do zwiększonej natriurezy, przez co, w dwojaki sposób przeciwstawiają się rozwojowi nadciśnienia. Natomiast 20-HETE z jednej strony wykazuje działanie naczyniokurczące, a z drugiej, poprzez zahamowanie transportu, podobnie jak metabolity szlaku epoksygenacji, przyczynia się do zwiększonego wydalania sodu.

Jak już wspomniano, sód jest istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia choroby nadciśnieniowej. W wielu badaniach stwierdzono zależność pomiędzy dostawą sodu a aktywnością opisywanych szlaków. Między innymi ustalono, że aktywność białka CYP2C i



ilość metabolitów powstających w szlaku epoksygenacji AA wzrastają w nerce w odpowiedzi na zwiększoną podaż sodu (Imig, 2005; Capdevila i wsp., 2001; Makita i wsp., 1994; Zhao i wsp., 2003). U szczurów utrzymywanych na diecie wysokosodowej w nerce stwierdzono obniżenie aktywności białek CYP450-4A (odpowiedzialnych za syntezę 20-HETE) (Roman, 2002).

Wpływ soli na aktywność enzymów hydroksylacji zależy od ich lokalizacji w organizmie. Stwierdzono, że dieta wysokosodowa powoduje obniżenie nerkowej syntezy 20-HETE (Roman, 2002; Hoagland, 2003; Oyekan i wsp., 2005); natomiast podwyższa aktywność enzymatyczną i ilość powstającego 20-HETE w innych obszarach krążeniowych takich jak: tętnice krezkowe (Wang i wsp., 2005), tętniczki mięśni szkieletowych (Frisbee i wsp., 2000).

### **Interakcje pomiędzy *NO* a 20-HETE**

Interakcja pomiędzy NOS a CYP-450 może odbywać się na kilku poziomach; poza wspomnianą rolą sodu istnieje bezpośrednia biochemiczna zależność obydwu enzymów. Tlenek azotu w formie wolnego rodnika tworzy trwałe kompleksy ze zredukowanym jodem żelazawym w cząsteczce hemu, hamując w ten sposób NOS oraz inne enzymy, także CYP-450, posiadające tę formę hemu w swojej cząsteczce (Cooper, 1999). *NO* może modulować syntezę 20-HETE poprzez wiązanie oraz inaktywowanie cząsteczki hemu w enzymach CYP-450 (Fleming, 2001). Mediowane przez *NO* hamowanie syntezy 20-HETE, które w konsekwencji prowadzi do wzrostu przepływu rdzeniowego (mechanizm wash out) zostało zaproponowane jako przyczyna natriuretycznego i diuretycznego działania *NO*.

Wzajemna konkurencja szlaków enzymatycznych wchodzących w skład kaskady *NO* oraz CYP-450 oraz zróżnicowana podaż sodu w diecie mogą mieć kluczowe znaczenie dla



precyzyjnej współgry tych czynników w kontroli ukrwienia i czynności wydalniczej nerki a pośrednio także w długoterminowej kontroli ciśnienia krwi.

### **Udział *NO* i pochodnych AA zależnych od CYP-450 w długoterminowej kontroli ciśnienia krwi**

Zarówno *NO* jak i pochodne CYP-450, poprzez swój wpływ na czynność hemodynamiczną i wydalniczą nerki, wydają się odgrywać istotną rolę w długoterminowej kontroli ciśnienia krwi. Jak wspomniano wyżej, istnieje zależność pomiędzy enzymami CYP-450 a *NO*, dodatkowo istnieją zależności pomiędzy samymi metabolitami AA. Jak wiadomo związki typu EETs zwiększają prawdopodobieństwo otwarcia kanałów  $K^+_{Ca}$  i aktywują  $Na^+-K^+-ATP$ -azę, funkcjonalnie antagonizując naczyniokurczące działanie 20-HETE. Jak wspomniano, zarówno *NO* jak i 20-HETE, modyfikują aktywność kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego, wpływając na tempo filtracji kłębuszkowej, co sugeruje ich aktywny udział w kontroli ilości i składu wydalanego moczu, a co za tym idzie bilansu płynów ustrojowych.

Większość efektów biologicznych *NO* w nerce prowadzi ostatecznie do zwiększenia wydalania wody i substancji osmotycznie czynnych, a więc mają one działanie hipotensyjne.

Związek metabolitów AA, powstających w przekształceniach zależnych od CYP-450, z genezą nadciśnienia jest szczególnie interesujący, gdyż wykazują one działanie pro- jak i antyhipertensyjne. 20-HETE jako czynnik silnie naczyniokurczący sprzyja rozwojowi nadciśnienia, podczas gdy EET poprzez swoje działanie naczyniorozkurczające działa przeciwnie. W obrębie kanalika nerkowego omawiane metabolity hamują transport i zwiększają wydalanie sodu, przez co przeciwdziałają się rozwojowi nadciśnienia. Ponadto



20-HETE w dużej mierze odpowiedzialny też za uwrażliwienie TGF, może prowadzić do obniżenia filtracji kłębuszkowej, nerkowej retencji płynów i do podwyższania ciśnienia krwi.

W wielu przebadanych zwierzęcych modelach nadciśnienia stwierdzono zachwianą równowagę w produkcji metabolitów AA. Z jednej strony mamy modele nadciśnienia, w których rozwój choroby tłumaczy się obniżoną ekspresją białek CYP-450-4A. Należą tu m. in.: szczury Dahl SS (salt sensitive), u których stwierdza się zmniejszenie syntezy 20-HETE, spowodowane obniżeniem ekspresji białek CYP-450 4A, co powoduje obniżenie natriuretycznego działania tych pochodnych. Dodatkowo u tych zwierząt stwierdza się niezdolność do zwiększenia nerkowej produkcji EETs przy zwiększonym spożyciu sodu - co może potęgować rozwój nadciśnienia tętniczego z powodu obniżenia poziomu endogennych substancji natriuretycznych oraz braku jednego z czynników naczyniorozszerzających (Roman, 2002; Sarkis i Roman, 2004).

Z drugiej strony, w innych modelach nadciśnienia rozwój choroby wydaje się zależeć od wzrostu ekspresji tych samych białek CYP-450 4A. W tej grupie najdokładniej przebadanym modelem nadciśnienia są szczury spontanicznie rozwijające nadciśnienie (Spontaneously Hypertensive Rats -SHR). Charakteryzują się one gwałtownym wzrostem ciśnienia krwi pomiędzy 5 a 10 tygodniem życia skojarzonym ze wzrostem produkcji 20-HETE. Jest to faza rozwoju choroby nadciśnieniowej. W ustalonej fazie nadciśnienia nie stwierdza się natomiast żadnych różnic w produkcji 20-HETE pomiędzy szczurami SHR a ich normotensyjną kontrolą, szczurami Wistar-Kyoto (WKY) (Roman, 2002; Sarkis i Roman, 2004).

W farmakologicznym modelu nadciśnienia – typ DOCA-salt, szczurom na diecie wysokosodowej podaje się octan deoksykortykosteronu (DOCA), symulując zwiększoną aktywność kory nadnerczy, co w konsekwencji stymuluje retencję sodu. Ponadto u zwierząt



tych stwierdza się wzrost poziomu endoteliny będącej czynnikiem stymulującym powstawanie 20-HETE (Roman, 2002; Sarkis i Roman, 2004).

W związku z brakiem jednoznacznych wniosków co do roli opisywanych substancji parakrynnych w kontroli ciśnienia krwi, zwłaszcza w warunkach zmiennej podaży sodu, wydaje się istotne przebadanie ich wzajemnych zależności u zwierząt nie posiadających żadnych genetycznych predyspozycji do nadciśnienia.



## **CEL PRACY**

1. Zbadanie znaczenia tlenu azotu i produktów monooksygenacji AA zależnej od CYP-450, a także interakcji tych dwóch układów w regulacji krążenia wewnątrznerkowego i czynności wydalniczej nerek.
2. Ustalenie w jaki sposób wyniki ingerencji w funkcjonowanie dwóch wymienionych układów (NOS i CYP-450) zależą od podaży sodu w diecie.
3. Próba ustalenia wpływu indukowanych zmian krążenia wewnątrznerkowego (szczególnie ukrwienia rdzenia nerki) oraz czynności wydalniczej nerki na kształtowanie się ciśnienia tętniczego u szczurów zdrowych w warunkach niskiej i wysokiej podaży sodu w diecie.



### **3.1. Materiał doświadczalny**

Badania prowadzono na szczurach samcach o ciężarze ciała 250-310g. Szczury pochodziły ze stada Wistar Cmd: (WI)WU, ze Zwierzętarńi IMDiK PAN.

Projekt badań uzyskał pozytywną opinię Pierwszej Lokalnej Komisji Etycznej. Wszystkie pomiary doświadczalne przeprowadzono u szczurów w uśpieniu ogólnym, w doświadczeniach ostrych. Doświadczenia te były poprzedzone różnymi zabiegami wstępnymi.

#### **Wstępne przygotowywanie zwierząt**

Przed doświadczeniem ostrym zwierzęta otrzymywały *ad libitum* wodę oraz paszę o różnej zawartości sodu, SSNIFF (GmbH, Soest, Niemcy).

- Dieta standardowa, (STD). Szczury otrzymywały paszę hodowlaną o zawartości sodu 0,25% w/w.
- Dieta niskosodowa, (LS). Szczury otrzymywały paszę niskosodową (0,15% Na<sup>+</sup>) przez 10 kolejnych dni przed doświadczeniem ostrym.
- Dieta wysokosodowa, (HS). Szczury otrzymywały paszę wysokosodową (4% Na<sup>+</sup>) przez 21 kolejnych dni przed doświadczeniem ostrym.

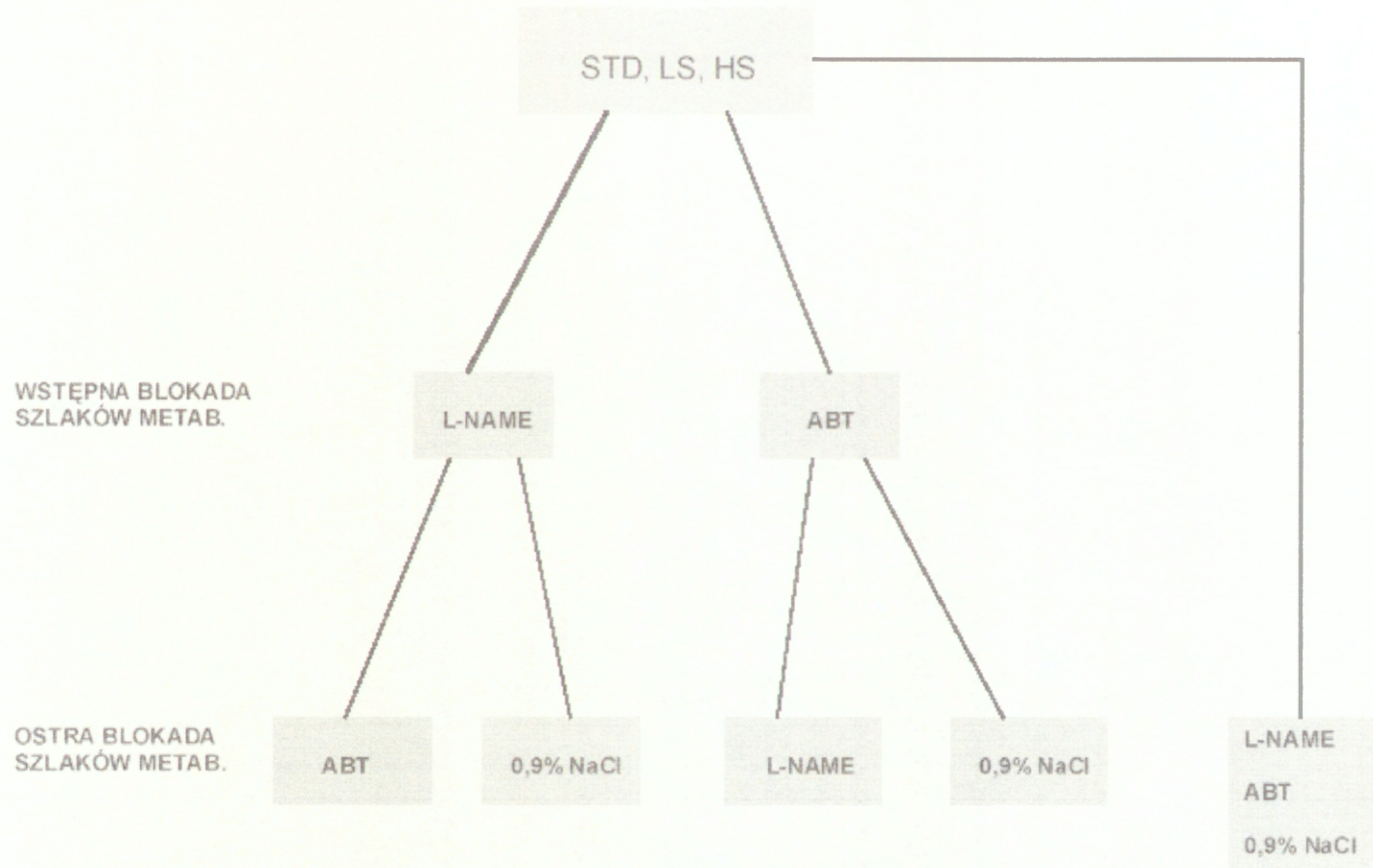
**W części doświadczeń**, na tle diet stosowano wstępną blokadę syntaz tlenu azotu (NOS) lub blokadę monooksygenacji kwasu arachidonowego (AA) zależnej od cytochromu P-450 (w dalszym tekście dla uproszczenia określaną jako blokada CYP-450).

W celu wstępnego blokowania NOS zwierzętom podawano do picia, przez 4 kolejne doby poprzedzające doświadczenie ostre, roztwór estru metylowego-Nitro-L-argininy (L-NAME, Sigma) w stężeniu 50 mg/1000 ml. W celu wstępnego zablokowania CYP-450 wstrzykiwano dootrzewnowo (i.p.) roztwór 1-aminobenzotriazolu (ABT, Sigma Fluka GmbH,



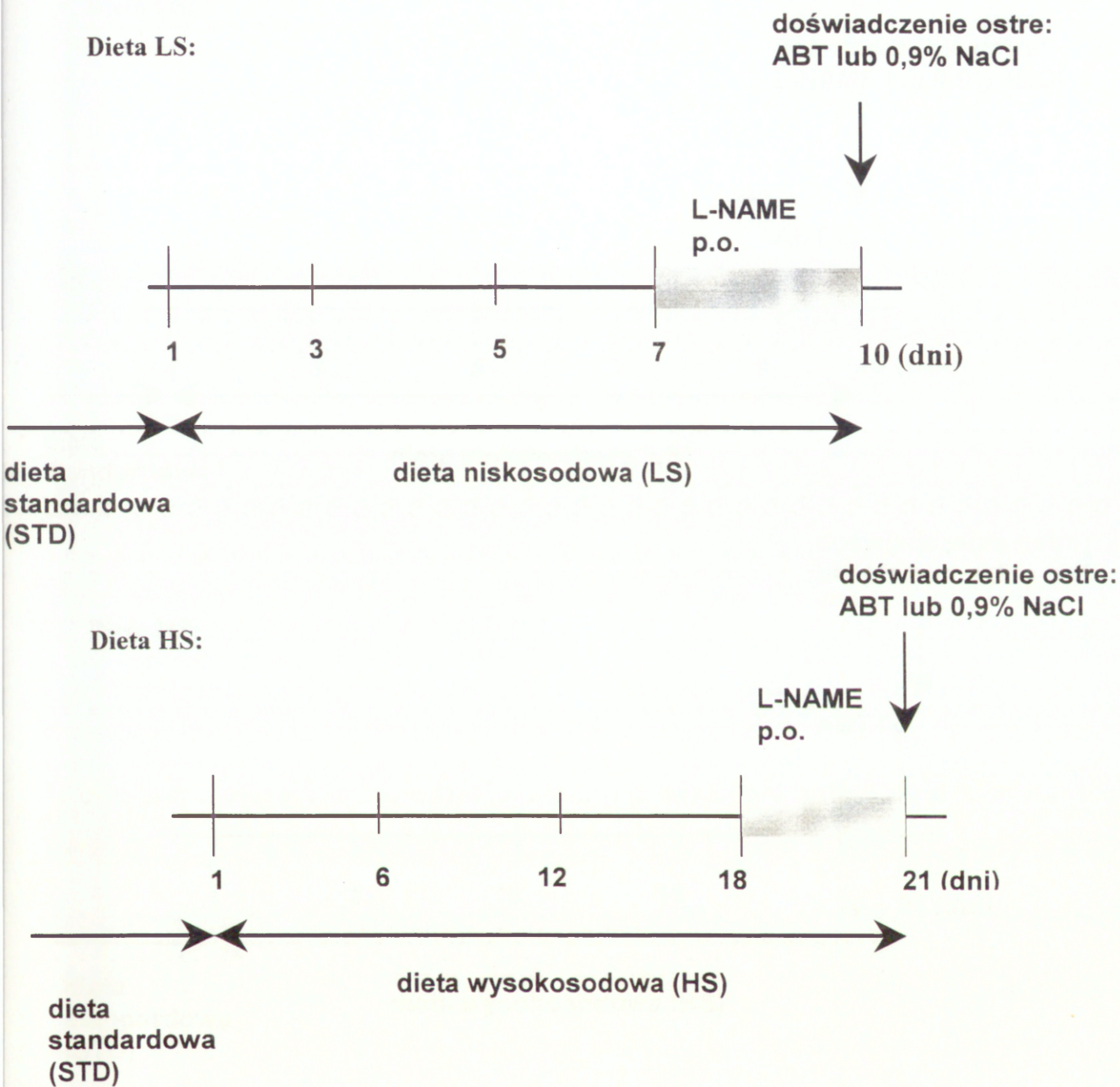
Netherlands) 50 mg/kg c.c. w objętości 0,5 ml 0.9% NaCl. Iniekcję wykonywano w odstępie 24 godzin, przez 2 kolejne dni przed doświadczeniem ostrym. Plan badań dla zwierząt, u których wstępnie blokowano NOS i zwierząt, u których wstępnie blokowano CYP-450 przedstawiono na Ryc. 4 i 5. W dniu właściwego doświadczenia ostrego zwierzęta osiągały ciężar ciała ok. 300 g.





*Ogólny schemat zastosowanych procedur doświadczalnych. STD, LS, HS - zastosowane rodzaje pasz, L-NAME, ABT - zastosowane inhibitory badanych szlaków, 0,9% NaCl zastosowany rozpuszczalnik stosowanych inhibitorów.*



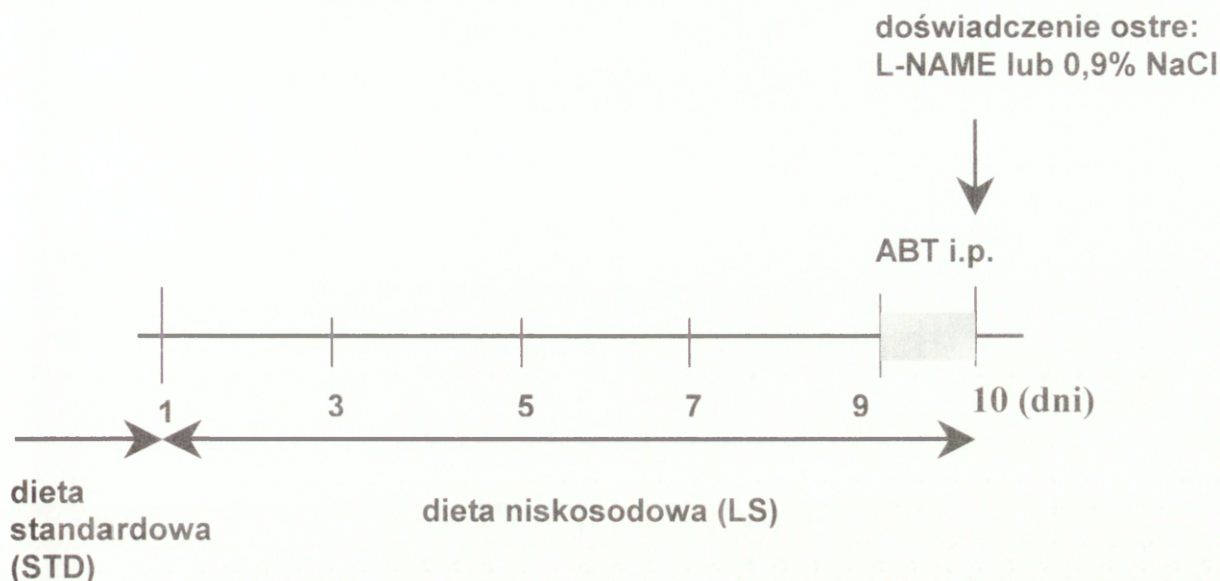


**Ryc. 4. Sposób przeprowadzania badań u zwierząt, u których wstępnie blokowano syntezę NO (górny schemat: dieta niskosodowa (LS); dolny schemat: dieta wysokosodowa (HS)). Badania prowadzono wg. planu: dieta (LS, HS)–dieta + przygotowanie wstępne (L-NAME) - doświadczenie ostre.**

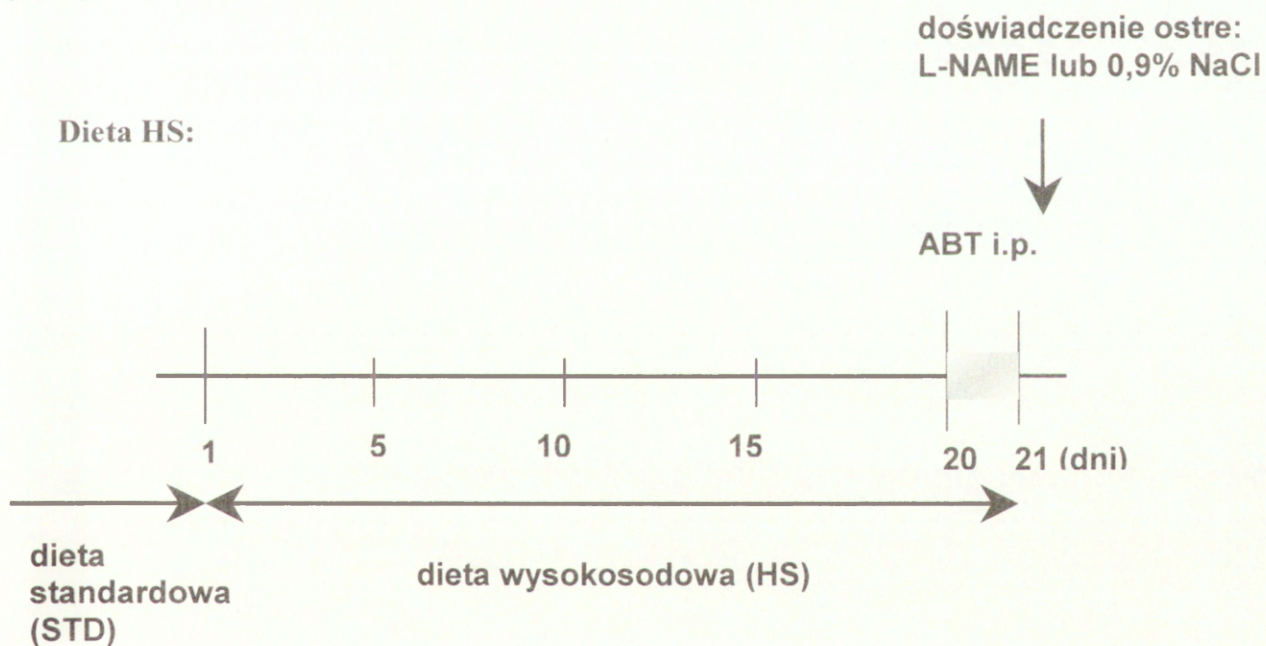
**Uwaga: zwierzęta wstępnie traktowane L-NAME w doświadczeniu ostrym otrzymywały ABT lub 0,9% NaCl (kontrola).**



Dieta LS:



Dieta HS:



Ryc. 5. Sposób przeprowadzania badań u zwierząt, u których wstępnie blokowano aktywność enzymów CYP-450 (górny schemat: dieta niskosodowa (LS); dolny schemat; dieta wysokosodowa (HS)). Badania prowadzono wg. planu: dieta (LS, HS)-dieta + przygotowanie wstępne (ABT) - doświadczenie ostre.

Uwaga: Zwierzęta wstępnie traktowane ABT w doświadczeniu ostrym otrzymywały L-NAME lub 0,9% NaCl (kontrola).



**Doświadczenia ostre: przygotowanie chirurgiczne**

Szczury usypiano za pomocą podawanej dootrzewnowo soli sodowej kwasu tiobarbiturowego (Thiopental, Biochemie GmbH, Vienna, Austria) – w dawce 100 mg/kg ciężaru ciała. Thiopental (suchy proszek) rozpuszczano w wodzie destylowanej; objętość płynu dostarczana zwierzęciu z narkozą odpowiadała ok. 0,2% masy ciała. W czasie doświadczenia kontrolowano odruchy rogówkowe dla oceny głębokości narkozy i w razie potrzeby dodawano Thiopental dożylnie. W czasie całego doświadczenia mierzono rektalną temperaturę ciała szczura za pomocą czujnika termistorowego. Utrzymywano stałą ciepłotę ciała (ok. 37°C) przy użyciu płytki grzejnej, na której zwierzę leżało w trakcie doświadczenia.

Po odsłonięciu tchawicy umieszczano w niej rurkę polietylenową poprawiającą drożność dróg oddechowych i umożliwiającą w razie potrzeby usuwanie zbierającej się w nich wydzieliny. Średnie ciśnienie tętnicze krwi mierzono za pomocą kaniuli wprowadzonej do tętnicy udowej. Kaniula była połączona z przetwornikiem ciśnienia współpracującym z miernikiem ciśnienia (Stoelting 50110, Wood Dale, USA). Utratę płynów podczas interwencji chirurgicznej wyrównywano podając 3% roztwór albuminy wołowej (AppliChem GmbH, Darmstadt, Niemcy) w roztworze Ringera (Polfa, Polska), w infuzji 3 ml/h. przez kaniulę umieszczoną w żyłę udowej. Przez tę samą kaniulę podawano infuzję 0,9% soli fizjologicznej (Polfa, Polska) oraz substancji czynnych.

Lewą nerkę odsłaniano z cięcia lędźwiowego, w delikatny sposób uwalniano z otaczającej tkanki łącznej oraz unieruchamiano w pojemniczku powszechnie używanym w mikropunkcyjnych badaniach kanalików nerkowych. Tak wyeksponowaną nerkę zabezpieczano przed wysychaniem przykrywając ją płatkami ligniny nasączonymi płynem Ringera. Po wypreparowaniu moczowodu wprowadzano do niego cewnik umożliwiający zbiórkę moczu. Odsłaniano miejsce odejścia tętnicy nerkowej od tętnicy głównej (aorty).



Tętnicę nerkową delikatnie wypreparowywano z otaczających tkanek i oddzielano od żyły nerkowej, odsłaniając ją na długości około 2 mm.

### **Pomiary ukrwienia nerki**

Sondę ( $\varnothing$  1 mm) do mierzenia przepływu całkowitego krwi przez nerkę umieszczano na tętnicy nerkowej i podłączano do przepływomierza ultradźwiękowego typu Transonic (typ T 106 S, Transonic System Inc., NY, USA).

Do pomiaru przepływu krwi przez rdzeń nerki (MBF) używano sondy igłowej światłowodowej PF 402, ( $\varnothing$  0,45 mm), którą wkłuwano na głębokość 5 mm, tak aby koniec znajdował się w obrębie rdzenia wewnętrznego, w pobliżu granicy z rdzeniem zewnętrznym. Przepływ krwi przez korę nerki (CBF) był mierzony za pomocą sondy PF 407 ( $\varnothing$  0,5 mm) umieszczonej na powierzchni nerki. Obie sondy były połączone z dwukanałowym przepływomierzem typu laser-Doppler (PeriFlux, 4001). Zestaw ten mierzy tzw. "laser-Doppler flux", odpowiadający iloczynowi liczby cząsteczek (krwinek) poruszających się w polu widzenia czujnika ( $<1 \text{ mm}^3$ ) oraz ich średniej szybkości. Wartość przepływu wyrażano w arbitralnych jednostkach perfuzji (PU; 1000 PU=10V). Każda z sond była kalibrowana. Standardowy impuls kalibracyjny uzyskiwano przez umieszczenie sondy w zawieszynie lateksu wykazującej ruchy Browna („motility standard”).

### **Pomiar tlenu azotu (NO) w nerce *in situ***

Do pomiaru NO w tkance nerki używano miernika amperometrycznego ISO-MARK II (World Precision Instruments, USA) oraz sondy elektrochemicznej ISO-NOP200 tej samej firmy. Metoda elektrochemiczna (amperometryczna) z wykorzystaniem elektrod selektywnych dla NO jest obecnie jedyną bezpośrednią i czułą metodą, która pozwala w realnym czasie wykrywać NO w tkankach i roztworach.



Tlenek azotu ulega utlenieniu na powierzchni elektrody roboczej, generując niewielki prąd redox:  $\text{NO} - e \rightarrow \text{NO}^+$ . Prąd redox płynący pomiędzy elektrodą roboczą a referencyjną, mierzony za pomocą bardzo czułego amperomierza, jest proporcjonalny do ilości utlenionego *NO*. Sonda ISO-NOP200 używana do pomiaru *NO* w rdzeniu nerki składa się z włókna węglowego otoczonego błoną selektywnie przepuszczalną dla tlenku azotu (elektroda robocza) oraz elektrody referencyjnej Ag/AgCl. Średnica przekroju sondy wynosiła 0,2 mm a długość elementu mierzącego wynosiła od 2 do 3 mm, w zależności od egzemplarza. Sondę wkładano na głębokość 6 mm pod kątem około 60° do powierzchni nerki. Szczyt sondy w tym położeniu osiągał rdzeń wewnętrzny, zaś prawie cały element mierzący sondy pogrążony był w rdzeniu nerki.

Procedura kalibracyjna sondy ISO-NOP200 *in vitro* opierała się na kontrolowanej reakcji rozkładania roztworu S-nitrozo-N-acetylopenicylaminy (SNAP), (zsyntetyzowanej przez prof. A. Lipkowskiego w Instytucie Chemii Przemysłowej w Warszawie) w obecności katalizatora (CuCl). Pochodzące z SNAP znane ilości *NO* powodowały wygenerowanie przez sondę sygnału elektrycznego mierzonego w nA, co pozwalało na wykreślenie krzywej kalibracyjnej. W trakcie badań użyto kilku sond ISO-NOP 200 ze względu na ich postępującą utratę aktywności oraz podatność na uszkodzenia.

### **Przebieg ostrego doświadczenia**

Po chirurgicznym przygotowaniu zwierząt i umieszczeniu sond, odczekiwano 40-60 min; był to czas potrzebny do ustabilizowania mierzonych parametrów czynnościowych zwierzęcia. W okresie stabilizacji szczury otrzymywały infuzję 3% albuminy wołowej z prędkością 4 ml/h. Po okresie stabilizacji rozpoczynano właściwe doświadczenie, które przebiegało według jednakowego schematu we wszystkich badanych grupach (Ryc. 6, 7). Składało się ono z sześciu 30 minutowych okresów, z których dwa



pierwsze stanowiły okresy kontrolne. W okresach kontrolnych szczury otrzymywały infuzję 0,9% NaCl z prędkością 3,1 ml/h.

Następnie podawano substancję czynną: ABT lub L-NAME, w postaci, odpowiednio, trwającego 10 min wlewu dożylnego (6 ml/h), lub w formie trwającej do końca doświadczenia infuzji (3,1 ml/h).

W czasie całego doświadczenia zbierano mocz w celu określenia diurezy minutowej, tempa wydalania sodu i wydalania substancji osmotycznie czynnych.

Na zwierzętach przygotowanych w opisany powyżej sposób przeprowadzono doświadczenia, w których mierzono w lewej nerce:

1. całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF),
2. ukrwienie tkanki nerkowej (metodą laser-Doppler):
  - a. przepływ krwi przez korę nerki (CBF),
  - b. przepływ krwi przez rdzeń nerki (MBF),
3. sygnał *NO* mierzony w rdzeniu nerki, z sondy ISO-NOP 200.

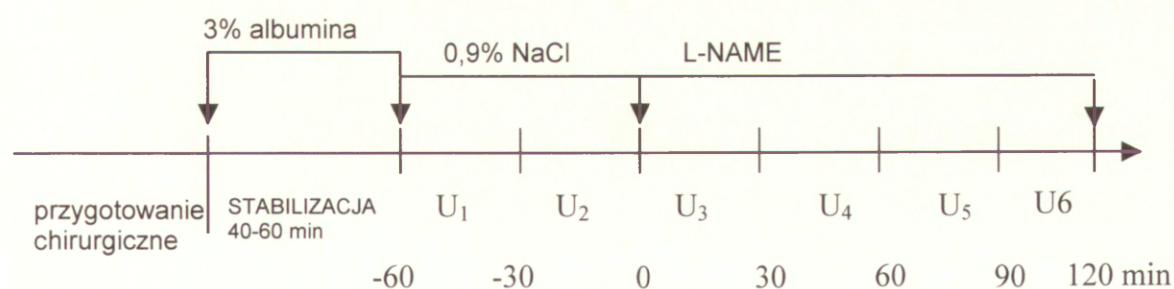
Ponadto oznaczano

4. parametry wydalnicze nerki: diurezę minutową ( $V$ ), wydalanie sodu ( $U_{Na}V$ ) i substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osm}V$ ), oraz
5. średnie ciśnienie krwi (MAP).



**3.2. Protokoły doświadczeń****3.2.1. Wpływ ostrej blokady NOS na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki****Ostra blokada NOS u zwierząt nie otrzymujących uprzednio ABT**

Przed doświadczeniem ostrym szczury utrzymywano na dietach o różnej zawartości sodu: na diecie standardowej (STD), niskosodowej (LS, przez 10 dni), wysokosodowej (HS, 21 dni). Po chirurgicznym przygotowaniu i założeniu sond do pomiaru RBF, CBF, MBF i NO szczury odbywały okres stabilizacji 40-60 min., a następnie przeprowadzano doświadczenie ostre wg. następującego schematu:



**Ryc. 6. Przebieg doświadczenia ostrego. U<sub>1</sub>-U<sub>6</sub>: 30-minutowe okresy pomiarowe i zbiórki moczu. Zaznaczono czas trwania infuzji 0,9% NaCl i infuzji L-NAME.**

Po stabilizacji realizowano łącznie sześć 30-minutowych okresów pomiarowych i zbiórki moczu. W czasie 2 okresów kontrolnych szczury otrzymywały infuzję 0,9% NaCl a w



czasie kolejnych 4 okresów doświadczalnych infuzję nieselektywnego inhibitora syntezy tlenku azotu - (L-NAME), w dawce 15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , z szybkością 3,1 ml/h. W opisany sposób przebadano 3 grupy szczurów:

Grupa 1. STD (L-NAME), n=8

Grupa 1. LS (L-NAME), n=6

Grupa 1. HS (L-NAME), n=7

### **Ostra blokada NOS po wstępnym blokowaniu CYP-450**

Przed doświadczeniem ostrym szczury utrzymywano na dietach o różnej zawartości sodu: na diecie standardowej (STD), niskosodowej (LS, przez 10 dni), wysokosodowej (HS, przez 21 dni.). W czasie 2 ostatnich dni diety (patrz Ryc.5), szczury otrzymywały dootrzewnową iniekcję 1-aminobenzotriazolu (ABT, 50 mg/kg c.c.). Doświadczenie przebiegało wg. schematu opisanego poprzednio. W opisany sposób przebadano 3 grupy szczurów:

Grupa 2. STD+ABT(L-NAME), n=6

Grupa 2. LS+ABT(L-NAME), n=8

Grupa 2. HS+ABT(L-NAME), n=5

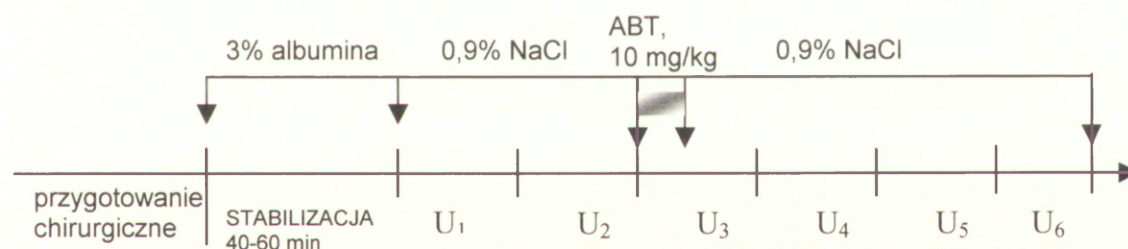
**Uwaga: w nawiasach substancja podawana w ostrym doświadczeniu.**



### 3.2.2. Wpływ ostrej blokady monooksygenacji zależnej od CYP-450 na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki

#### Ostra blokada CYP-450 u zwierząt nie otrzymujących uprzednio L-NAME

Przed doświadczeniem ostrym szczury utrzymywano na dietach o różnej zawartości sodu: na diecie standardowej (STD), niskosodowej (LS, przez 10 dni), wysokosodowej (HS, 21 dni). Po chirurgicznym przygotowaniu i założeniu sond do pomiaru RBF, CBF, MBF i NO szczury odbywały okres stabilizacji 40-60 min., a następnie przeprowadzano doświadczenie ostre wg. następującego schematu:



**Ryc. 7. Przebieg doświadczenia ostrego. U<sub>1</sub>-U<sub>6</sub>: 30-minutowe okresy pomiarowe i zbiórki moczu. Zaznaczono czas trwania infuzji 0,9% NaCl i krótkiej infuzji ABT.**

Po stabilizacji realizowano łącznie sześć 30-minutowych okresów pomiarowych i zbiorów moczu. W czasie 2 okresów kontrolnych oraz po podaniu krótkiej infuzji inhibitora cytochromu P-450 - 1-aminobenzotriazolu, w całkowitej dawce 10 mg/kg c.c., szczury otrzymywały infuzję 0,9% NaCl z prędkością 3,1 ml/h. W opisany sposób przebadano 3 grupy szczurów:

Grupa 3. STD (ABT), n=9

Grupa 3. LS (ABT), n=7

Grupa 3. HS (ABT), n=7



**Ostra blokada CYP-450 po wstępnym zablokowaniu NOS**

Przed doświadczeniem ostrym szczury utrzymywano na dietach o różnej zawartości sodu: na diecie standardowej (STD), niskosodowej (LS, przez 10 dni), wysokosodowej (HS, przez 21 dni). W czasie 4 dni przed doświadczeniem ostrym (patrz Ryc.4), szczury otrzymywały do picia *ad libitum* roztwór L-NAME (50 mg/1000 ml H<sub>2</sub>O dest).

Doświadczenie przebiegało wg. schematu opisanego w poprzednim podrozdziale. W opisany sposób przebadano 3 grupy szczurów:

Grupa 4. STD+L-NAME (ABT), n=7

Grupa 4. LS+L-NAME (ABT), n=7

Grupa 4. HS+L-NAME (ABT), n=6

**3.2.3. Grupy kontrolne**

Rozpuszczalnikiem dla L-NAME i ABT była sól izotoniczna (0,9% NaCl). W każdym z doświadczeń podawano ją w okresach kontrolnych (U<sub>1</sub> i U<sub>2</sub>) (tzw. solvent, vehicle control). Przeprowadzono jednak także badania w szeregu grup kontroli czasowej (time control). Doświadczenia te przeprowadzono wg. schematu analogicznego, jak opisane powyżej dla właściwych grup doświadczalnych.

Stosowano infuzje 0,9% NaCl trwające przez całe doświadczenie - kontrola dla podawanego w doświadczeniach ostrych L-NAME, bądź w formie krótkiej infuzji (6ml/h w ciągu 10 min) jako kontrola dla ABT. W ten sposób przebadano 6 grup szczurów:

Grupa 5. STD (0,9% NaCl), n=6

Grupa 5. LS (0,9% NaCl), n=5

Grupa 5. HS (0,9% NaCl), n=6

Grupa 5. STD+L-NAME (0,9% NaCl), n=3

Grupa 5. LS+L-NAME (0,9% NaCl), n=4

Grupa 5. HS+ABT (0,9% NaCl), n=3



W celu skontrolowania efektywności wstępnej blokady NOS oraz CYP-450, dodatkowo przebadano dwie grupy szczurów utrzymywanych na diecie standardowej. W pierwszej z nich szczurom, u których wstępnie blokowano NOS, w czasie doświadczenia ostrego podawano także L-NAME w infuzji. W drugiej grupie, szczurom po wstępnej blokadzie CYP-450, w czasie doświadczenia ostrego podawano ABT w formie szybkiego wlewu. Dawki i sposób podawania stosowanych środków były identyczne jak w doświadczeniach właściwych opisanych powyżej (patrz podrozdział 2.2.1. i 2.2.2). W ten sposób przebadano 2 grupy szczurów:

Grupa 6. STD+L-NAME (L-NAME), n=3

Grupa 6. STD+ABT (ABT), n=4

**Łącznie do badań wykorzystano 117 szczurów.**

### **3.3. Metody analityczne i obliczenia**

Mocz zbierano w wytarowanych probówkach Eppendorfa. Objętość moczu wyznaczano przez ważenie, przy założeniu, że jego ciężar właściwy nie odbiega istotnie od 1g/ml. Na tej podstawie wyliczano diurezę minutową (V) i wyrażano ją w  $\mu\text{l}/\text{min}$ . W moczu oznaczano także globalne stężenie wszystkich substancji osmotycznie czynnych (osmolalność całkowita) oraz stężenie jonów  $\text{Na}^+$ .

Osmolalność całkowita moczu ( $U_{\text{osm}}$ ) oznaczano w oparciu o pomiar obniżenia punktu parowania (osmometr Typ Wescor, USA) i wyrażano w  $\text{mOsm}/\text{kg H}_2\text{O}$ . Stężenie jonów sodowych ( $U_{\text{Na}^+}$ ) oznaczano za pomocą fotometru płomieniowego (Jenway model PFP 7/C, Anglia) i wyrażano w  $\text{mmol}/\text{l}$ . Znając wartość diurezy minutowej, osmolalności całkowitej i stężenie jonów sodu obliczano tempo wydalania substancji osmotycznie czynnych ( $U_{\text{osm}}V$ ,  $\mu\text{osm}/\text{min}$ ) i sodu ( $U_{\text{Na}}V$ ,  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ).



### **3.3.1. Analiza statystyczna**

W tekście, tabelach i na rycinach zaznaczono błąd standardowy średniej (SEM) jako miarę rozrzutu danych.

Wartości średnie dla indywidualnych punktów w czasie porównywano za pomocą testu t-Studenta dla zmiennych zależnych. Do porównań między grupami stosowano klasyczną odmianę ANOVA, a następnie zmodyfikowany test t-Studenta dla zmiennych niezależnych; nie stosowano wielokrotnych porównań.



#### 4.1. Wpływ diet o różnej zawartości sodu na średnie ciśnienie krwi oraz na parametry hemodynamiczne i czynność wydalniczą nerki

Dane dotyczące wartości średniego ciśnienia krwi oraz parametrów hemodynamicznych i wydalniczych nerek zwierząt utrzymywanych na diecie standardowej (STD), niskosodowej (LS) i wysokosodowej (HS) przedstawiono w Tabeli 1. Dane zebrano z okresów kontrolnych doświadczeń ostrych (różne serie eksperymentalne). Grupa STD stanowi kontrolę (poziom odniesienia) dla wartości zarejestrowanych u zwierząt utrzymywanych na diecie niskosodowej (LS) i wysokosodowej (HS).

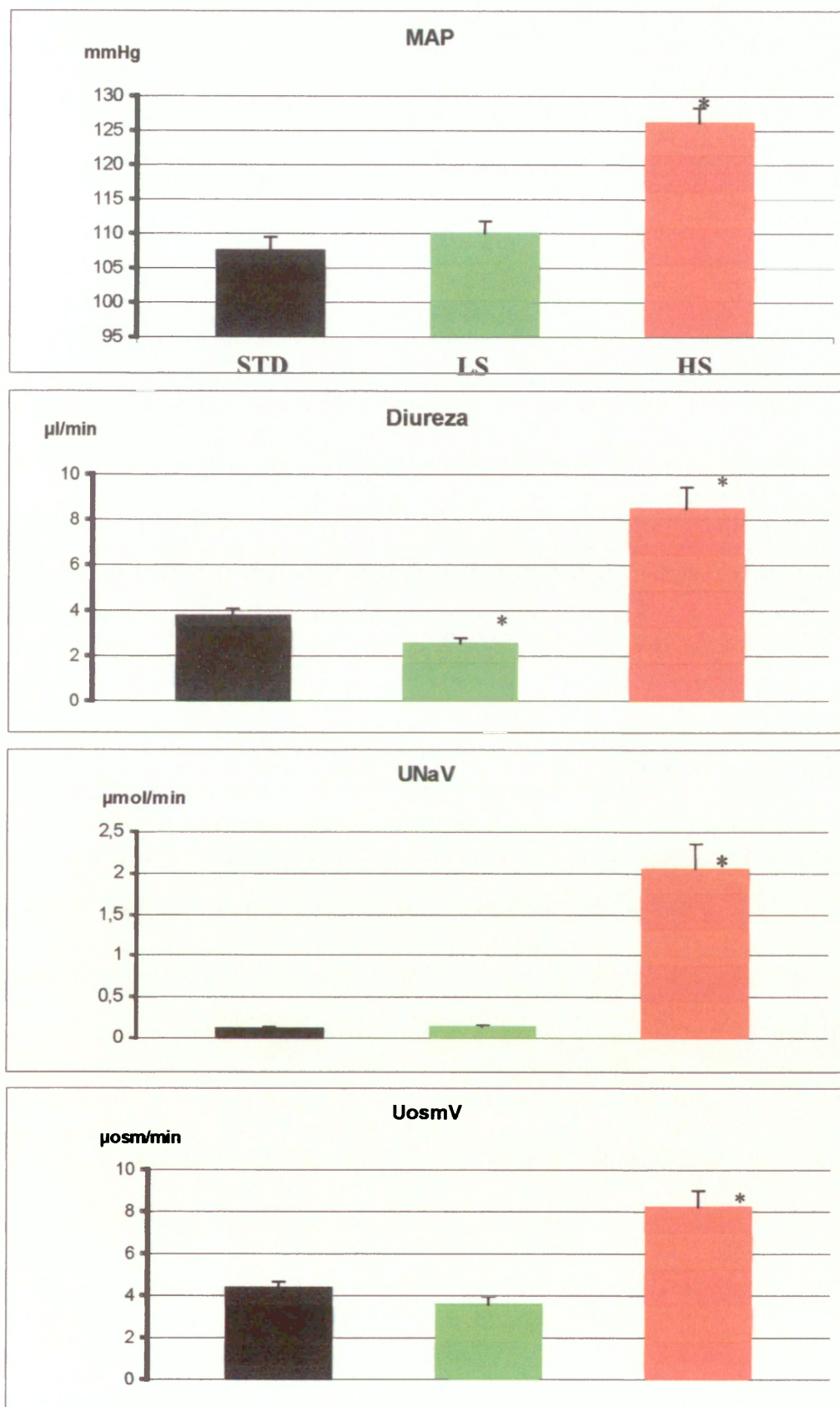
Zestawienie zależności średniego ciśnienia krwi (MAP) i parametrów wydalniczych nerki: diureza minutowa, nerkowe wydalanie sodu ( $U_{Na}V$ ) i substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osm}V$ ) od diet o różnej zawartości sodu przedstawiono na Ryc. 9, natomiast zestawienie średniego ciśnienia krwi (MAP) i parametrów hemodynamicznych nerki: całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF), przepływ krwi przez korę (CBF) i rdzeń (MBF) nerki, przedstawiono na Ryc. 10.

Parametr	Dieta STD	n	Dieta LS	n	Dieta HS	n
MAP (mmHg)	107 ± 2	49	110 ± 1	37	126 ± 2 *	37
RBF (ml/min)	6,7 ± 0,3	49	7,1 ± 0,5	37	9,9 ± 0,8 *	21
CBF (PU)	455 ± 10	7	530 ± 21 *	23	636 ± 21 *	41
MBF (PU)	133 ± 7	47	140 ± 10	37	142 ± 6	33
V (μl/min)	3,7 ± 0,3	47	2,5 ± 0,2 *	31	8,5 ± 0,9 *	37
$U_{osm}V$ (μosm/min)	4,3 ± 0,3	39	3,6 ± 0,4	18	8,2 ± 0,8 *	35
$U_{Na}V$ (μmol/min)	0,12 ± 0,02	37	0,14 ± 0,01	21	2,05 ± 0,3 *	29
NO rdzeń (pA)	7345 ± 368	20	7635 ± 469	17	8078 ± 313	19

**Tabela 1. Średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki u szczurów na diecie standardowej (STD, 0,25% Na<sup>+</sup>), niskosodowej (LS, 0,15%) i wysokosodowej (HS, 4,0%). Wartości średnie ± SEM, \* znamienne różnie od wartości uzyskanych na diecie standardowej STD, przy p<0,05.**

Oznaczenia: MAP - średnie ciśnienie krwi, RBF - całkowity przepływ krwi przez nerkę, CBF - przepływ krwi przez korę nerki, MBF - przepływ krwi przez rdzeń nerki, V - diureza minutowa,  $U_{osm}V$  - wydalanie substancji osmotycznie czynnych,  $U_{Na}V$  - wydalanie sodu, NO - sygnał NO mierzony w rdzeniu nerki.

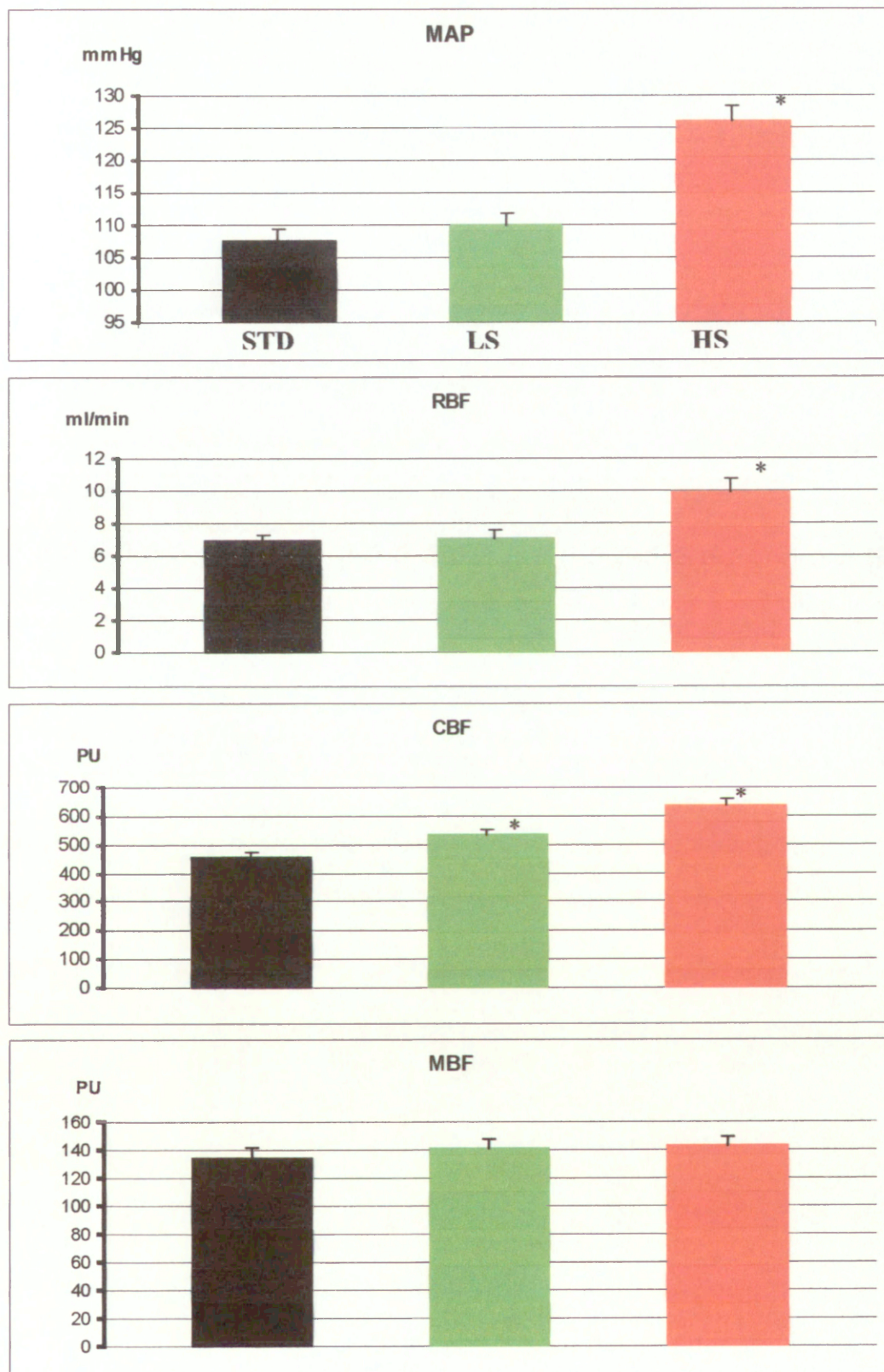




Ryc. 9. Zestawienie zależności średniego ciśnienia krwi (MAP) i parametrów wydalniczych nerki: diurezy minutowej, nerkowego wydalania sodu ( $U_{NaV}$ ) i substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osmV}$ ) od diet o różnej zawartości sodu.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zmiennie różne od wartości na diecie standardowej (STD).





Ryc. 10. Zestawienie średniego ciśnienia krwi (MAP) i parametrów hemodynamicznych nerki: całkowitego przepływu krwi przez nerkę (RBF), przepływu krwi przez korę (CBF) i rdzeń (MBF) nerki. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zmiennie różne od wartości dla diety standardowej (STD).



### **A. Wpływ diety niskosodowej**

Parametry czynnościowe u szczurów utrzymywanych na diecie niskosodowej (LS) były w większości zbliżone do rejestrowanych w grupie odniesienia (STD).

U zwierząt LS stwierdzono o 17% wyższy przepływ krwi przez korę nerki (CBF) oraz o 32% niższą diurezę niż u zwierząt otrzymujących paszę standardową (Tab.1, Ryc. 9 i 10). Różnice te były znamienne statystycznie.

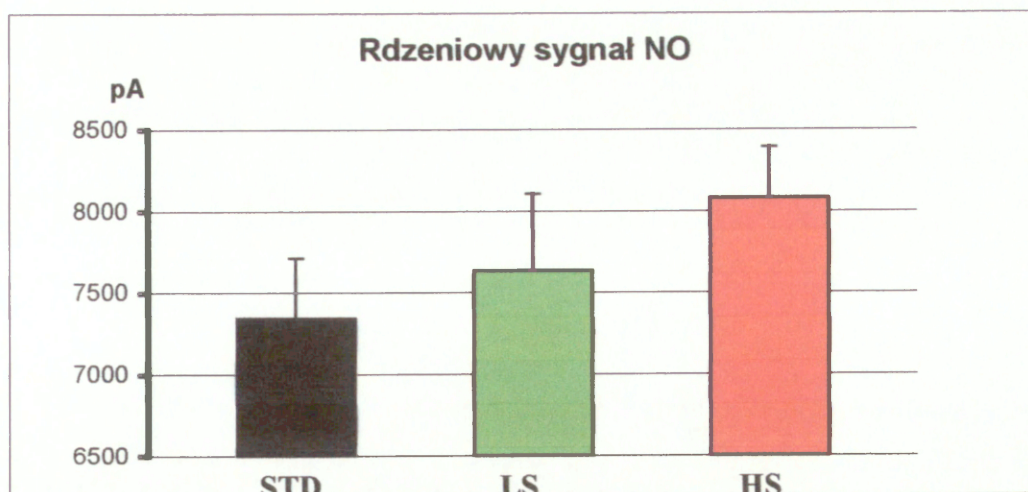
### **B. Wpływ diety wysokosodowej**

Zwierzęta otrzymujące paszę o zwiększonej zawartości sodu (4% Na) miały średnio o 19 mmHg (18%) wyższe ciśnienie krwi w stosunku do zwierząt otrzymujących paszę standardową (Tab. 1;  $p < 0,001$ ). Całkowity (RBF) oraz korowy (CBF) przepływ krwi przez nerkę były również istotnie wyższe niż na diecie standardowej. Różnica dla wartości średnich wynosiła odpowiednio 2,8 ml/min (48%,  $p < 0,003$ ) dla RBF oraz 181 PU (40%,  $p < 0,001$ ) dla CBF (Tab. 1; Ryc. 10).

Różnicom tym nie towarzyszyło większe ukrwienie w obrębie rdzenia nerki (MBF) (patrz Tab. 1 i Ryc. 10).

Jeszcze wyraźniejsze różnice dotyczyły wydalania wody i sodu. Szczury utrzymywane na diecie wysokosodowej miały ponad dwukrotnie wyższą diurezę ( $p < 0,001$ ) i aż dwudziestokrotnie wyższe wydalanie sodu ( $p < 0,001$ ) niż szczury otrzymujące paszę standardową. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osm}V$ ) było istotnie wyższe (o 3,9  $\mu\text{osm/kgH}_2\text{O}$ , 88%) niż u zwierząt STD ( $p < 0,001$ ) (Tab. 1 i Ryc. 9).





**Ryc. 11. Wartości sygnału NO mierzonego w rdzeniu nerki u szczurów utrzymywanych na dietach o różnej zawartości sodu.**

*Wartości średnie  $\pm$  SEM; STD n=20, LS n=17, HS n=19.*

U zwierząt otrzymujących dietę wysokosodową sygnał tlenku azotu mierzony w rdzeniu nerki był wyższy o 733 pA niż w grupie kontrolnej, aczkolwiek różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej (Ryc. 11).

#### **4.2. Wpływ chronicznego zablokowania syntaz tlenku azotu (NOS) na średnie ciśnienie krwi, parametry hemodynamiczne i czynność wydalniczą nerki**

Dane dotyczące parametrów hemodynamicznych i wydalniczych nerek oraz średniego ciśnienia krwi zebrano z okresów kontrolnych doświadczeń ostrych (serie eksperymentalne z chronicznym blokowaniem syntaz *NO*). Dla potrzeb tego opisu „chronicznym” blokowaniem NOS nazywam podawanie L-NAME przez 4 dni w okresie „wstępnego przygotowania zwierząt” (por. „Materiał i Metody”), dla jasnego odróżnienia od blokowania „ostrego” (w „ostrym” doświadczeniu).



Zgodnie z przewidywaniami zwierzęta otrzymujące doustnie przez 4 dni roztwór L-NAME miały podwyższone ciśnienie krwi oraz obniżone parametry hemodynamiczne nerek w porównaniu ze zwierzętami z odpowiednich grup kontrolnych, niezależnie od zastosowanej diety.

#### **A. Chroniczne blokowanie NOS na tle diety standardowej**

Dane dla zwierząt otrzymujących paszę o standardowej zawartości sodu u których chronicznie zablokowano syntezę *NO* zostały przedstawione w Tabeli 2. Grupę odniesienia dla zwierząt otrzymujących przewlekłe L-NAME stanowiły zwierzęta otrzymujące paszę standardową.

<b>Parametr</b>	<b>STD</b>	<b>STD+L-NAME</b>
MAP (mmHg)	107 ± 2 (49)	129 ± 2 * (28)
RBF (ml/min)	6,9 ± 0,3 (49)	4,8 ± 0,3 * (28)
MBF (PU)	133 ± 7 (47)	102 ± 4 * (28)
V (μl/min)	3,7 ± 0,3 (47)	4,6 ± 0,02 (24)
U <sub>osm</sub> V (μosm/min)	4,3 ± 0,3 (39)	5,4 ± 0,4 * (22)
U <sub>Na</sub> V (μmol/min)	0,12 ± 0,02 (37)	0,19 ± 0,02 (22)
<i>NO</i> rdzeń (pA)	7345 ± 368 (20)	7190 ± 414 (12)

**Tab. 2. Wpływ chronicznego zablokowania syntazy tlenku azotu (NOS) na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki u zwierząt utrzymywanych na paszy standardowej.**

Wartości średnie ± SEM, wartości „n” podano w nawiasach, \* znamienne różne od wartości kontrolnej (STD). Pozostałe oznaczenia jak w Tab. 1.

U zwierząt, u których w sposób chroniczny zablokowano syntazy tlenku azotu (NOS) ciśnienie krwi było średnio wyższe o 22 mmHg (21%,  $p < 0,05$ ). Całkowity (RBF) oraz rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę były istotnie niższe niż u zwierząt z grupy kontrolnej. Różnica dla wartości średnich wynosiła odpowiednio 2,1 ml/min (30,4%) dla RBF oraz 31 PU (23,3%) dla MBF (Ryc. 12 i Tab. 2).

Wydalenie substancji osmotycznie czynnych (U<sub>osm</sub>V) było istotnie wyższe niż u zwierząt STD (26%).



### B. Chroniczne blokowanie NOS na tle diety niskosodowej

Dane dla zwierząt otrzymujących paszę niskosodową u których chronicznie zablokowano syntazy *NO* zostały przedstawione w Tabeli 3. Grupę odniesienia stanowiły zwierzęta otrzymujące paszę niskosodową, bez L-NAME.

Parametr	LS	LS+L-NAME
MAP (mmHg)	110 ± 2 (37)	137 ± 2 * (16)
RBF (ml/min)	7,1 ± 0,5 (37)	4,4 ± 0,3 * (16)
CBF (PU)	531 ± 21 (23)	550 ± 44 (10)
MBF (PU)	140 ± 10 (37)	87 ± 7 * (16)
V (μl/min)	2,5 ± 0,2 (31)	2,5 ± 0,4 (12)
U <sub>osm</sub> V (μosm/min)	3,6 ± 0,4 (18)	3,4 ± 0,5 (12)
U <sub>Na</sub> V (μmol/min)	0,15 ± 0,01 (21)	0,07 ± 0,03 (10)
<i>NO</i> rdzeń (pA)	7635 ± 469 (17)	6990 ± 164 (5)

**Tab. 3. Wpływ chronicznego zablokowania NOS na ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki u zwierząt otrzymujących paszę niskosodową. Wartości średnie ± SEM, wartości „n” podano w nawiasach, \* zmiennie różne od wartości kontrolnej LS. Pozostałe oznaczenia jak w Tab. 1.**

Zwierzęta otrzymujące dietę niskosodową i w ciągu 4 dni poprzedzających pomiar - L-NAME miały istotnie wyższe MAP (o 27 mmHg, 25%), w porównaniu z grupą odniesienia (LS).

Całkowity i rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę u zwierząt otrzymujących L-NAME był niższy o 2,7 ml/min (36%) dla RBF i 53 PU (38%) dla MBF. Wydalanie sodu było niższe o 53% u zwierząt otrzymujących L-NAME - zmiana ta nie osiągnęła jednak istotności statystycznej.

U zwierząt otrzymujących paszę niskosodową rdzeniowy sygnał tlenu azotu był niższy po chronicznym zablokowaniu syntaz *NO*, różnica ta wynosiła 645 pA i nie osiągnęła istotności statystycznej. Również inne parametry nie wykazywały statystycznie istotnych różnic zależnych od L-NAME.



### C. Chroniczne blokowanie NOS na diecie wysokosodowej

Dane dla zwierząt otrzymujących paszę wysokosodową, u których w sposób chroniczny zablokowano NOS porównano z danymi uzyskanymi dla zwierząt otrzymujących jedynie ten sam rodzaj paszy (HS) i zestawiono w Tabeli 4.

Parametr	HS	HS+L-NAME
MAP (mmHg)	126 ± 2 (37)	154 ± 6 * (16)
RBF (ml/min)	9,9 ± 0,8 (21)	3,3 ± 0,2 * (16)
CBF (PU)	636 ± 21 (41)	330 ± 31 * (10)
MBF (PU)	142 ± 6 (33)	71 ± 6 * (16)
V (μl/min)	8,5 ± 0,9 (37)	22,1 ± 3,9 * (12)
$U_{osm}V$ (μosm/min)	8,2 ± 0,8 (35)	12,8 ± 1,4 * (12)
$U_{Na}V$ (μmol/min)	2,05 ± 0,30 (29)	2,59 ± 0,45 (10)
NO rdzeń (pA)	8078 ± 313 (19)	7025 ± 520 (4)

**Tab. 4. Wpływ chronicznego zablokowania NOS na ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki u szczurów utrzymywanych na paszy wysokosodowej.**

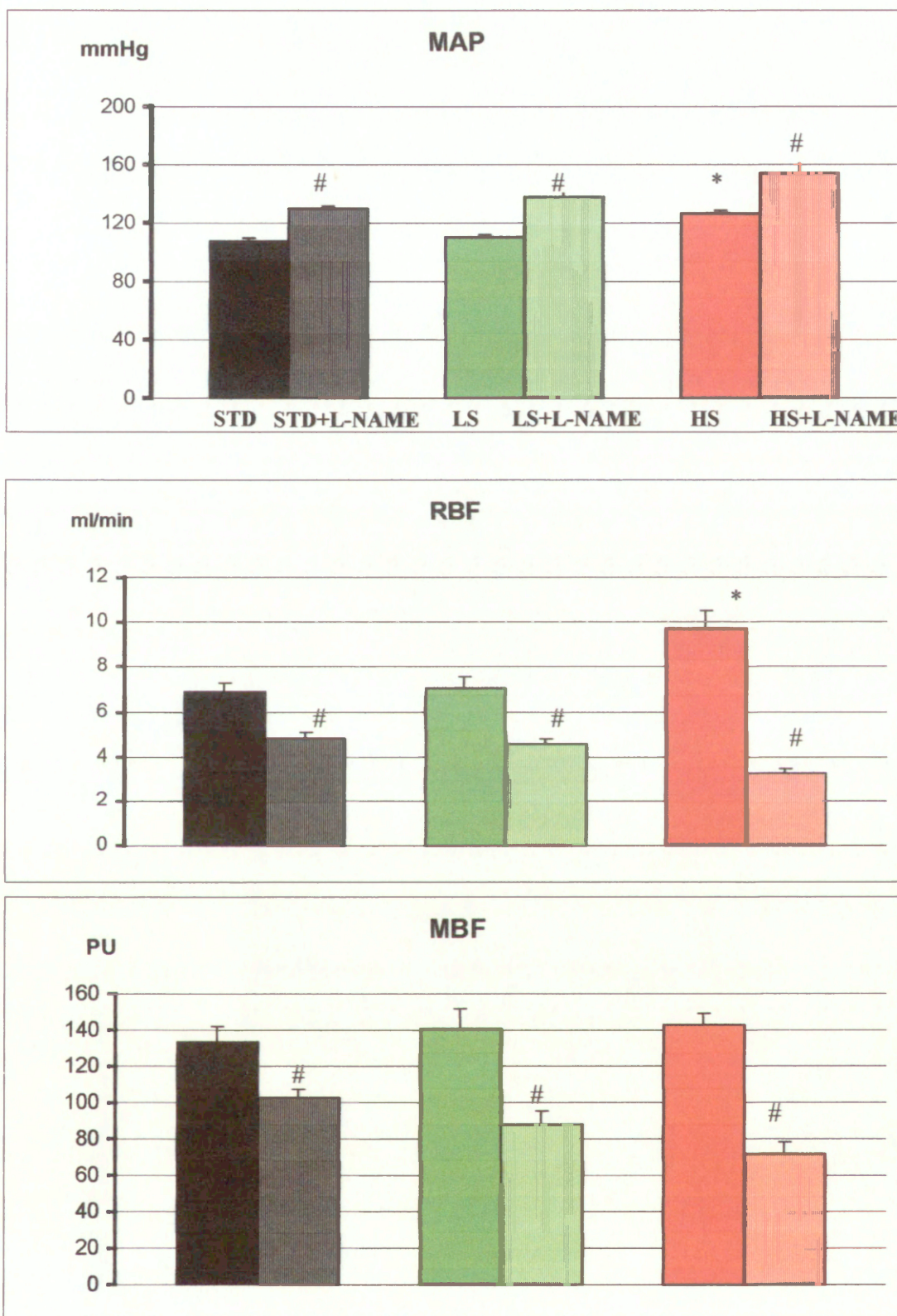
Wartości średnie ± SEM, wartości „n” podano w nawiasach, \* znamienne różne od wartości kontrolnej (HS). Pozostałe oznaczenia jak w Tab. 1.

Podobnie jak na diecie LS zwierzęta otrzymujące paszę wysokosodową i L-NAME miały ciśnienie krwi wyższe o 28 mmHg (+22%,  $p < 0,001$ ) niż w grupie kontrolnej (HS).

Całkowity, korowy i rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę u zwierząt otrzymujących L-NAME był niższy o 6,6 ml/min (-67%) dla RBF, o 306 PU (-48%) dla CBF i o 71 PU (-50%) dla MBF.

Wpływ chronicznego blokowania syntezy NO na ciśnienie tętnicze, całkowity przepływ krwi przez nerkę oraz ukrwienie rdzenia nerki u szczurów na każdej z 3 diet (STD, LS, HS) przedstawiono na Ryc. 12.

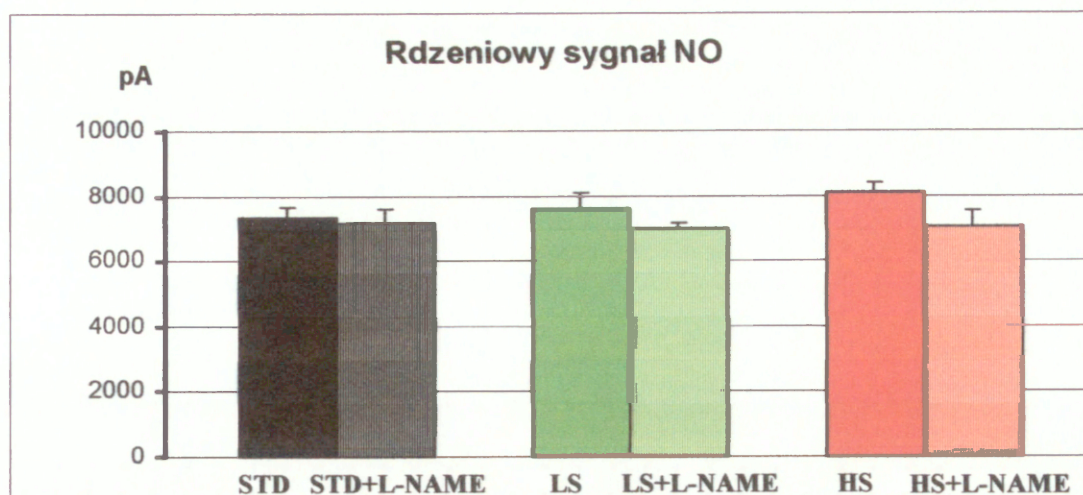




Ryc. 12. Wpływ chronicznego zablokowania syntaz tlenku azotu na średnie ciśnienie krwi (MAP), całkowity (RBF) oraz rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę (MBF) u zwierząt utrzymywanych na dietach o różnej zawartości sodu.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zmiennie różne od odpowiedniej wartości na diecie STD, # zmiennie różne od wartości u szczurów nie otrzymujących L-NAME. Słupki zakreskowane pionowo oznaczają grupy dietowe z zastosowaniem niespecyficznej blokady NOS.





Ryc. 13. Wartości sygnału NO mierzonego w rdzeniu nerki u szczurów utrzymywanych na dietach o różnej zawartości sodu oraz z zablokowanymi chronicznie syntazami NO. Wartości średnie  $\pm$  SEM.

Rdzeniowy sygnał tlenu azotu był niższy po chronicznym zablokowaniu syntaz NO u zwierząt otrzymujących paszę wysokosodową, różnica ta wynosiła 1053 pA, nie osiągnęła jednak istotności (Ryc. 13).

#### 4.3. Wpływ chronicznego zablokowania szlaku monooksygenacji kwasu arachidonowego zależnej od cytochromu P-450 na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki

Dane dotyczące średniego ciśnienia krwi, parametrów hemodynamicznych i wydalniczych nerek uzyskano z okresów kontrolnych doświadczeń ostrych przeprowadzanych w seriach eksperymentalnych z wykorzystaniem chronicznego zablokowania szlaku monooksygenacji kwasu arachidonowego (AA) zależnej od cytochromu P-450.



### A. Chroniczne blokowanie CYP-450 na tle diety standardowej

Dane dla zwierząt na diecie standardowej oraz zwierząt na tej diecie u których „chronicznie” blokowano szlak CYP-450 zostały zestawione w Tabeli 5.

Parametr	Dieta STD	Dieta STD + ABT
MAP mmHg	107 ± 2 (49)	105 ± 3 (12)
RBF ml/min	6,9 ± 0,3 (49)	6,4 ± 0,2 (12)
MBF PU	133 ± 7 (47)	171 ± 16 (12)
V μl/min	3,7 ± 0,3 (47)	1,6 ± 0,2 * (12)
U <sub>osm</sub> V μosm/min	4,4 ± 0,3 (39)	1,3 ± 0,2 * (8)
NO rdzeń pA	7345 ± 343 (20)	9260 ± 704 * (5)

**Tab. 5. Wpływ chronicznego zablokowania CYP-450 na średnie ciśnienie krwi oraz na parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki u zwierząt utrzymywanych na diecie standardowej. Kontrolę stanowiły zwierzęta otrzymujące wyłącznie paszę STD. Wartości średnie ± SEM, wartości „n” podano w nawiasach, \* zmiennie różne od wartości kontrolnej STD. Pozostałe oznaczenia jak w Tab.1.**

U zwierząt na diecie STD chroniczne zablokowanie aktywności szlaku CYP-450 nie zmieniło średnich wartości ciśnienia tętniczego (MAP) oraz całkowitego przepływu krwi przez nerkę (RBF), w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej (STD). Co bardzo ciekawe rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę był wyraźnie, choć niezmiennie wyższy u zwierząt STD+ABT, różnica ta wynosiła 38 PU (28,6%), (Tab. 5 i Ryc. 14).

Zwierzęta STD z chronicznie zablokowanym CYP-450 miały istotnie niższą diurezę o 2,1 μl/min (57%) oraz wydalanie substancji osmotycznie czynnych o -3,1 μosm/min (70,5%, p<0,001; Tab. 5 i Ryc. 16).

Rdzeniowy sygnał tlenu azotu był wyższy o 1915 pA, (p<0,05) u zwierząt STD z chronicznie zablokowanym szlakiem CYP-450 w porównaniu do zwierząt otrzymujących tylko paszę standardową.



**B. Chroniczne blokowanie CYP-450 na tle diety niskosodowej**

Parametr	Dieta LS	Dieta LS + ABT
MAP mmHg	110 ± 2 (37)	98 ± 2 * (16)
RBF ml/min	7,1 ± 0,5 (37)	6,7 ± 0,4 (16)
MBF PU	140 ± 10 (37)	179 ± 15 (16)
V µl/min	2,5 ± 0,2 (31)	2,0 ± 0,2 (16)
U <sub>Na</sub> V µmol/min	0,15 ± 0,01 (21)	0,08 ± 0,02 (16)
NO rdzeń pA	7635 ± 469 (17)	7742 ± 279 (7)

**Tab. 6. Wpływ chronicznego zablokowania CYP-450 na parametry hemodynamiczne nerek u zwierząt utrzymywanych na diecie niskosodowej. Kontrolę stanowią zwierzęta otrzymujące paszę LS.**

Wartości średnie ± SEM, \* znamienne różne od wartości kontrolnej LS. Pozostałe oznaczenia jak w Tab. 1.

U zwierząt utrzymywanych na diecie niskosodowej z chronicznie zablokowanym szlakiem monooksygenacji kwasu arachidonowego obserwowano niższą, średnio o 12 mmHg, wartość MAP (10%,  $p < 0,001$ ; Ryc. 14 i Tab. 6). Co bardzo ciekawe przepływ krwi przez rdzeń nerki był wyższy o +39 PU (28%), (Tab. 6) u zwierząt z chronicznie wyłączoną aktywnością enzymów szlaku CYP-450 w porównaniu do zwierząt z aktywnym szlakiem. Niestety zmiana ta nie osiągnęła znamienności.



## C. Chroniczne blokowanie CYP-450 na tle diety wysokosodowej

Parametr	Dieta HS	Dieta HS + ABT
MAP mmHg	126 ± 2 (37)	116 ± 3 * (18)
RBF ml/min	9,9 ± 0,8 (21)	11,1 ± 0,8 (18)
MBF PU	142 ± 6 (33)	176 ± 18 (18)
V $\mu$ l/min	8,5 ± 0,9 (37)	5,6 ± 0,9 * (16)
$U_{osm}V$ $\mu$ osm/kg H <sub>2</sub> O	8,2 ± 0,8 (35)	5,7 ± 1,7 (8)
$U_{Na}V$ $\mu$ mol/min	2,05 ± 0,30 (29)	1,05 ± 0,36 * (10)
NO rdzeń pA	8078 ± 313 (19)	9260 ± 704 (6)

**Tab. 7. Wpływ chronicznego zablokowania CYP-450 na parametry hemodynamiczne nerek u zwierząt utrzymywanych na diecie wysokosodowej. Kontrolę stanowią zwierzęta otrzymujące paszę HS**

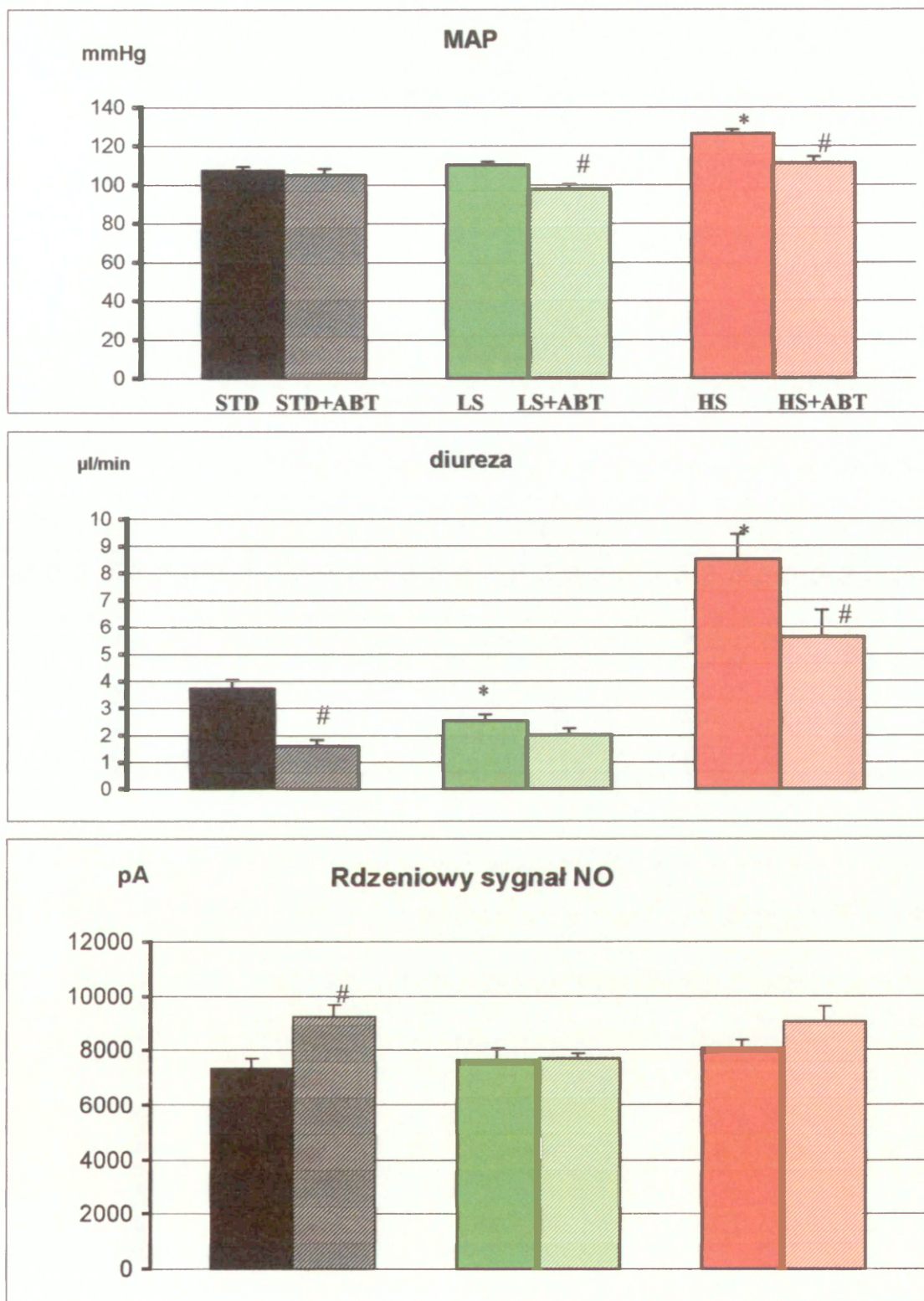
Wartości średnie  $\pm$  SEM. \* znamienne różne od wartości kontrolnej HS. Pozostałe oznaczenia jak w Tab. 1.

Wartość MAP była niższa o 10 mmHg (-8%,  $p < 0,002$ ) u zwierząt HS z chronicznie zablokowanym szlakiem CYP-450 w porównaniu do zwierząt otrzymujących paszę HS (Tab. 7). Rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę uległ niezmaniennemu wzrostowi, który wynosił +34 PU (+24%).

Zarówno diureza jak i wydalanie sodu były istotnie niższe u zwierząt HS z chronicznie zahamowaną aktywnością szlaku CYP-450 w porównaniu do zwierząt otrzymujących paszę HS. Zmiany wynosiły odpowiednio  $-2,9 \mu$ l/min (-30%) dla diurezy i  $1 \mu$ mol/min (-49%) dla wydalania sodu. Wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osm}V$ ) uległo obniżeniu o  $2,5 \mu$ mol/kg H<sub>2</sub>O (-30,5%). Obserwowane zmiany w czynności wydalniczej nerki nie osiągnęły znamienności statystycznej (Tab. 7).

Rdzeniowy sygnał NO uległ niezmaniennemu wzrostowi u zwierząt z chronicznie zahamowanym szlakiem CYP-450, zmiana ta wynosiła 1173 pA (Tab. 7).





Ryc. 16. Wpływ chronicznego zablokowania CYP-450 na średnie ciśnienie krwi (MAP), diurezę minutową (V) oraz rdzeniowy sygnał NO u zwierząt utrzymywanych na dietach o różnej zawartości sodu.

Wartości średnie ± SEM, \* zniamiennie różne od wartości kontrolnej (STD). Słupki zakreskowane ukośnie oznaczają grupy dietowe z zastosowaniem niespecyficznego blokady CYP-450.



#### **4.4. Wpływ ostrego zablokowania syntaz tlenku azotu na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki**

W tym podrozdziale przedstawiono wyniki z doświadczeń ostrych, w których L-NAME, niespecyficzny bloker syntaz *NO*, podawano dożylnie zwierzętom spożywającym paszę o różnej zawartości sodu a także poddanym bądź nie, uprzedniemu chronicznemu blokowaniu szlaku CYP-450 przy użyciu ABT.

##### **4.4.1. Wpływ L-NAME na tle diety standardowej**

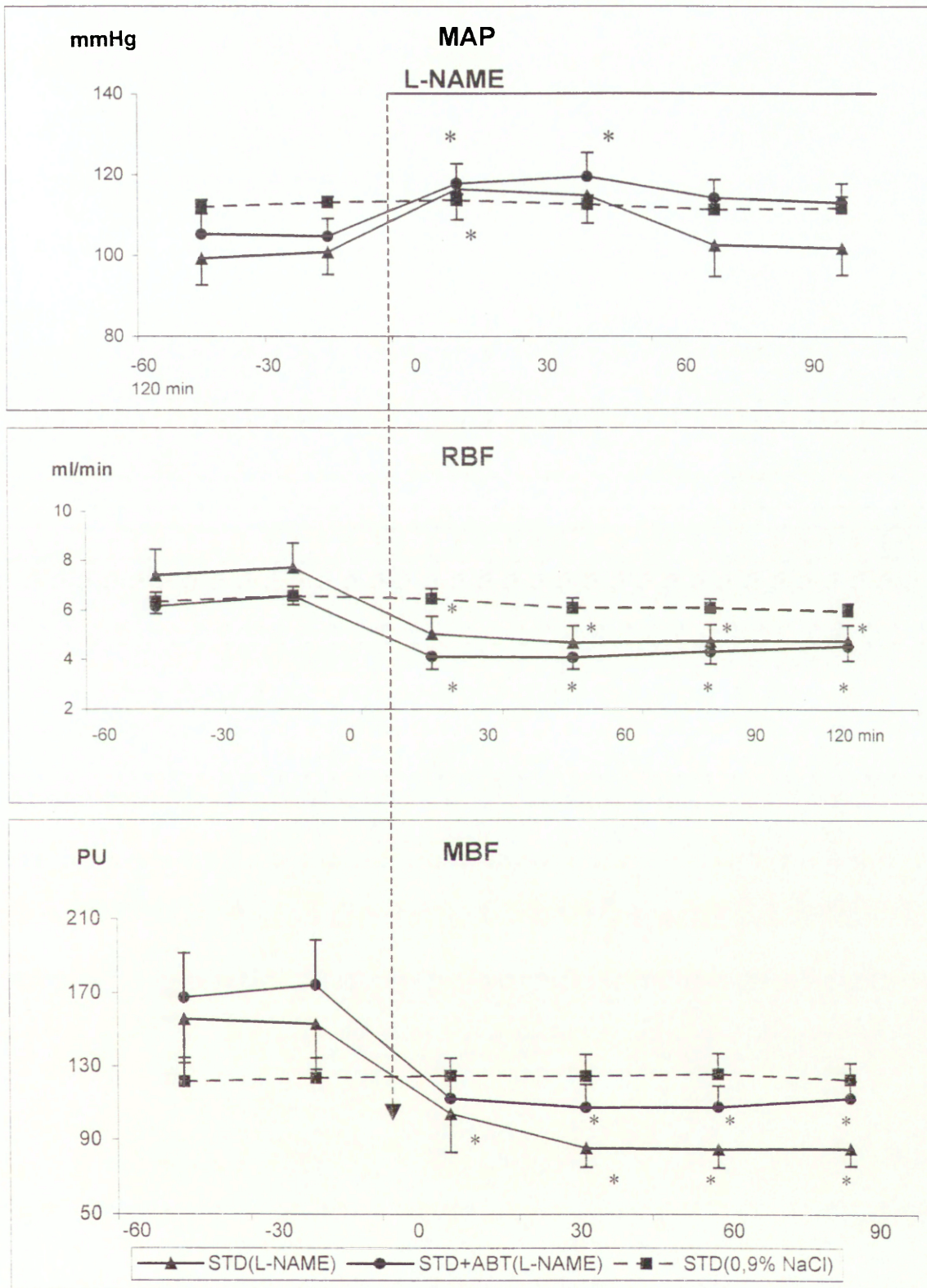
Infuzja dożylna rozpuszczalnika (0.9% NaCl) nie spowodowała istotnych zmian w wartościach badanych parametrów, jedynie wydalanie substancji osmotycznie czynnych istotnie wzrosło po 30-60 min.

Ostre zablokowanie NOS u zwierząt na diecie STD spowodowało wzrost MAP w pierwszych 30 min od podania inhibitora. Zmiana ta była podobna w obydwu grupach zwierząt (16% i 14% odpowiednio w grupie bez lub z ABT,  $p < 0.0003$ ) a więc nie zależała od wcześniejszego zablokowania CYP-450 (Ryc. 15).

Jak można było się spodziewać podanie L-NAME spowodowało obniżenie wartości RBF ( $p < 0,02$ ); zmiana ta była podobna w obydwu grupach i wynosiła 37% w grupie z aktywnymi enzymami szlaku CYP-450 oraz 35% w grupie otrzymującej poprzednio ABT (Ryc. 15).

Podobne zmiany obserwowano w rdzeniowym przepływie krwi przez nerkę; spadek wartości MBF po podaniu L-NAME sięgał w grupie bez ABT 36%, natomiast w grupie STD+ABT wynosił 45% ( $p < 0,01$ ).



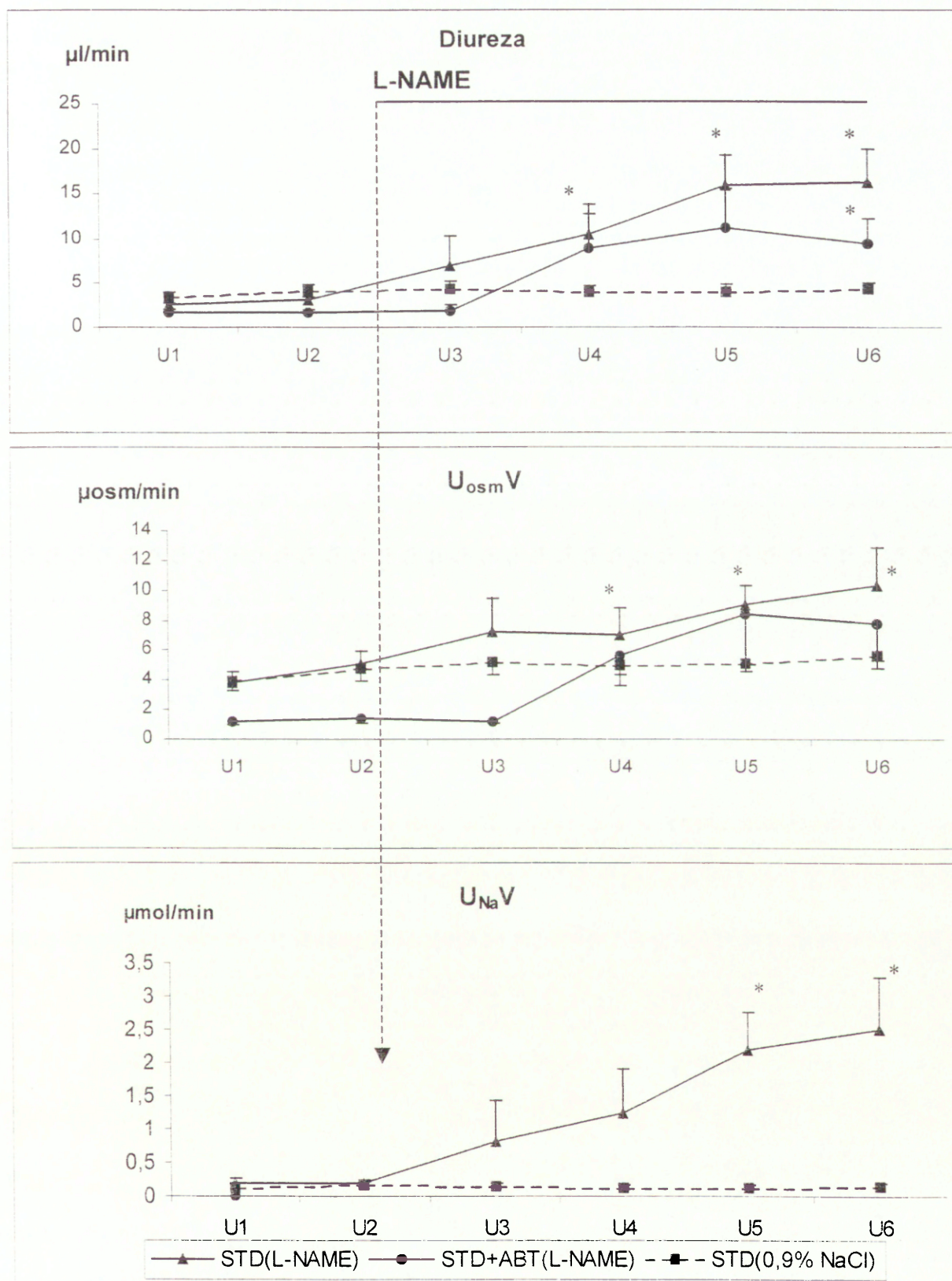


Ryc. 15. Wpływ ostrego podania L-NAME na średnie ciśnienie krwi (MAP) oraz całkowity (RBF) i rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę u szczurów STD poddanych (n=6) bądź nie (n=9), wstępnemu zahamowaniu szlaku CYP-450. Wartości średnie ± SEM. \* zmiennie różne od wartości kontrolnej przy p<0.05. Strzałką oznaczono moment rozpoczęcia infuzji L-NAME.



Jak widać na Ryc. 16 ostre zablokowanie NOS u zwierząt STD z aktywnym szlakiem CYP-450 spowodowało istotny wzrost wydalania wody w czasie 60-120 min od podania inhibitora, przy czym maksymalny, 6-krotny wzrost obserwowano w 120 min ( $p < 0,001$ ). U zwierząt po chronicznym zablokowaniu CYP-450 ostre podanie L-NAME również wywołało istotny, choć słabiej wyrażony wzrost diurezy ( $p < 0,003$ ). Po ostrym podaniu L-NAME obserwowano również wyraźny wzrost wydalania substancji osmotycznie czynnych; w grupie z aktywnym CYP-450 podanie L-NAME wywołało dwukrotny wzrost  $U_{osm}V$  ( $p < 0,01$ ); natomiast w grupie, w której uprzednio wyłączono CYP-450 wzrost  $U_{osm}V$  po ostrym podaniu L-NAME był nawet większy, lecz z powodu bardzo dużej zmienności osobniczej nie osiągnął znamienności statystycznej (Ryc. 16). W grupie STD z chronicznie zablokowanym CYP-450 z powodów technicznych nie oznaczano wydalania sodu. Ostre dożylnie podanie L-NAME u zwierząt STD z aktywnym CYP-450 spowodowało 13-krotny wzrost wydalania sodu; maksymalna zmiana obserwowana po 120 min od podania inhibitora wynosiła  $2,3 \mu\text{mol}/\text{min}$  ( $p < 0,004$ ).



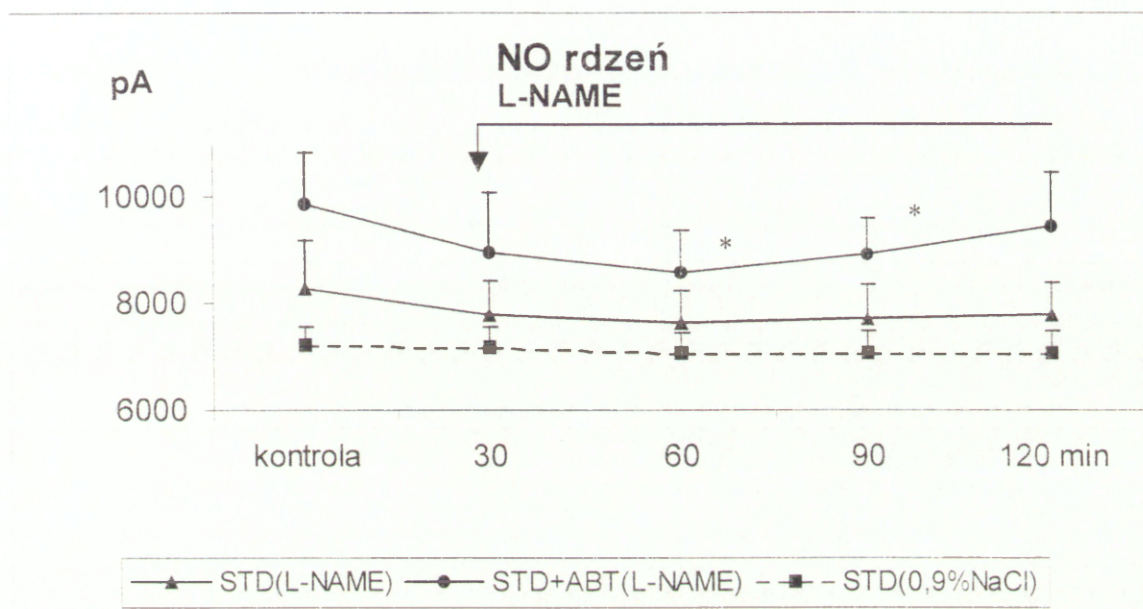


Ryc. 16. Wpływ ostrego podania L-NAME lub jego rozpuszczalnika na diurezę minutową, wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osmV}$ ) i sodu ( $U_{NaV}$ ) u szczurów STD poddanych ( $n=6$ ) bądź nie ( $n=9$ ), wstępnemu hamowaniu CYP-450.

Wartości średnie  $\pm$  SEM. \* zniemiennie różne od wartości kontrolnej.  $U_1 - U_6$ : 30 minutowe okresy zbiórki moczu, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 15.



Ostre podanie L-NAME obniżyło wartość sygnału *NO* mierzonego w rdzeniu nerki jedynie w grupie zwierząt z chronicznie zablokowanymi enzymami szlaku CYP-450 (Ryc.17). Maksymalną zmianę obserwowano w 60 minucie od podania inhibitora i wynosiła ona 1300 pA ( $p < 0,05$ ).

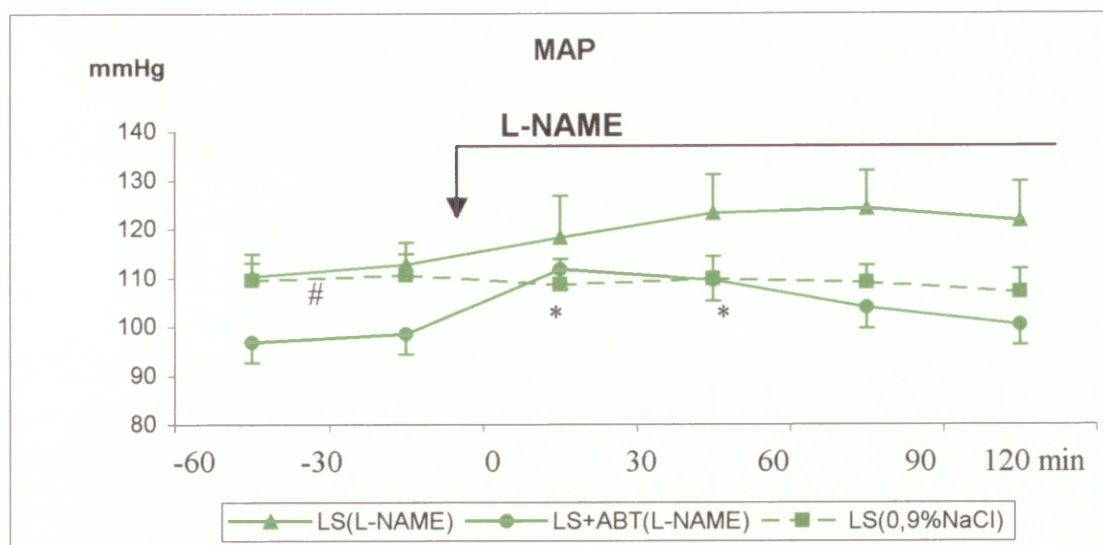


Ryc. 17 Wpływ ostrego podania L-NAME na sygnał *NO* mierzonego w rdzeniu nerki u szczurów na diecie STD poddanych ( $n=6$ ) bądź nie ( $n=9$ ), wstępnemu hamowaniu CYP-450. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zniemennie różne od wartości kontrolnej.

#### 4.2. Wpływ L-NAME na tle diety niskosodowej

Infuzja rozpuszczalnika nie spowodowała istotnych zmian w badanych parametrach (Ryc. 18 - 21). U zwierząt z aktywnym szlakiem CYP-450 obserwowano tendencję do wzrostu ciśnienia krwi po ostrym podaniu L-NAME, natomiast u zwierząt z chronicznie wyłączonymi enzymami CYP-450 obserwowano zniemienne, choć przemijający, wzrost ciśnienia krwi wynoszący 14% ( $p < 0,05$ ; Ryc. 18). Jednocześnie kontrolne ciśnienie krwi było istotnie niższe (o 13%,  $p < 0,05$ ) u zwierząt, u których zastosowano chroniczną blokadę metabolitów AA zależnych od CYP-450.





**Ryc. 18.** Wpływ ostrego podania L-NAME na średnie ciśnienie krwi (MAP) u szczurów LS poddanych ( $n=8$ ) bądź nie ( $n=6$ ), wstępnemu hamowaniu CYP-450.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, # znamienna różnica w wartościach kontrolnych w grupach poddanych bądź nie wstępnemu hamowaniu CYP-450, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 15.

Ostre podanie L-NAME spowodowało porównywalną odpowiedź spadkową w wartości całkowitego przepływu krwi przez nerkę, niezależnie czy enzymy szlaku monooksygenacji były aktywne czy też nie. W przypadku grupy LS(L-NAME) maksymalny spadek wyniósł 3,7 ml/min (45%;  $p<0.002$ ), natomiast w grupie LS+ABT(L-NAME) zmiana ta wyniosła 3,3 ml/min (49%;  $p<0,01$ ). Jednocześnie warto odnotować fakt, iż chroniczne wyeliminowanie metabolitów CYP-450 spowodowało obniżenie wartości kontrolnych RBF o 1,5 ml/min (18,3%,  $p<0,003$ ). W grupie LS(L-NAME) z powodów technicznych nie mierzono CBF, dlatego na Ryc. 19 (środkowy panel) pokazano jedynie dwie krzywe. U zwierząt LS z chronicznie zablokowanym szlakiem CYP-450 CBF obniżył się maksymalnie w czasie pierwszych 30 min od podania L-NAME; przy czym maksymalna zmiana wyniosła 31% i utrzymywała się do końca doświadczenia ostrego ( $p<0,001$ ).

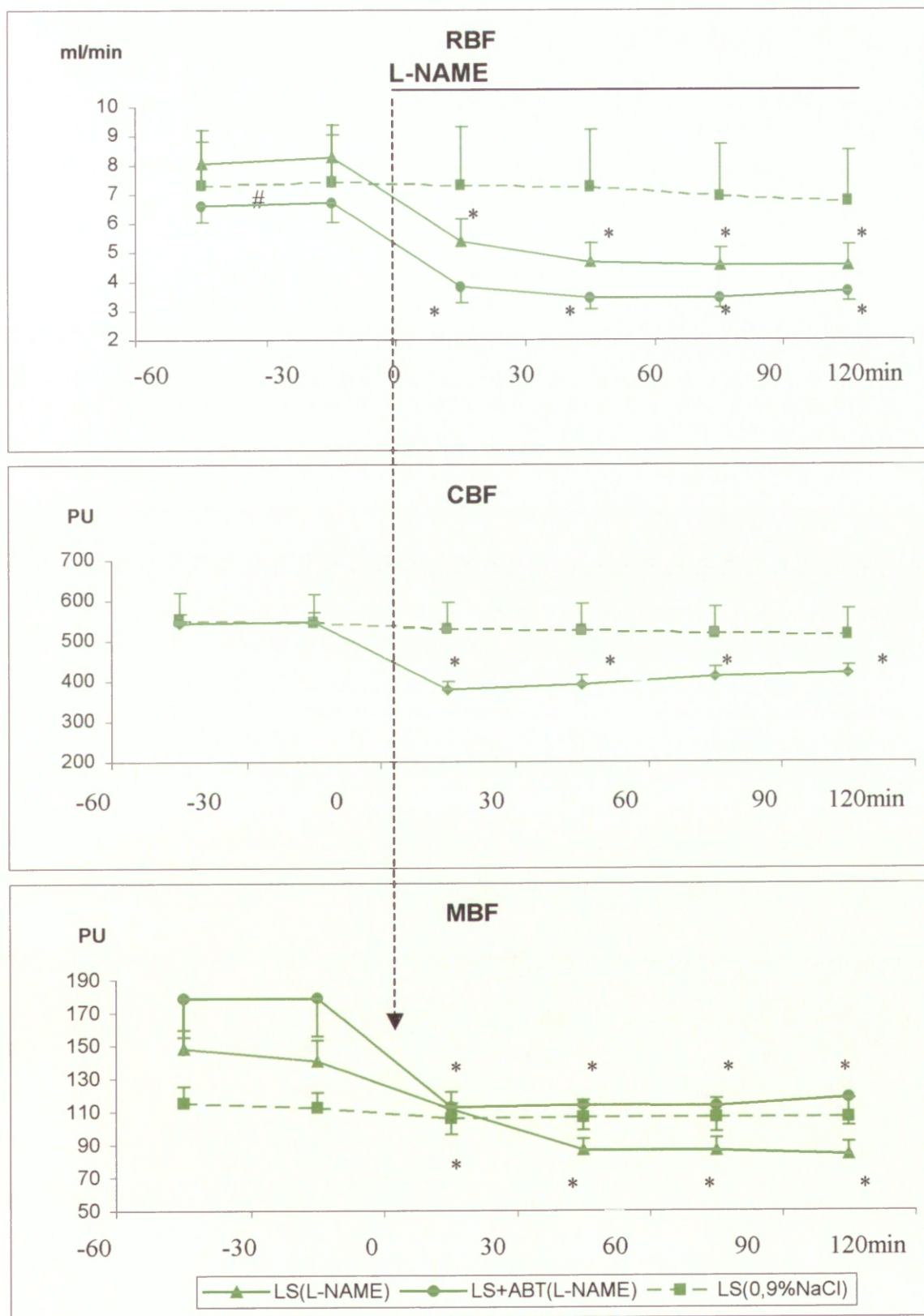
W przypadku uktwienia rdzenia nerki ostre zablokowanie syntaz NO wywołało porównywalne jego obniżenie, niezależnie czy enzymy szlaku CYP-450 były aktywne czy nie; zmiany te wynosiły odpowiednio dla LS(L-NAME) 42%, dla LS+ABT(L-NAME) 37%



( $p < 0,01$ ). Należy podkreślić, że u zwierząt utrzymywanych na diecie LS z chronicznie zablokowanymi enzymami CYP-450 ukrwienie rdzenia nerki było o 19% wyższe niż u tych z aktywnym szlakiem CYP-450, jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej.

Wydalenie wody po podaniu L-NAME rosło w grupie z aktywnym szlakiem CYP-450, jednak z powodu dużej zmienności międzysobniczej zmiany te nie osiągnęły znamienności (Ryc. 20).

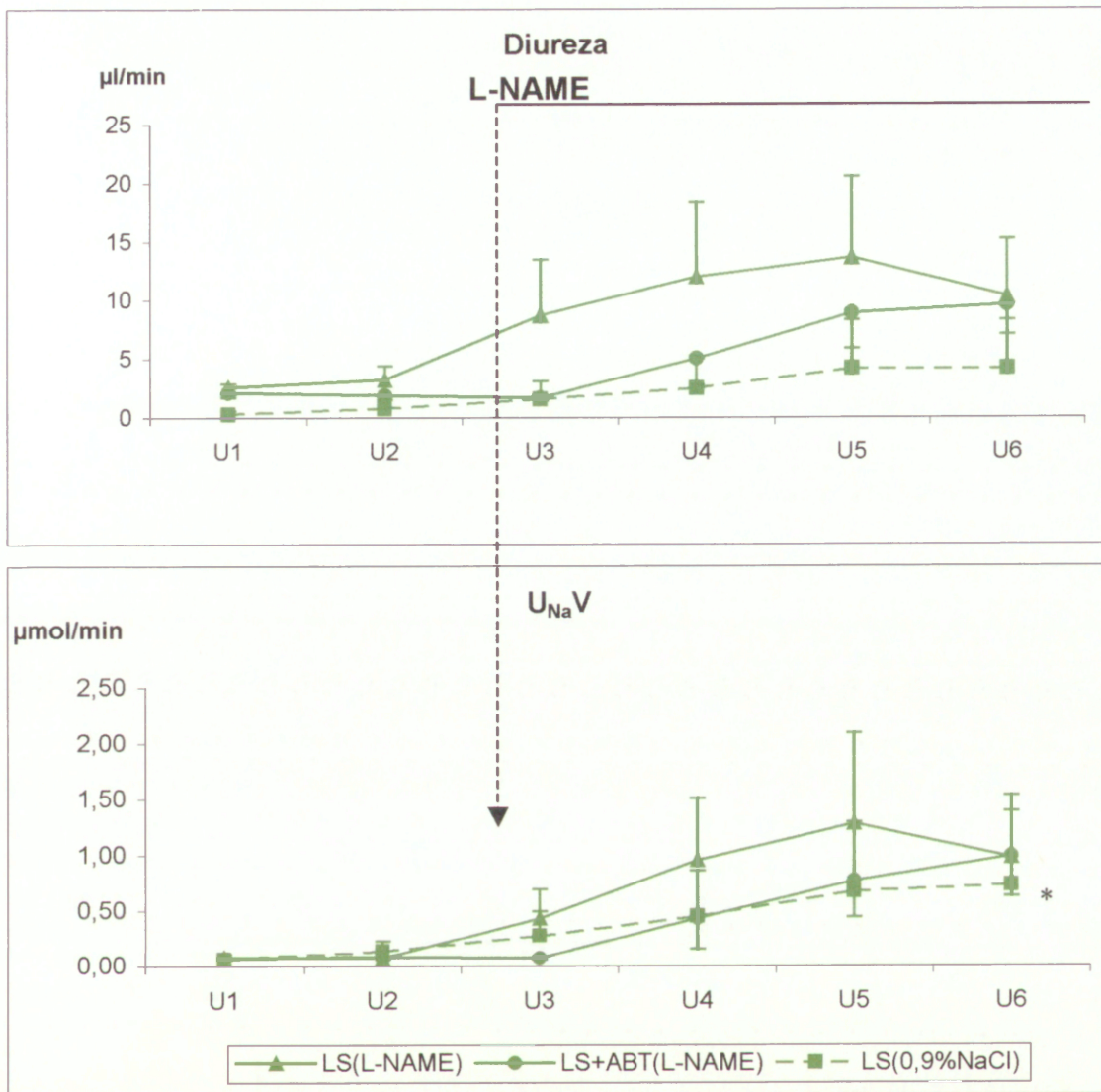




Ryc. 19. Wpływ ostrego podania L-NAME na całkowity (RBF), korowy (CBF) oraz rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę u szczurów LS poddanych (n=8) bądź nie (n=6), wstępnemu hamowaniu CYP-450.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 18.





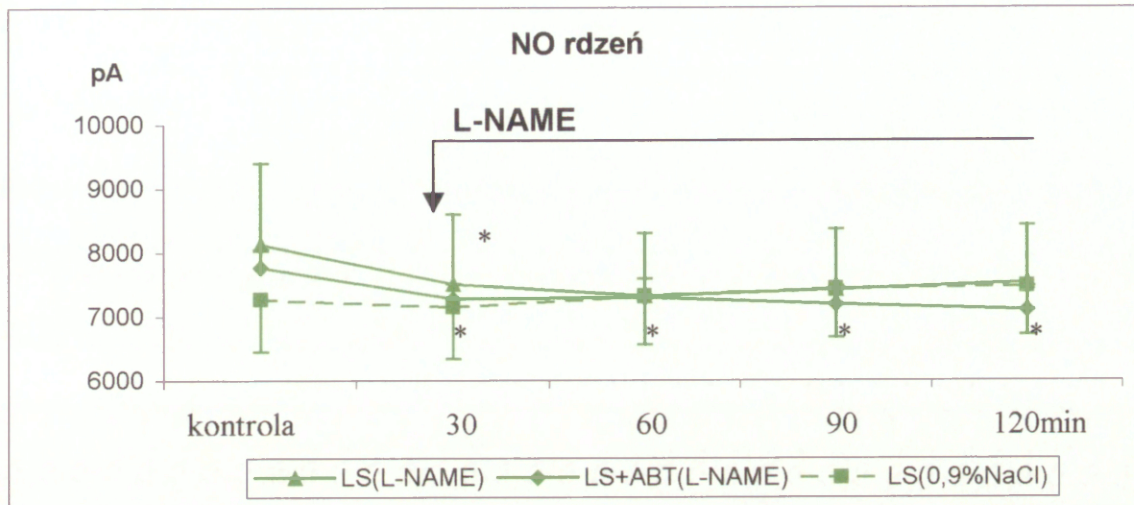
**Ryc. 20.** Wpływ ostrego podania L-NAME na wydalenie wody (diureza minutowa) i sodu ( $U_{NaV}$ ) u szczurów LS poddanych ( $n=8$ ) bądź nie ( $n=6$ ), wstępnemu hamowaniu CYP-450. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamienne różne od wartości kontrolnej,  $U_1$ - $U_6$ : 30 minutowe okresy zbiórki moczu; pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 15.

Jedynie w grupie szczurów z chronicznie wyłączonym szlakiem CYP-450 ostre podanie L-NAME istotnie zwiększyło (4 krotnie) wydalenie sodu w czasie 120 min od podania inhibitora ( $p<0,02$ ). W grupie otrzymującej paszę niskosodową i z aktywnym szlakiem CYP-450 obserwowano tendencję wzrostową w wydalaniu sodu, jednak podobny wzrost obserwowano także w grupie otrzymującej rozpuszczalnik L-NAME.

Ostre podanie L-NAME szczurom na diecie LS spowodowało oczekiwane obniżenie wartości sygnału NO mierzonego w rdzeniu nerki, obserwowana zmiana była



podobna w obu grupach doświadczalnych i wynosiła około 630pA ( $p < 0,03$ ); u zwierząt z wyłączonym szlakiem CYP-450 zmiana ta utrzymała się aż do końca obserwacji.



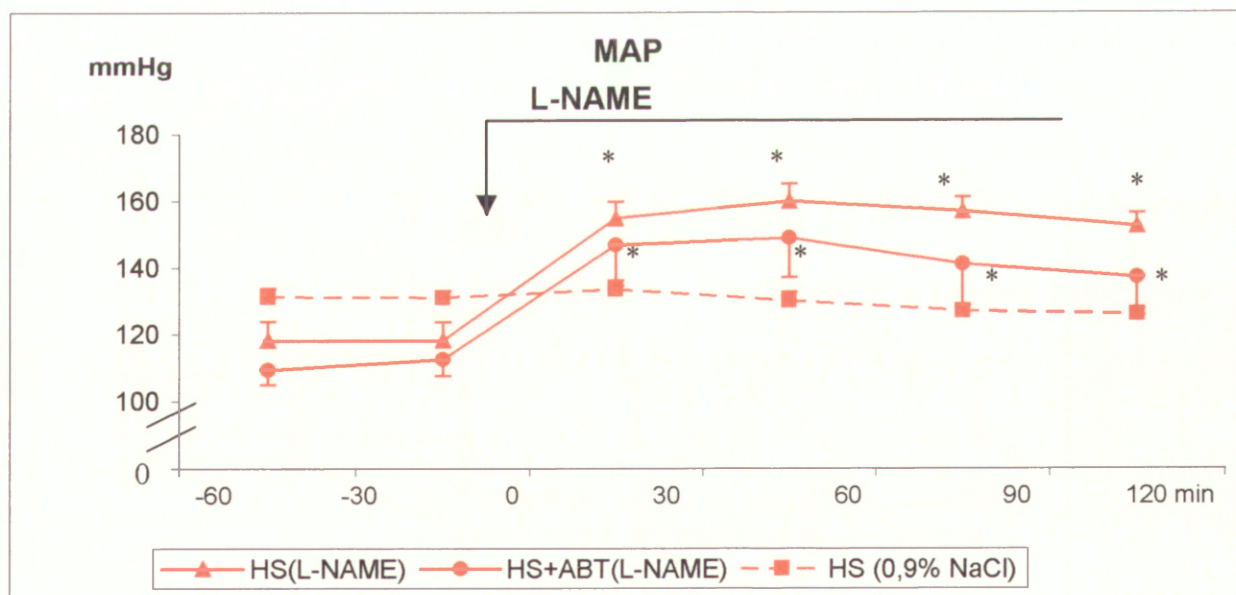
**Ryc. 21.** Wpływ ostrego podania L-NAME na sygnał NO mierzonego w rdzeniu nerki u szczurów LS poddanych ( $n=8$ ) bądź nie ( $n=6$ ), wstępnej inhibicji szlaku CYP-450. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamienne różne od wartości kontrolnej, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 15.



### 4.3. Wpływ L-NAME na tle diety wysokosodowej

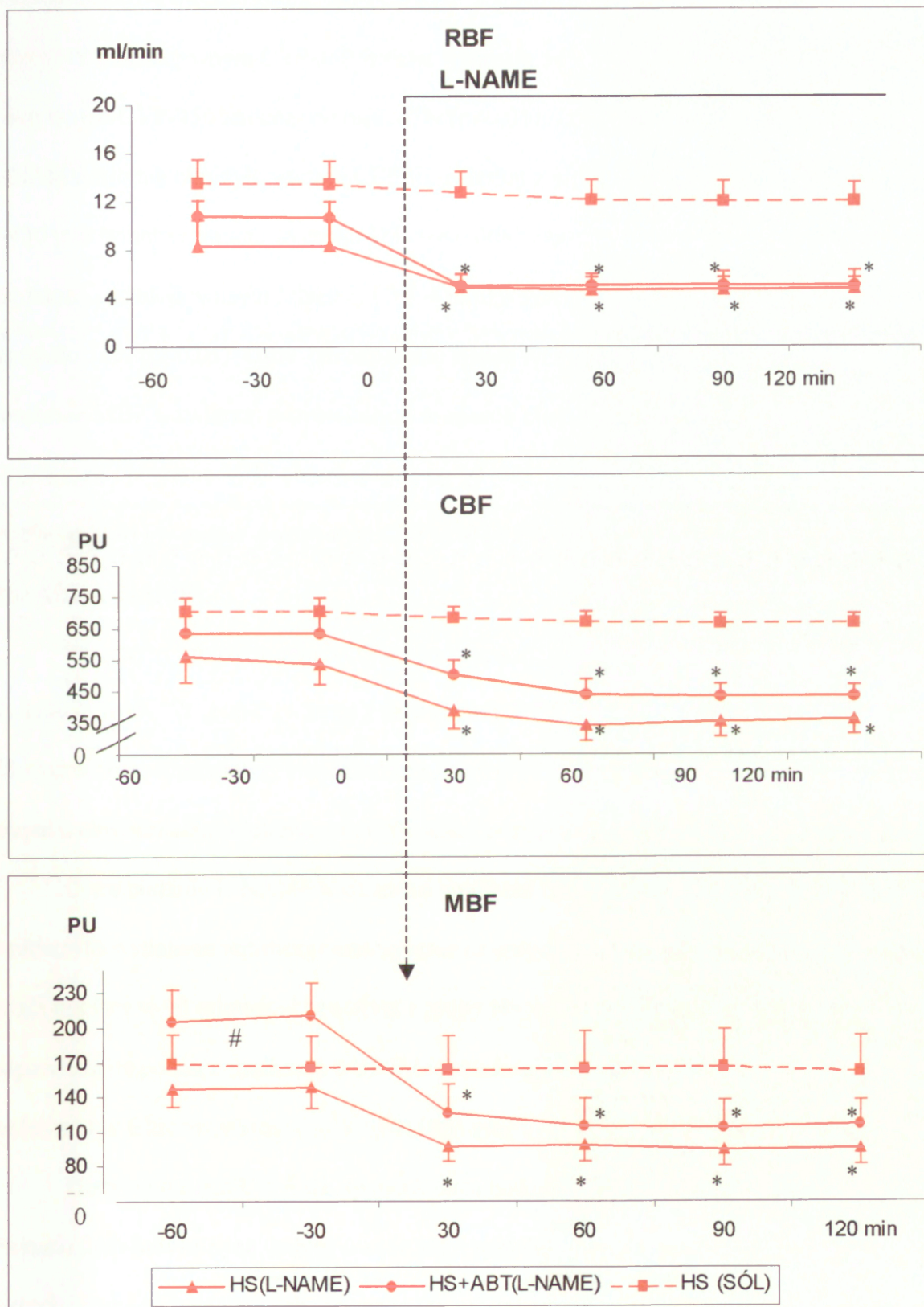
Podanie rozpuszczalnika L-NAME nie spowodowało istotnych zmian w wartościach badanych parametrów, jedynie całkowity przepływ krwi przez nerkę (RBF) wykazywał nieznamiennie, postępujące obniżanie się („dryft”), co należy do charakterystyki tych doświadczeń. W okresach kontrolnych u zwierząt, u których chronicznie wyeliminowano aktywność enzymów CYP-450, ukrwienie rdzenia nerki (40%,  $p < 0,01$ ) oraz siła sygnału NO mierzonego w tym samym obszarze (34%,  $p < 0,02$ ) były wyższe niż u zwierząt z aktywnym szlakiem CYP-450.

Jak można było oczekiwać ostre dożylnie podanie L-NAME szczurom na diecie HS, zarówno u zwierząt z czynnym jak i zablokowanym CYP-450 spowodowało istotny wzrost MAP. W pierwszych dwóch okresach od podania inhibitora zmiana była w obu grupach prawie jednakowa i wynosiła odpowiednio: 31% i 33% ( $p < 0,01$ ; Ryc. 22).



**Ryc. 22. Wpływ ostrego podania L-NAME na średnie ciśnienie krwi (MAP) u szczurów HS poddanych ( $n=6$ ) bądź nie ( $n=6$ ), wstępnemu hamowaniu CYP-450.**  
Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamiennie różne od wartości kontrolnej, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 15.





Ryc. 23. Wpływ ostrego podania L-NAME na całkowity (RBF), korowy (CBF) i rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę u szczurów HS poddanych (n=6) bądź nie (n=6), wstępnemu hamowaniu CYP-450.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zmiennie różne od wartości kontrolnej, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 18.



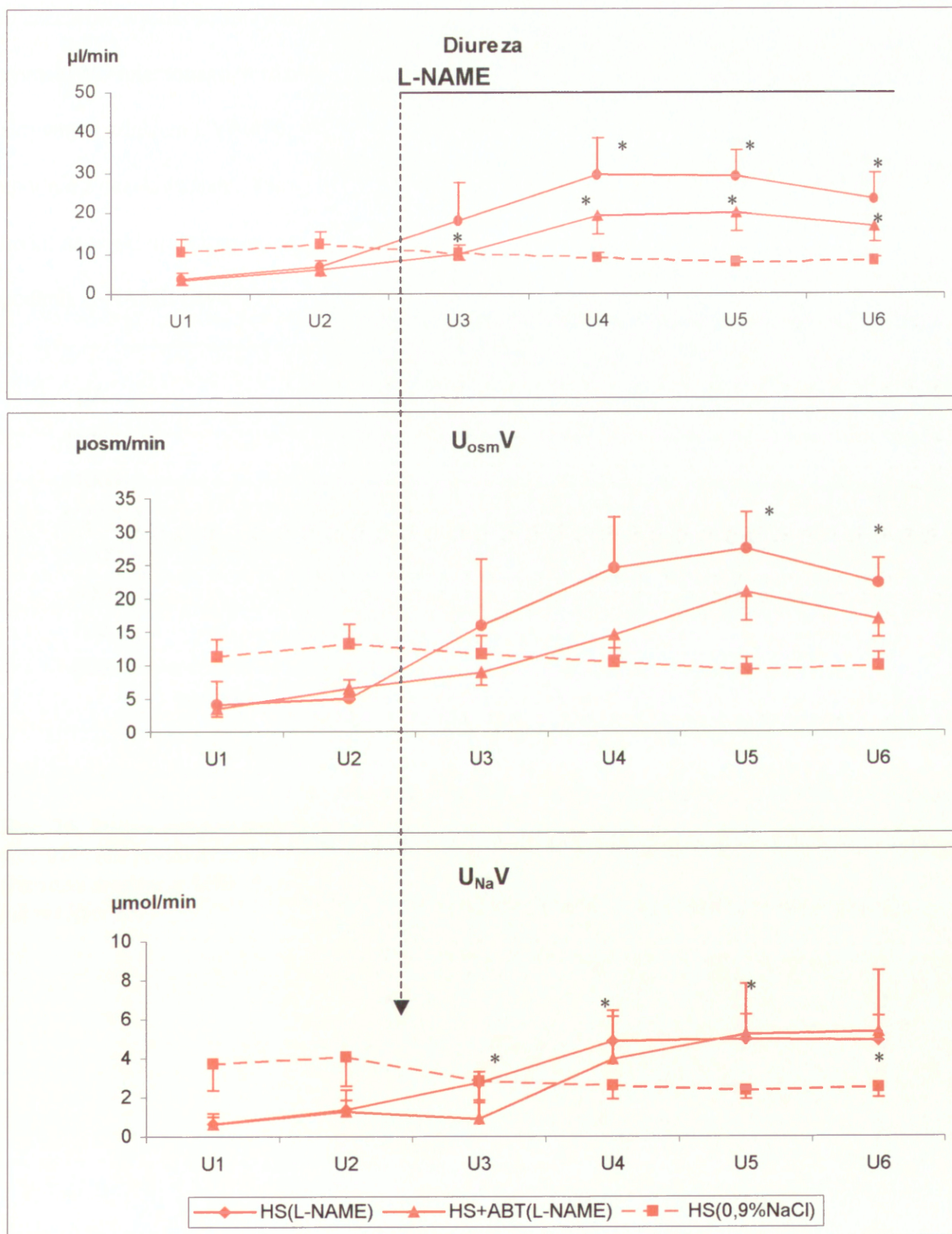
Ostre podanie L-NAME istotnie obniżyło RBF w obydwu grupach doświadczalnych. W grupie HS z nieaktywnym CYP-450 zmiana wynosiła 54% ( $p < 0.001$ ). Natomiast w grupie HS z aktywnym CYP-450 zmiana wynosiła 43% ( $p < 0.01$ ). Jak widać na Ryc. 23 ostre podanie L-NAME istotnie obniżyło wartość CBF. U zwierząt z aktywnym szlakiem cytochromu P-450 maksymalna zmiana wynosiła 38% ( $p < 0.008$ ), natomiast w grupie zwierząt HS z chronicznie zablokowanym szlakiem CYP-450 maksymalne obniżenie wartości CBF wynosiło 32% ( $p < 0.01$ ). Ostre zablokowanie syntaz *NO* spowodowało wyraźniejsze obniżenie MBF u zwierząt pozbawionych w sposób chroniczny pochodnych CYP-450. Największe obniżenie MBF obserwowano po 60 min od podania inhibitora i wynosiło ono 36,5% ( $p < 0.01$ ) w grupie z aktywnym CYP-450 i 45% ( $p < 0.02$ ) w grupie HS+ABT(L-NAME).

Po ostrym zablokowaniu NOS w obu grupach doświadczalnych odnotowano wzrost wydalania wody. W grupie zwierząt z aktywnym CYP-450 był to wzrost 4-krotny ( $p < 0.01$ ). Zdecydowanie wcześniejszy i wyraźniejszy, bo wynoszący aż 45,6 raza był wzrost  $V$  w grupie z chronicznie zablokowanym CYP-450 ( $p < 0.005$ ).

Ostre podanie L-NAME u szczurów na diecie HS z aktywnym szlakiem CYP-450 zwiększyło wydalanie substancji osmotycznie czynnych; istotna zmiana (wzrost trzykrotny) miała miejsce w 90 minucie. U zwierząt z grupy HS z chronicznie zablokowanym CYP-450 odpowiedź na podanie inhibitora NOS była wcześniejsza niż u zwierząt bez ABT; maksymalny 6-krotny wzrost  $U_{osm}V$  ( $p < 0.003$ ) zanotowano 90 min od podania inhibitora.

Dożylna infuzja L-NAME spowodowała podobny wzrost wydalania sodu w obydwu grupach doświadczalnych, jednak u zwierząt z zablokowanym szlakiem CYP-450 z powodu dużych różnic indywidualnych zmiana ta nie osiągnęła znamienności. Natomiast u szczurów z aktywnym CYP-450 pięciokrotny wzrost wydalania sodu nastąpił wcześniej i była to zmiana istotna statystycznie ( $p < 0.01$ ).



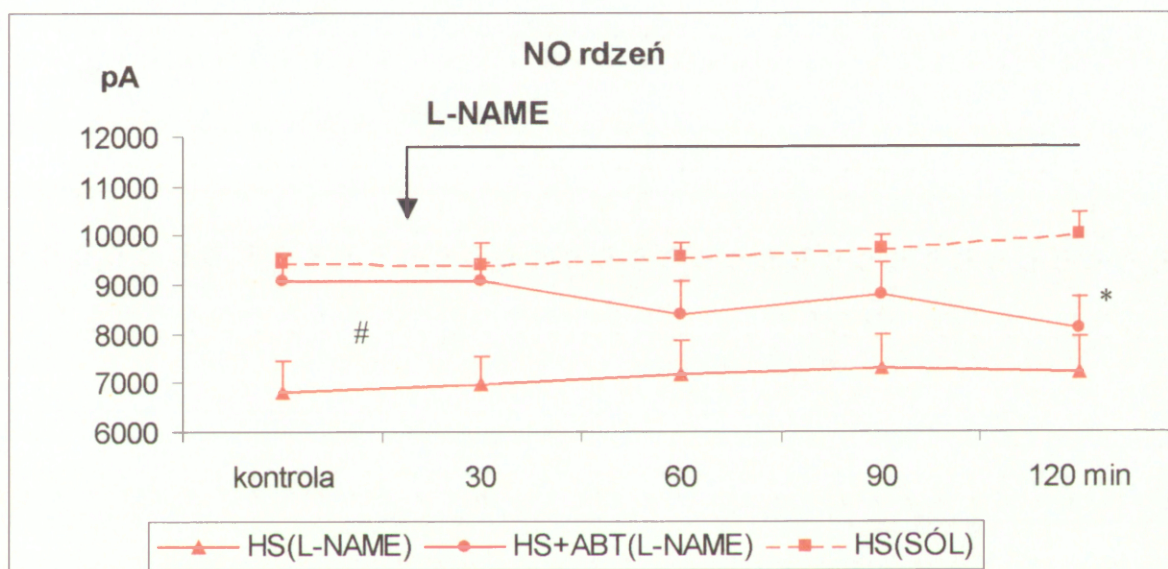


**Ryc. 24.** Wpływ ostrego podania L-NAME na diurezę minutową (n=6), wydalenie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osm}V$ , n=3) i wydalenie sodu ( $U_{Na}V$ , n=3) u szczurów HS poddanych bądź nie, wstępnemu zahamowaniu CYP-450.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zniemnie różne od wartości kontrolnej,  $U_4$ - $U_6$ : 30 minutowe okresy zbiórki moczu, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 15.



U szczurów wysokosodowych obserwowano pewną stałą tendencję („dryft”) wzrostową sygnału *NO* mierzonego w rdzeniu nerki, zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie z aktywnym szlakiem CYP-450. W grupie z zablokowanym CYP-450 podanie inhibitora NOS, zgodnie z oczekiwaniami, spowodowało postępujące obniżenie siły sygnału *NO* w rdzeniu nerki; największą zmianę wynoszącą 966 pA ( $p < 0,01$ ) odnotowano w 120 minucie od podania L-NAME (Ryc. 25).



**Ryc. 25.** Wpływ ostrego podania L-NAME na sygnał *NO* mierzonego w rdzeniu nerki u szczurów HS poddanych ( $n=6$ ) bądź nie ( $n=6$ ), wstępnemu zahamowaniu CYP-450. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamiennie różne od wartości kontrolnej, pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 18.



#### **4.5. Wpływ ostrego zablokowania enzymów szlaku CYP-450 na średnie ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerki**

W tym podrozdziale przedstawiono wyniki z doświadczeń, w których niespecyficzny inhibitor szlaku CYP-450 - 1-aminobenzotriazole (ABT) - podawano zwierzętom spożywającym pasze o różnej zawartości sodu a także poddanym bądź nie, uprzedniemu chronicznemu blokowaniu syntaz *NO*, przy pomocy L-NAME.

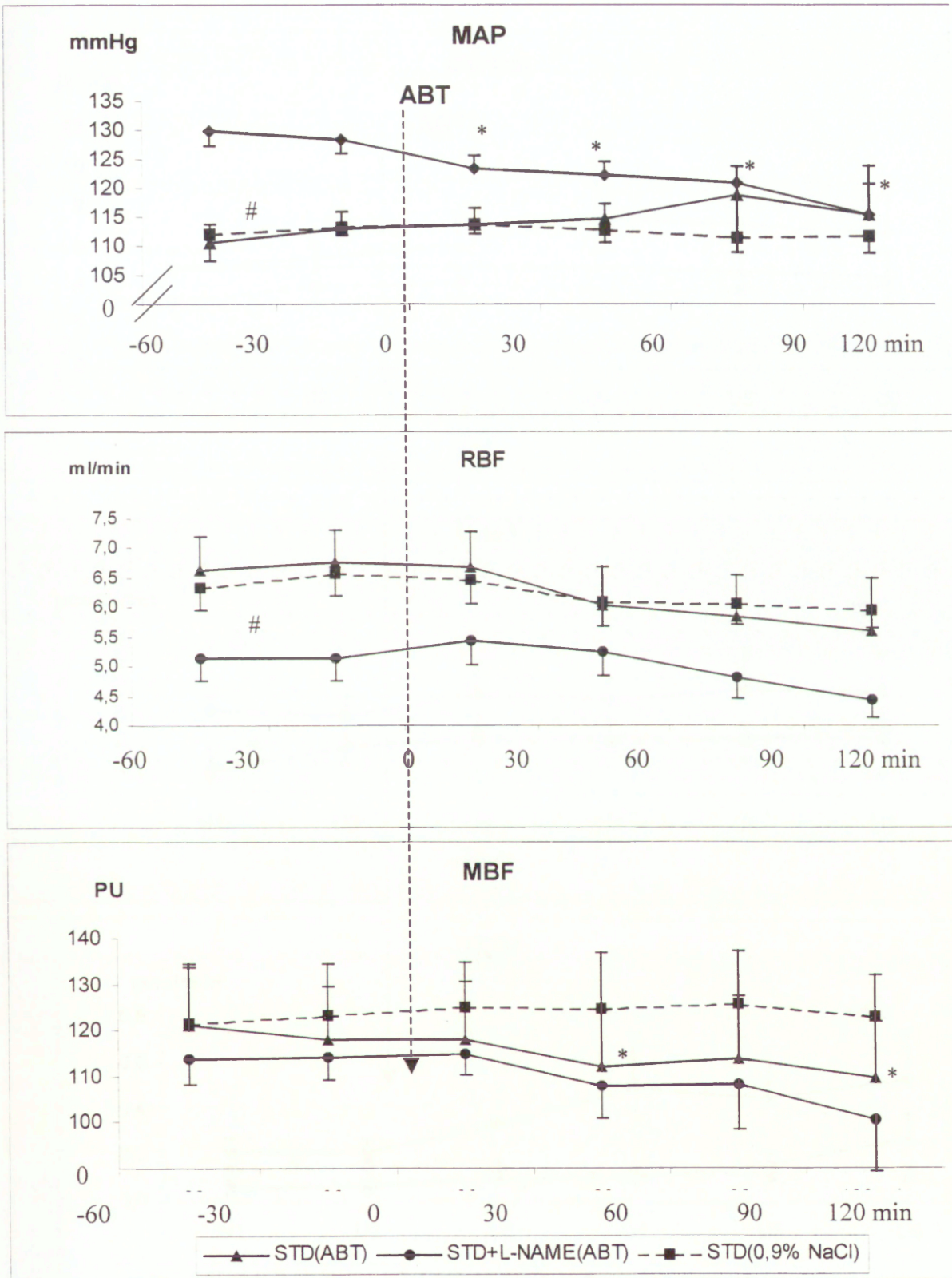
##### **4.5.1. Wpływ ABT na tle diety standardowej**

Podanie rozpuszczalnika (0,9% NaCl) nie spowodowało istotnych zmian w wartościach badanych parametrów.

U szczurów STD z aktywnymi syntazami *NO* po zablokowaniu szlaku CYP-450 obserwowano niewielką tendencję wzrostową w MAP (Ryc.26), natomiast w grupie z chronicznie wyłączonymi syntazami *NO* podanie ABT spowodowało istotne i postępujące obniżenie ciśnienia tętniczego (o 11%;  $p < 0,01$ ). Warto również zauważyć, że u zwierząt pozbawionych w sposób chroniczny aktywności syntaz *NO*, obserwowano w czasie okresów kontrolnych znamienne wyższe wartości MAP (15%,  $p < 0,01$ ), wydalania substancji osmotycznie czynnych (40%,  $p < 0,01$ ) i wydalania sodu (czterokrotny wzrost,  $p < 0,0002$ ) oraz niższy całkowity przepływ krwi przez nerkę (24%,  $p < 0,004$ ).

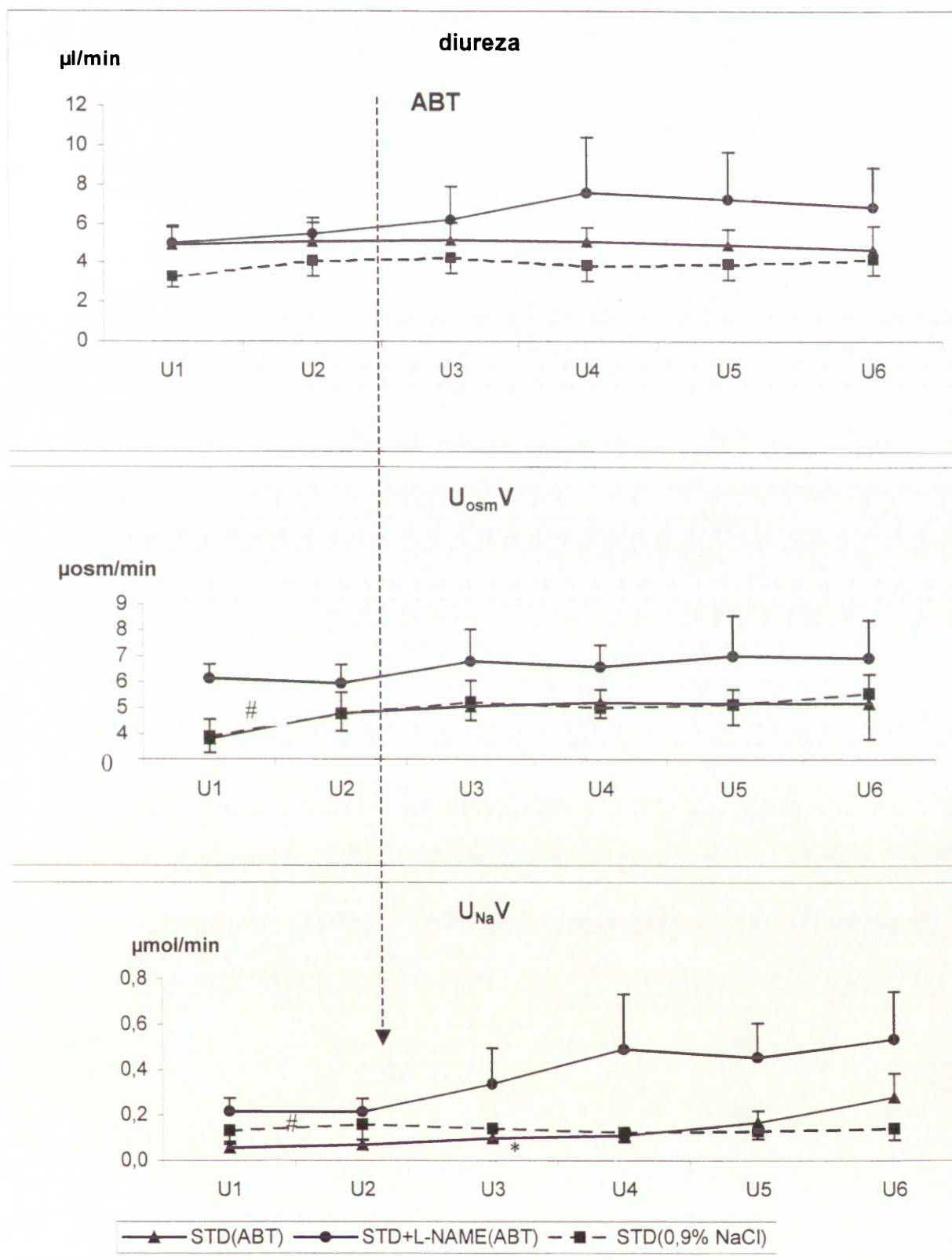
Po ostrym zablokowaniu szlaku CYP-450 wystąpiły zbliżone ilościowo tendencje spadkowe w RBF, zarówno u zwierząt z aktywnym jak i zablokowanym szlakiem NOS (odpowiednio o 14% oraz 13%). W grupie kontrolnej, gdzie podawano jedynie infuzję rozpuszczalnika, również obserwowano podobne obniżenie (8%: Ryc. 26). Ostre zablokowanie szlaku CYP-450 istotnie obniżyło MBF u zwierząt STD z aktywnymi syntazami *NO*, zmiana ta była maksymalna pod koniec obserwacji i wynosiła 8.3% ( $p < 0,04$ ). W grupie STD z chronicznie wyłączonymi syntazami *NO* obserwowano bardzo zbliżoną





Ryc. 26. Wpływ ostrego podania ABT na średnie ciśnienie krwi (MAP), całkowity (RBF) oraz rdzeniowy przepływ krwi przez nerkę (MBF) u szczurów STD poddanych (n=8) bądź nie (n=9), wstępnemu zahamowaniu NOS. Wartości średnie ± SEM, # znamienna różnica w wartościach kontrolnych w grupach poddanych bądź nie wstępnemu hamowaniu NOS \* znamienne różnie od wartości kontrolnej przy p<0.05. Strzałką oznaczono moment podania ABT.





Ryc. 27. Wpływ ostrego podania ABT na diurezę minutową, wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{\text{osm}}V$ ) i sodu ( $U_{\text{Na}}V$ ) u szczurów STD poddanych ( $n=7$ ) bądź nie ( $n=8$ ), wstępnemu zahamowaniu NOS.

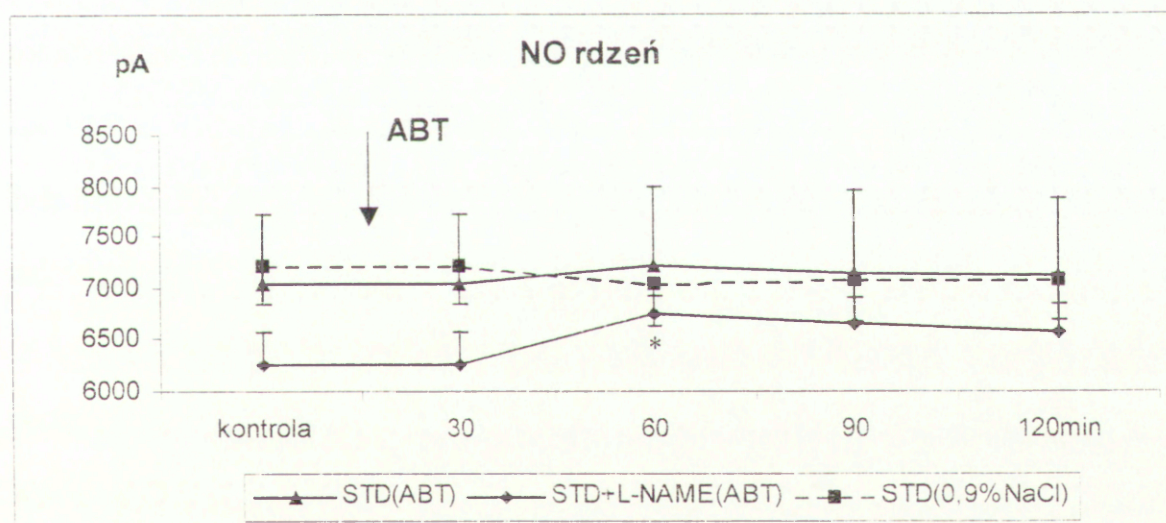
Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zniamiennie różne od wartości kontrolnej ( $p < 0,05$ ),  $U_1-U_6$ : 30 minutowe okresy zbiórki moczu. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.



tendencję spadkową po podaniu ABT, natomiast nie osiągnęła ona poziomu znaczącości (Ryc 26).

Ostre zablokowanie szlaku CYP-450 nie spowodowało istotnych zmian w wydalaniu wody. Jedynie u zwierząt z chronicznie zablokowaną syntezą *NO* obserwowano nieznamienną tendencję wzrostową w diurezie (Ryc.27).

Po ostrym zablokowaniu szlaku monoooksygenacji AA zależnej od CYP-450 u zwierząt z aktywnym szlakiem NOS, wystąpiła jedynie nieznaczna tendencja do wzrostu sygnału *NO*. U zwierząt STD z chronicznie wyłączonymi syntazami *NO* podanie ABT zwiększyło sygnał *NO* w rdzeniu nerki o 783 pA ( $p < 0.03$ ) w czasie 60 min od podania inhibitora.



**Ryc. 28.** Wpływ ostrego podania ABT na sygnał *NO* mierzony w rdzeniu nerki u szczurów STD poddanych ( $n=5$ ) bądź nie ( $n=7$ ), wstępnemu zahamowaniu aktywności syntaz *NO*. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamienne różne od wartości kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.

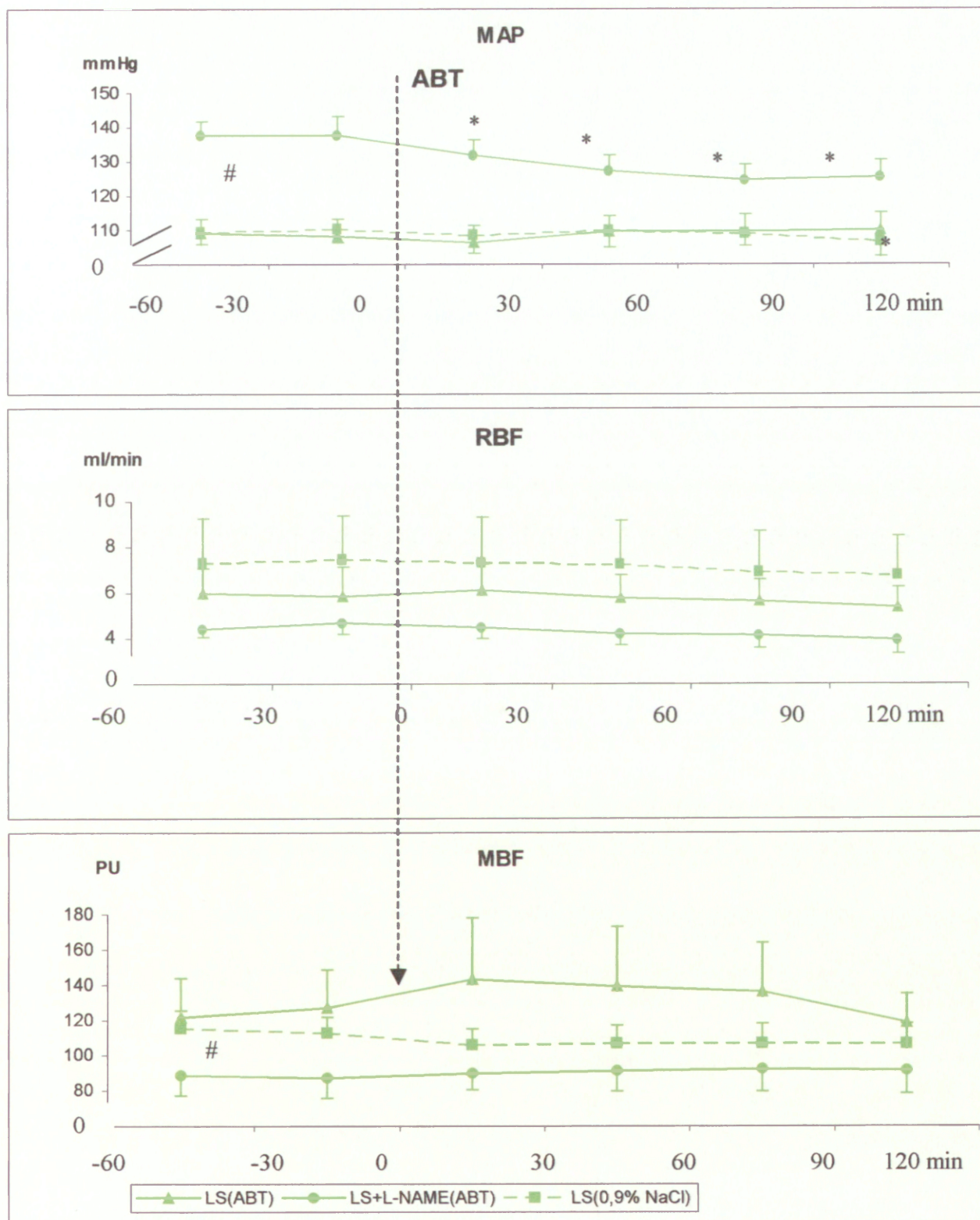


#### **4.5.2. Wpływ ABT na tle diety niskosodowej**

Ostre podanie rozpuszczalnika nie spowodowało istotnych zmian w wartościach badanych parametrów (Ryc. 29 - 31). Warto zauważyć, że u zwierząt z chronicznie zablokowanymi syntazami *NO* w czasie okresów kontrolnych obserwowano znamienne wyższe ciśnienie krwi (27%,  $p < 0,01$ ) oraz niższe ukrwienie rdzenia nerki (29%,  $p < 0,02$ ). Podanie ABT nie zmieniło istotnie MAP u zwierząt na diecie niskosodowej z aktywnym szlakiem *NO*, natomiast w grupie z chronicznie zablokowanymi NOS obserwowano istotne obniżenie ciśnienia krwi. Maksymalny spadek MAP wynoszący 10% ( $p < 0,01$ ) obserwowano w 90 minucie od podania inhibitora enzymów CYP-450 (Ryc. 29). Całkowity przepływ krwi przez nerkę wykazywał niewielkie tendencje spadkowe w czasie trwania doświadczenia niezależnie od stosowanych zabiegów. Ostre zablokowanie enzymów szlaku CYP-450 nie spowodowało istotnych zmian w przepływie przez rdzeń nerki w żadnej z omawianych grup. Jedynie w grupie z aktywnymi NOS obserwowano tendencję wzrostową w MBF, przy czym najsilniej zaznaczyła się ona w czasie 30 min od podania ABT (15%, Ryc. 29).

U zwierząt na diecie LS zarówno z aktywnymi jak i zablokowanymi syntazami *NO* ostre zablokowanie szlaku CYP-450 wyeliminowało tendencję wzrostową w diurezie i wydalaniu sodu obserwowaną podczas infuzji samego rozpuszczalnika (Ryc. 30). Dożylnie podanie ABT zwiększyło istotnie  $U_{osm}V$  u zwierząt LS z aktywnym szlakiem *NO*; maksymalną zmianę wynoszącą 80% ( $p < 0,05$ ) obserwowano w 30 min od podania inhibitora (Ryc. 30).

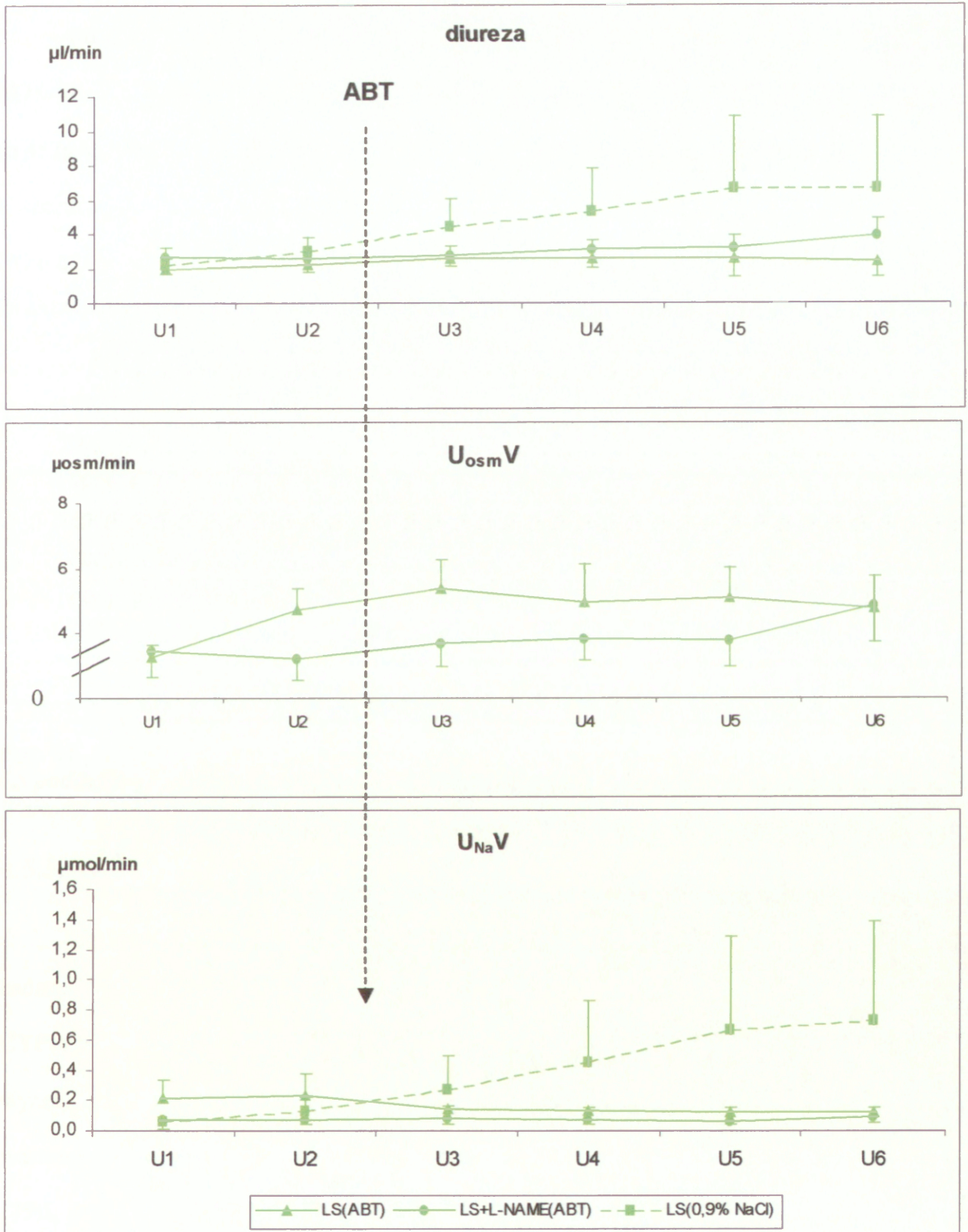




Ryc. 29. Wpływ ostrego podania ABT na średnie ciśnienie krwi (MAP), całkowity (RBF) oraz rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę u szczurów LS poddanych (n=8) bądź nie (n=7), wstępnemu zahamowaniu NOS.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zmiennie różne od wartości kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.





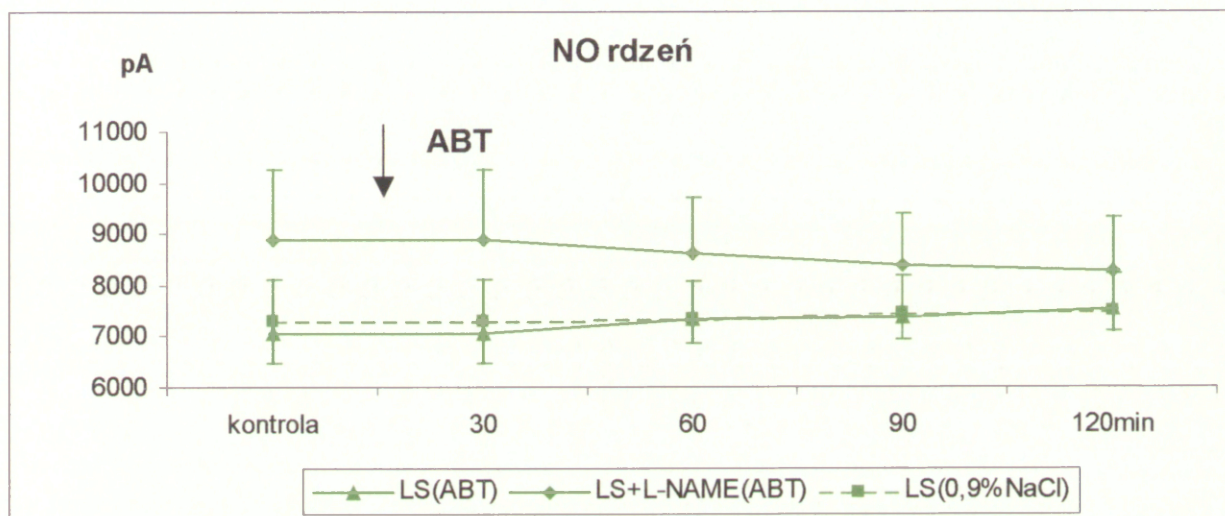
**Ryc. 30. Wpływ ostrego podania ABT na diurezę minutową, wydalenie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{\text{osm}V}$ ) oraz sodu ( $U_{\text{Na}V}$ ) u szczurów LS poddanych ( $n=8$ ) bądź nie ( $n=6$ ), wstępnemu zahamowaniu NOS.**

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamienne różne od wartości kontrolnej ( $p < 0,05$ ),  $U_1$ - $U_6$ : 30 minutowe okresy zbiórki moczu. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.



Po ostrym zablokowaniu szlaku CYP-450 obserwowano tendencję wzrostową sygnału *NO* w rdzeniu nerki u szczurów LS z aktywnymi syntazami *NO*; maksymalną zmianę (o 457pA, nieistotna) zanotowano w 90 minucie od podania ABT (Ryc. 31).

U szczurów z chronicznie wyłączonymi syntazami *NO* podanie ABT obniżyło siłę sygnału *NO* o 628pA to w czasie 120 min od podania inhibitora; zmiana ta była nieznamienne.



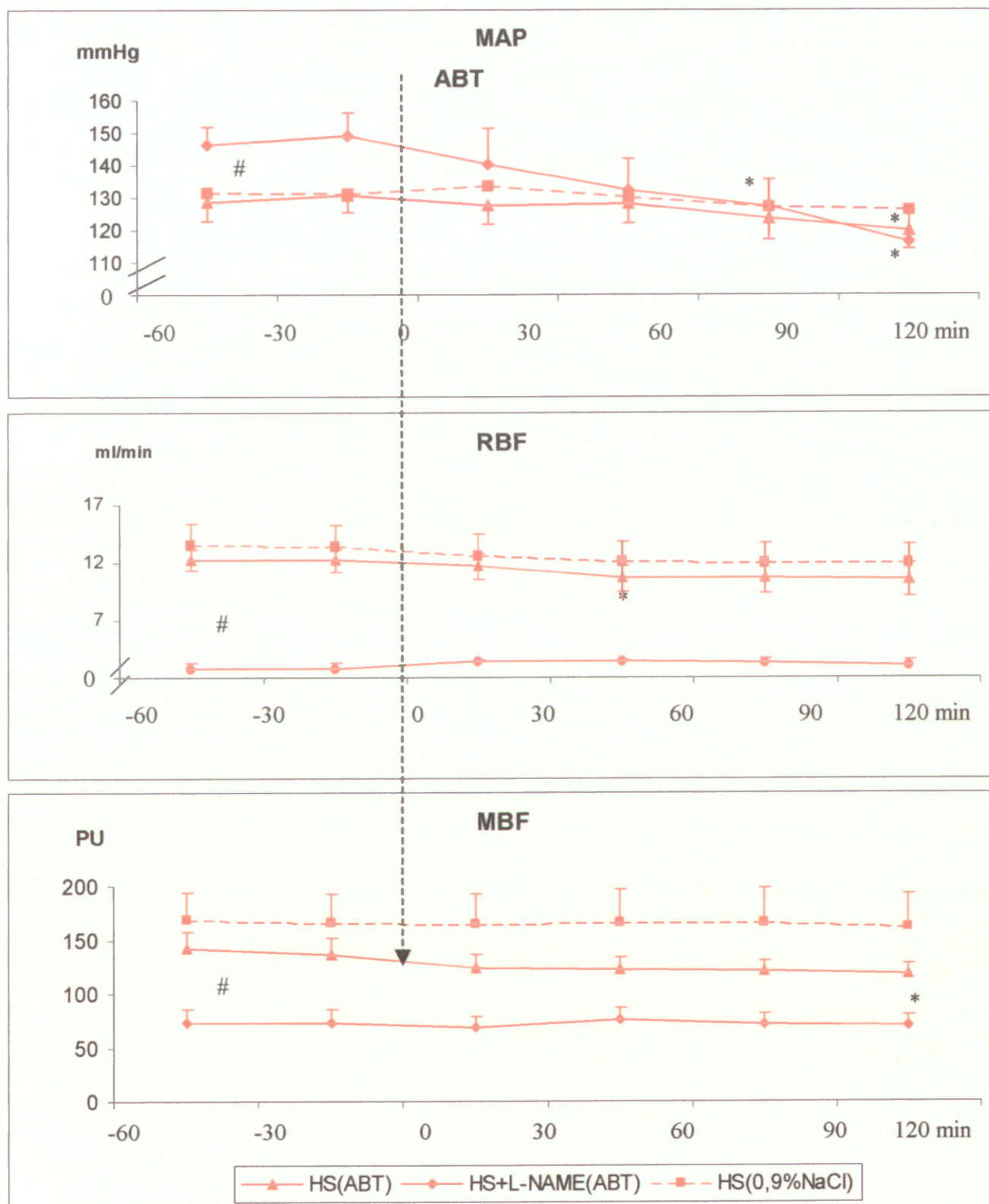
**Ryc. 31. Wpływ ostrego podania ABT na sygnał *NO* mierzony w rdzeniu nerki u szczurów LS poddanych ( $n=6$ ) lub nie ( $n=5$ ), wstępnemu zahamowaniu NOS. Wartości średnie  $\pm$  SE. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.**

#### **4.5.3. Wpływ ABT na tło diety wysokosodowej**

Wstrzyknięcie rozpuszczalnika nie spowodowało istotnych zmian w wartościach badanych parametrów. U zwierząt z chronicznie zablokowaną aktywnością enzymów CYP-450, w czasie okresów kontrolnych doświadczeń ostrych obserwowano znamienne wyższe ciśnienie krwi (14%,  $p<0,04$ ) oraz wydalanie wody (98%,  $p<0,01$ ). Natomiast wartości parametrów hemodynamicznych nerki były niższe u tych zwierząt, i tak dla: RBF (75%,  $p<0,01$ ), CBF (50%,  $p<0,01$ ) oraz MBF (47%,  $p<0,01$ ).

Ostre zablokowanie enzymów szlaku CYP-450 istotnie obniżyło wartości MAP zarówno u zwierząt z aktywnymi jak i z chronicznie wyłączonymi syntazami *NO*. Dużo





Ryc. 32. Wpływ ostrego podania ABT na średnie ciśnienie krwi (MAP), całkowity (RBF) oraz rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę u szczurów HS poddanych (n=6) bądź nie (n=7), wstępnemu zahamowaniu NOS.

Wartości średnie ± SEM, \* zmiennie różne od wartości kontrolnej (p < 0,05). Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.

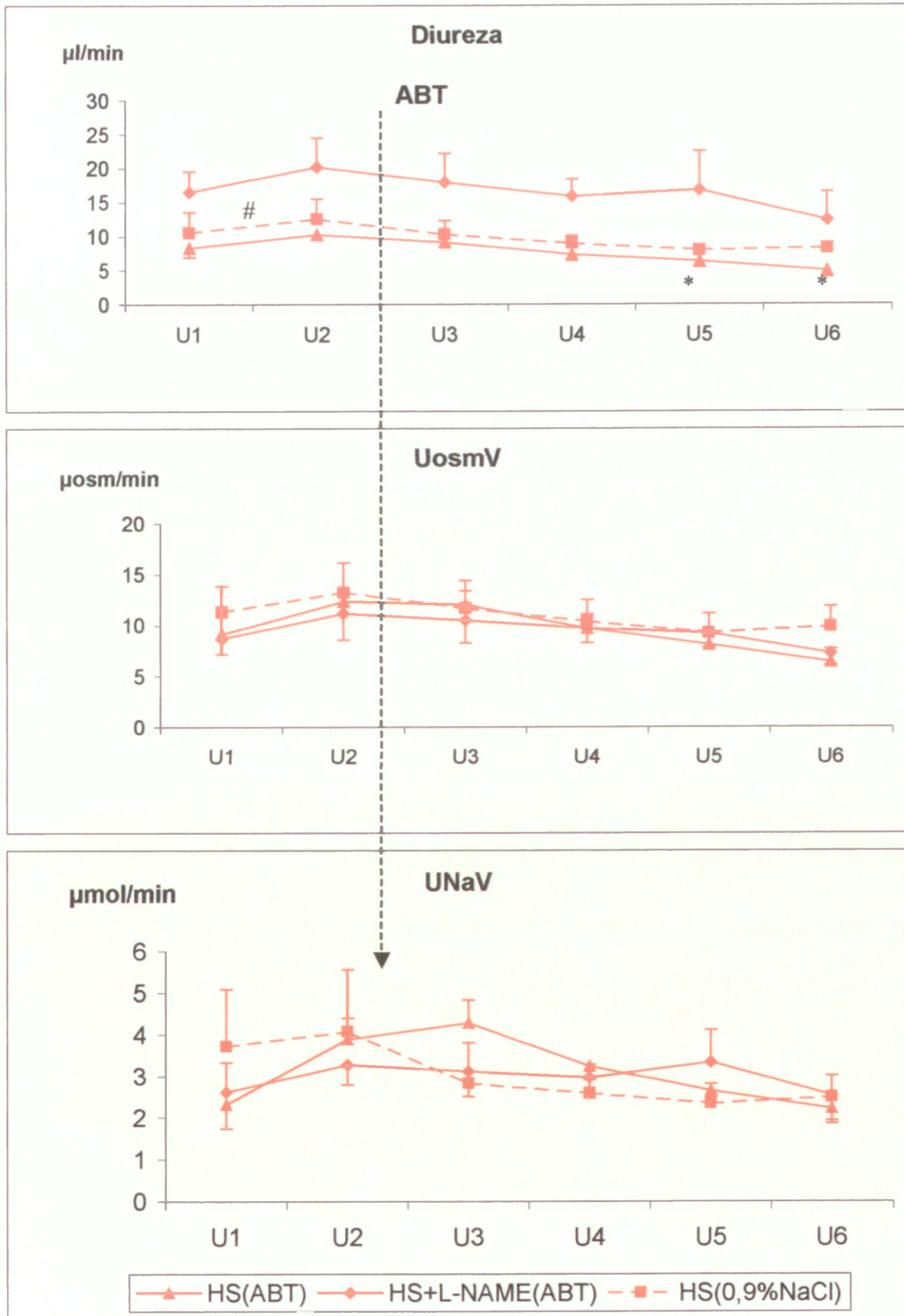


wyraźniejszą odpowiedź na ostre podanie ABT obserwowano u tych ostatnich i zmiana ta wynosiła 22% ( $p < 0,01$ ), natomiast w grupie z aktywnym szlakiem *NO* zmiana ta wynosiła 8% ( $p < 0,03$ ). Profil przebiegu zmian RBF w grupie HS(ABT) był podobny do obserwowanego po podaniu rozpuszczalnika (Ryc. 32). Po podaniu ABT obserwowano istotne obniżenie ukrwienia rdzenia nerki jedynie u zwierząt z aktywnymi syntazami NOS; maksymalna zmiana wynosiła 16% ( $p < 0,03$ ).

Jednocześnie warto zauważyć, że u zwierząt HS z chronicznie wyłączonymi syntazami *NO* wartości MAP w okresach kontrolnych były znamienne wyższe niż u zwierząt z aktywnymi enzymami NOS; różnica ta wynosiła 18 mmHg (14%,  $p < 0,004$ ). Równocześnie całkowity i rdzeniowy przepływ krwi był u tych zwierząt znamienne niższy; i tak, dla RBF różnica ta wynosiła 9 ml/min (75%,  $p < 0,001$ ) a dla MBF 66 PU (47%,  $p < 0,001$ ).

Ostre podanie inhibitora enzymów szlaku CYP-450 obniżyło wydalanie wody w obydwu grupach: maksymalne zmiany miały miejsce odpowiednio w 90 minucie (46%;  $p < 0,05$ ) dla grupy z aktywnymi syntazami *NO* i w 120 minucie (33%, zmiana nieistotna) dla grupy z zablokowanymi NOS (Ryc.33). Zablokowanie aktywności enzymów szlaku CYP-450 spowodowało bardzo zbliżone obniżenie wydalania substancji osmotycznie czynnych i sodu w obu badanych grupach; zmiany te nie osiągnęły istotności statystycznej i były zbliżone do zmian obserwowanych po podaniu rozpuszczalnika ABT (Ryc. 33).



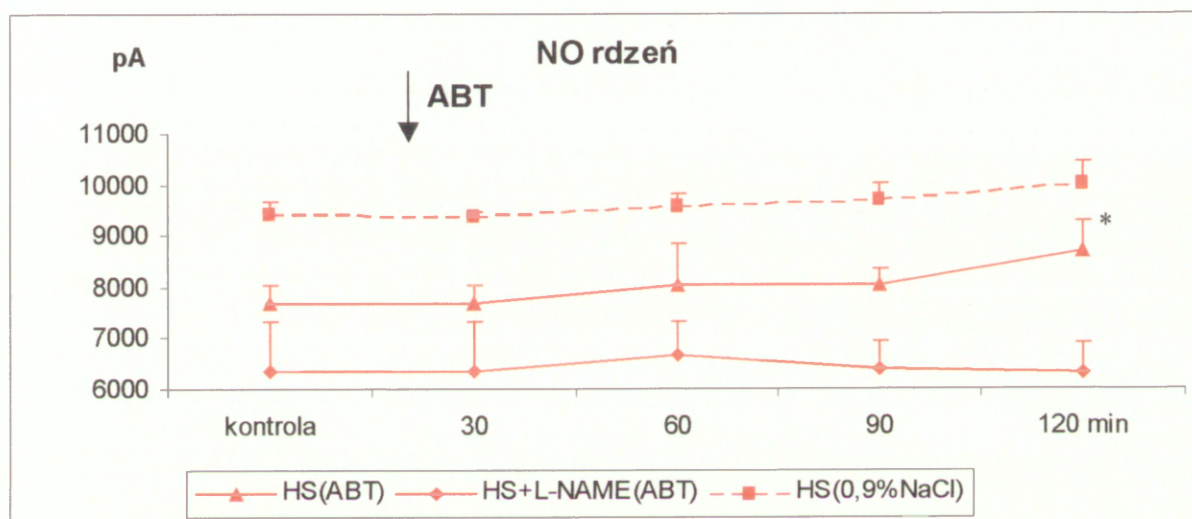


Ryc. 33. Wpływ ostrego podania ABT na wielkość diurezy i wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osmV}$ ) i sodu ( $U_{NaV}$ ) u szczurów HS poddanych ( $n=6$ ) bądź nie ( $n=7$ ), wstępnemu zahamowaniu NOS.

Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* zmiennie różne od wartości kontrolnej ( $p < 0,05$ ),  $U_1$ - $U_6$ : 30 minutowe okresy zbiórki moczu. Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.



Po ostrym zablokowaniu aktywności szlaku CYP-450 u zwierząt z aktywnymi NOS sygnał NO w rdzeniu nerki uległ podwyższeniu. Maksymalną zmianę wynoszącą 1034 pA obserwowano w 120 minucie od podania inhibitora ( $p < 0,03$ ; Ryc. 34). Należy jednak zauważyć, że pewną tendencję wzrostową obserwowano również po podaniu rozpuszczalnika ABT.



**Ryc. 34.** Wpływ ostrego podania ABT na sygnał NO mierzony w rdzeniu nerki u szczurów HS poddanych ( $n=4$ ) bądź nie ( $n=6$ ) wstępnemu zahamowaniu NOS. Wartości średnie  $\pm$  SEM, \* znamienne różne od wartości kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Pozostałe oznaczenia jak na Ryc. 26.



## **4.6. Podsumowanie wyników**

### **Wpływ diety na wyjściowe parametry hemodynamiczne i wydalinicze**

Dane przedstawione w tej części wyników zebrano z okresów kontrolnych doświadczeń ostrych (różne serie eksperymentalne).

Dane czynnościowe u szczurów utrzymywanych na diecie niskosodowej były w większości zbliżone do rejestrowanych w tzw. grupie odniesienia (STD). U LS stwierdzono jedynie istotnie wyższy przepływ krwi przez korę nerki ( $531 \pm 17$  vs.  $455 \pm 4$  PU) oraz istotnie niższą diurezę ( $2,5 \pm 0,2$  vs.  $3,8 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ) niż u zwierząt otrzymujących dietę standardową.

Zwierzęta otrzymujące paszę o zwiększonej zawartości sodu miały istotnie wyższe ciśnienie krwi (wzrost o 17 mmHg w stosunku do grupy STD), całkowity oraz korowy przepływ krwi przez nerkę niż zwierzęta utrzymywane na diecie standardowej. Wobec zbliżonej ilościowo zmiany RBF i ukrwienia korowego (dla RBF i CBF wzrost rzędu 40%), bardzo interesującym znaleziskiem był brak podobnych zmian w obrębie rdzenia nerki. Jeszcze wyraźniejszy wzrost dotyczył wydalania sodu i wody. Szczury utrzymywane na diecie wysokosodowej miały ponad dwukrotnie wyższą diurezę ( $8,5 \pm 0,9$  vs.  $3,7 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ) i aż dwudziestokrotnie wyższe wydalanie sodu ( $2,16 \pm 0,30$  vs.  $0,12 \pm 0,02$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) niż szczury otrzymujące paszę standardową.

Wydaje się, że u zdrowych szczurów nerkowy przepływ rdzeniowy, uznawany coraz częściej za istotny element kontrolujący ciśnienie krwi, jest niewrażliwy na zróżnicowaną podaż sodu, przynajmniej w badanym zakresie podaży sodu (0,15 – 4% Na).

Ogromna dysproporcja pomiędzy wzrostem  $V$  i  $U_{\text{Na}}V$  wskazuje, że zwiększone usuwanie sodu u HS odbywało się poprzez wybiórcze hamowanie jego reabsorpcji.



**Wpływ chronicznego zablokowania NOS**

Zgodnie z przewidywaniem zwierzęta otrzymujące roztwór L-NAME miały podwyższone ciśnienie krwi niezależnie od rodzaju zastosowanej diety.

Mimo podobnej odpowiedzi ze strony krążenia ogólnego, hemodynamiczna odpowiedź nerki była odmienna w zależności od podaży sodu. RBF i MBF był istotnie obniżony u wszystkich szczurów otrzymujących L-NAME, przy czym zmiany te, szczególnie dla RBF, były najgłębsze u szczurów spożywających dietę wysokosodową ( $\Delta$ RBF odpowiednio dla STD=2,2, dla LS=3,5 oraz dla HS=6,5 ml/min). Odmiennie zachował się przepływ krwi przez korę, który był istotnie niższy po L-NAME u HS ( $330 \pm 25$  vs.  $636 \pm 23$  PU), natomiast nie zmienił się u LS.

Mniejsze obniżenie wartości RBF i MBF obserwowane na diecie niskosodowej po chronicznym zablokowaniu NO, pozwala przypuszczać, że NO w warunkach obniżonej podaży sodu pełni marginalną rolę w utrzymywaniu hemodynamiki nerek, przynajmniej w obrębie rdzenia. Ponadto wydaje się, że obserwowany wzrost CBF u LS nie zależał od zwiększonej aktywności NOS, skoro ich zablokowanie nie wpłynęło na poziom ukrwienia tej strefy nerki. U szczurów LS zmiany wydalania były niewielkie i co znamienne skierowane w przeciwnym kierunku (raczej obniżenie  $U_{\text{osm}}V$  i  $U_{\text{Na}}V$ ) niż u szczurów HS czy STD. Można spekulować, że wyłączenie NOS sprzyja efektywniejszemu zatrzymywaniu  $\text{Na}^+$  u zwierząt na diecie niskosodowej.

Diureza i wydalanie substancji osmotycznie czynnych u szczurów wysokosodowych były jeszcze wyższe (podwyższone uprzednio w związku z wysokim spożyciem sodu) po zablokowaniu NOS, niż u szczurów nie poddanych chronicznej blokadzie (odpowiednio  $V$ :  $22,1 \pm 3,9$  vs.  $8,5 \pm 0,9$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $U_{\text{osm}}V$ :  $12,8 \pm 1,4$  vs.  $8,2 \pm 0,8$   $\mu\text{osm}/\text{min}$ ). Sygnał tlenu azotu w rdzeniu był niższy jedynie u szczurów HS otrzymujących L-NAME ( $6520$  vs.  $7915$  pA), choć obniżenie to nie osiągnęło istotności statystycznej.



Otrzymane wyniki sugerują, że za podwyższone ukrwienie nerki, obserwowane przy większym spożyciu sodu, w dużym stopniu odpowiada *NO*. Jego rola w kontroli ukrwienia nerki wydaje się być szczególnie ważna w sytuacji zwiększonej, jak można się spodziewać, retencji sodu i wody w następstwie wysokiej podaży sodu.

Wpływ tlenu azotu na procesy transportu w nerce jest wyraźnie odmienny w zależności od podaży sodu. Wydaje się, że tlenek azotu sprzyja zatrzymywaniu wody u szczurów utrzymywanych na diecie wysokosodowej, co mogłoby dodatkowo sprzyjać rozwojowi nadciśnienia, natomiast przeciwdziała retencji sodu na diecie niskosodowej, co również wydaje się działaniem niekorzystnym.

#### **Wpływ chronicznego zablokowania CYP-450**

Zarówno u szczurów LS jak i HS stwierdzono niższe ciśnienie krwi po chronicznym zablokowaniu CYP-450 (odpowiednio: u LS:  $98 \pm 2$  vs.  $110 \pm 2$  mmHg a u HS:  $116 \pm 3$  vs.  $128 \pm 2$ ). Jednocześnie nie było istotnych zmian ukrwienia nerki na żadnej z zastosowanych diet. Jedynie w obrębie rdzenia nerki odnotowano prawie identyczną ilościowo, nieznamienne tendencję do wzrostu ukrwienia u szczurów otrzymujących ABT (STD: wzrost o 29% HS: o 29% i LS: o 24%).

Wyraźniejsze zmiany po zablokowaniu CYP-450 dotyczyły czynności wydalniczej nerki, choć i w tym przypadku nie wszystkie osiągnęły znamienność statystyczną. Zanotowano istotne obniżenie diurezy ( $5,6 \pm 0,9$  vs.  $8,5 \pm 1,0$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ) i wydalania sodu ( $1,05 \pm 0,27$  vs.  $2,06 \pm 0,27$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) u HS oraz diurezy ( $1,6 \pm 0,2$  vs.  $3,8 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ) w tzw. grupie odniesienia (STD). Podobne tendencje do obniżenia wydalania po ABT obserwowano w pozostałych grupach doświadczalnych.

Szczury utrzymywane na diecie standardowej, u których zablokowano CYP-450 miały istotnie wyższy sygnał *NO* w rdzeniu ( $9260$  vs.  $7370$  pA,  $p < 0.05$ ), podobnie jak szczury



wysokosodowe (9070 vs. 7900 pA), przy czym w tej ostatniej grupie zmiana nie osiągnęła istotności statystycznej.

### **Wpływ ostrego zablokowania NOS**

Ostre podanie inhibitora NOS spowodowało wzrost MAP oraz obniżenie hemodynamiki nerek.

W przypadku zwierząt z grupy otrzymującej paszę STD wcześniejsze wyeliminowanie aktywności CYP-450 nie spowodowało różnic w odpowiedzi na ostre podanie L-NAME, zarówno ze strony ciśnienia jak i hemodynamiki narządu. Również zmiany w funkcji wydalniczej nerek po ostrym podaniu L-NAME nie były w sposób istotny modyfikowane przez uprzednie wyłączenie enzymów CYP-450; ostre podanie L-NAME podwyższyło diurezę i wydalanie substancji osmotycznie czynnych. Co godne odnotowania ostre zablokowanie NOS wywołało obniżenie rdzeniowego sygnału *NO* jedynie u zwierząt u których chronicznie wyłączono enzymy CYP-450 (STD+ABT i.p.); zmiana wynosiła 1300 pA.

Warty odnotowania jest fakt, że u zwierząt utrzymywanych na diecie niskosodowej wzrost MAP na ostre podanie L-NAME był mniej wyraźny i przejściowy. Ostre podanie L-NAME spowodowało porównywalny spadek RBF, niezależnie czy enzymy CYP-450 były aktywne czy nie. Podobnie zachowało się krążenie rdzeniowe; zmiany MBF wynosiły odpowiednio dla LS (L-NAME) = 42%, dla LS+ABT(L-NAME) = 37%. Ostre podanie L-NAME istotnie (4 krotnie) zwiększyło wydalanie sodu jedynie w grupie szczurów LS+ABT(L-NAME).

W przypadku ostrego zablokowania aktywności NOS u zwierząt HS obserwowano zbliżoną wzrostową odpowiedź ze strony MAP (31-33%). Ostre zablokowanie NOS spowodowało wyraźniejsze obniżenie RBF i MBF u zwierząt HS z zablokowanym



chronicznie szlakiem CYP-450. Największe obniżenie MBF obserwowano po 60 min od podania inhibitora i wynosiło ono 37% dla grupy z aktywnym CYP-450 i 45% dla grupy z wyłączonymi enzymami CYP-450. Wzrost wydalania wody, sodu i substancji osmotycznie czynnych był znacznie silniejszy po ostrym zablokowaniu NOS u zwierząt z zablokowanym uprzednio szlakiem CYP-450.

### **Wpływ ostrego zablokowania CYP-450**

Na diecie standardowej ostre podanie inhibitora szlaku monooksygenacji powodowało istotne obniżenie MAP jedynie u zwierząt STD z zahamowanymi uprzednio syntazami NOS. RBF i MBF po podaniu inhibitora obniżały się podobnie niezależnie czy enzymy NOS były aktywne czy nie. Ostre zablokowanie CYP-450 nie spowodowało istotnych zmian w wydalaniu wody, jedynie u zwierząt z zablokowanymi syntazami NOS obserwowano nieznaczny wzrost wydalania wody.

Ostre podanie ABT zwierzętom utrzymywanym na diecie niskosodowej (LS) spowodowało istotne obniżenie (10%) ciśnienia krwi jedynie u zwierząt pozbawionych w sposób chroniczny syntaz *NO*, nie spowodowało natomiast istotnych zmian w hemodynamice nerek. Dożylnie podanie ABT istotnie zwiększyło (o 80%) wydalanie substancji osmotycznie czynnych u zwierząt z aktywnym szlakiem *NO*.

Ostre podanie ABT zwierzętom utrzymywanym na diecie HS spowodowało istotne obniżenie MAP zarówno u zwierząt z aktywnymi (o 8%) jak i wyłączonymi (o 22%) syntazami *NO*.

Obserwowano także obniżenie wydalania wody, sodu i substancji osmotycznie czynnych w obu grupach eksperymentalnych.



## **5. DYSKUSJA**

### **5.1. Uwagi metodyczne**

Wzajemnie zazębiające i nakładające się procedury doświadczalne o dużym stopniu złożoności oraz fakt, że eksperymenty z zastosowaniem różnych diet i chronicznym blokowaniem szlaków metabolicznych na tle tych diet były wykonywane w naszej Pracowni po raz pierwszy spowodowały, że przyjęte protokoły badawcze mogą wydawać się niekonsekwentne a niektóre procedury, sądząc *ex post*, nie były optymalne.

#### **5.1.1. Dobór długości diety**

Różnica w czasie trwania diet: niskosodowa 10 dni vs. wysokosodowa 21 dni, wynikała z braku homogennej odpowiedzi w obrębie grupy wysokosodowej po 10 dniowym stosowaniu diety. W grupie zwierząt utrzymywanych na diecie LS obserwowano wczesną stabilność badanych parametrów i dłuższe niż 10 dniowe stosowanie diety nie powodowało pogłębienia obserwowanych zmian. Natomiast u zwierząt utrzymywanych na diecie HS przez 10 dni (wstępne doświadczenia pilotażowe) otrzymywane wyniki nie były tak homogenne. Ponadto obserwowano u nich bardzo wysoką śmiertelność bezpośrednio po podaniu narkozy lub wcześniej w trakcie doświadczenia ostrego, szczególnie u szczurów, którym podawano chronicznie L-NAME. Wydłużenie czasu trwania diety oraz obniżenie dawki anestetyku (Thiopentalu, z 0,1 mg/kg na 0,066 mg/kg) poprawiło przeżywalność zwierząt z tej grupy oraz spowodowało ujednoczenie otrzymywanych wyników.

#### **5.1.2. Dobór dawki i drogi podawania stosowanych przewlekle inhibitorów**

Nie od razu zorientowano się, że u zwierząt na diecie wysokosodowej tak znacznie wzrasta przyjmowanie wody (polidypsja). Ponieważ zwierzęta te otrzymywały L-NAME w wodzie do picia (50 mg/100 ml H<sub>2</sub>O), przyjmowana przez nie dawka tego związku była nawet trzykrotnie wyższa od dawki przyjmowanej przez zwierzęta na diecie standardowej (STD).

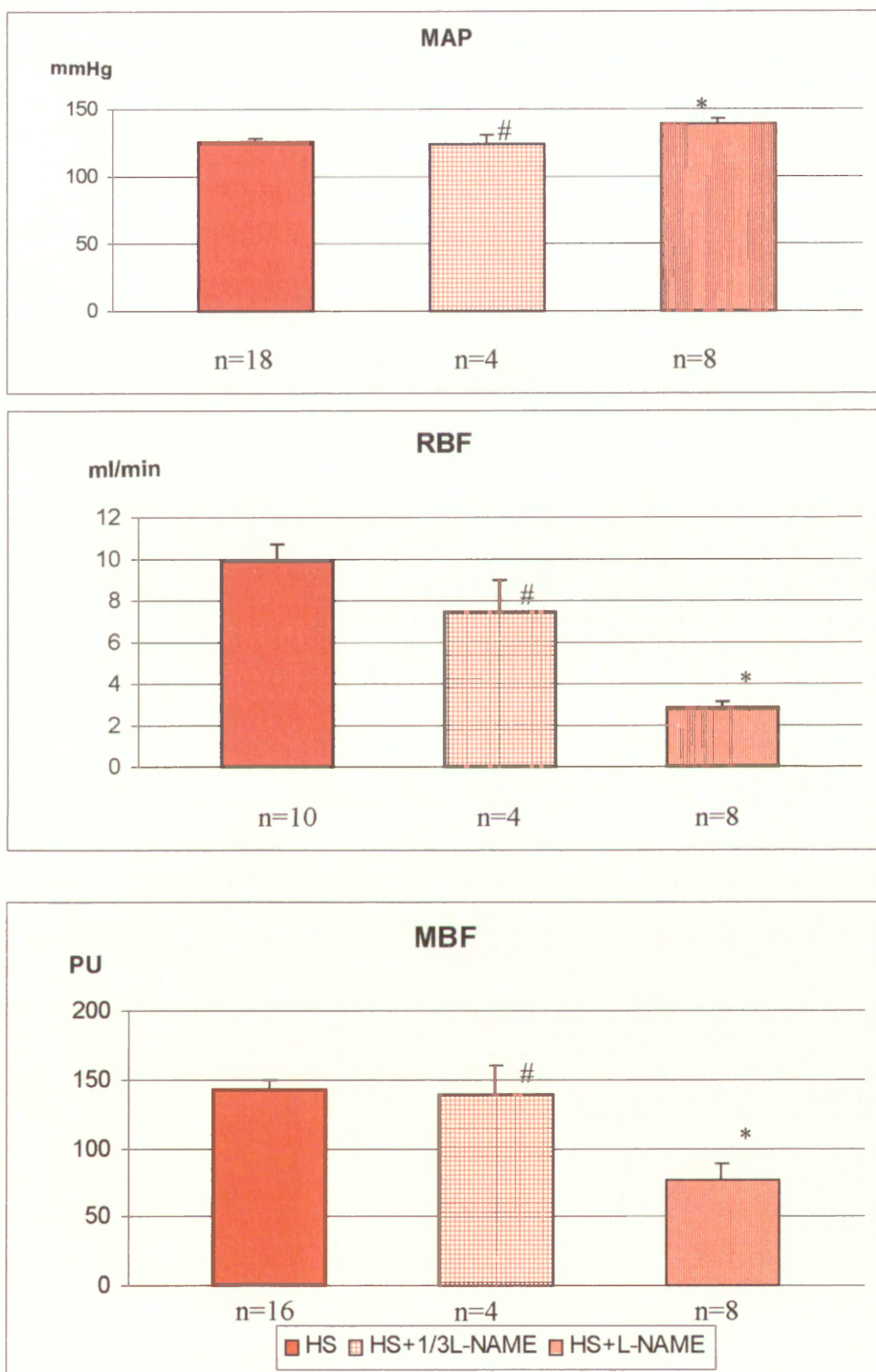


Dla oceny w jakim stopniu przyjmowanie większej dawki L-NAME wpłynęło na parametry hemodynamiczne nerki, przeprowadzono dodatkowo 4 doświadczenia podając zwierzętom HS 1/3 standardowo stosowanej chronicznie dawki L-NAME. Po porównaniu wyników uzyskanych w obu grupach (1/3 vs. pełna dawka), stwierdzono wystąpienie istotnych różnic dotyczących ciśnienia krwi, MBF i RBF (Ryc. 35).

W swoich doświadczeniach Arnal i wsp. (1992) oraz Ribeiro i wsp. (1992) także wykazali zależność ciśnienia krwi zarówno od dawki jak i czasu ekspozycji na L-NAME. Ex post można sądzić, że znacznie lepszym, choć bardziej kłopotliwym sposobem byłoby podawanie inhibitora w postaci dootrzewnowej iniekcji, podobnie jak robiono to w przypadku ABT. Jednak w większości publikacji opisujących chroniczne podawanie L-NAME stosowano taki sam sposób doustnego podawania inhibitora (Arnal i wsp., 1992; Ribeiro i wsp., 1992; Ortiz i wsp., 2001; Wang i wsp., 2001). Z drugiej strony, należy podkreślić, że (we właściwych grupach doświadczalnych) skuteczność podawanego inhibitora w podwyższaniu ciśnienia krwi była bardzo zbliżona na każdej ze stosowanych diet (rozdział „Wyniki”). Sugeruje to, że wewnątrzustrojowy „obrót” inhibitora był wyższy u zwierząt wysokosodowych, chociażby ze względu na dużo wyższe wydalanie nerkowe stwierdzone u tych zwierząt.

W celu sprawdzenia skuteczności stosowanych metod chronicznego blokowania aktywności badanych szlaków (NOS i CYP-450), przeprowadzono szereg doświadczeń (odpowiednio, n=5 i n=6), w których dokonywano tzw. podwójnego blokowania, czyli na przykład u zwierząt z zablokowanym w sposób chroniczny szlakiem CYP-450 w doświadczeniu ostrym również blokowano aktywność szlaku CYP-450 (zastosowane dawki i metody podawania były identyczne ze stosowanymi w głównych grupach doświadczalnych). Po powtórny podaniu tego samego inhibitora, zarówno L-NAME jak i ABT (w doświadczeniu ostrym, na tle podawanego chronicznie),





**Ryc. 35. Porównanie wpływu różnych dawek L-NAME (podawanych chronicznie) na średnie ciśnienie krwi (MAP), całkowity (RBF) oraz rdzeniowy (MBF) przepływ krwi przez nerkę, u szczurów utrzymywanych na diecie wysokosodowej. Wartości średnie  $\pm$  SEM \* znamienne różne od diety HS, # znamienne różne od pełnej dawki L-NAME.**



nie obserwowałam istotnych zmian w większości obserwowanych parametrów.

W przypadku powtórnego podania L-NAME wystąpił niewielki lecz znamieny statystycznie wzrost ciśnienia krwi (+1,6%) oraz dwukrotny wzrost diurezy. Dla porównania, po ostrej blokadzie NOS bez wcześniejszego, chronicznego podawania L-NAME, wzrost MAP sięgał 16%, natomiast diureza wzrosła 43-krotnie. Można więc powiedzieć, że powtórna blokada wywołuje zmiany na tyle niewielkie, iż można skuteczność metod blokowania aktywności badanych szlaków, które zastosowano w badaniach chronicznych, uznać za bardzo wysoką.

W przypadku powtórnego podania ABT, inhibitora enzymów zależnych od CYP-450, nie odnotowano żadnego wpływu na badane parametry, co sugerowało maksymalną blokadę po podawaniu chronicznym.

## **5.2. Sód w diecie oraz aktywność szlaków NOS i CYP-450 – czynniki modyfikujące MAP i parametry czynności nerek**

Celem podjętych przeze mnie badań była ocena wpływu różnej podaży sodu w diecie na ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerek u zdrowych szczurów, nie posiadających żadnych predyspozycji genetycznych w kierunku nadciśnienia. Bliżej precyzując, głównym zadaniem podjętym w prezentowanych badaniach było ustalenie roli *NO* i zależnych od cytochromu P-450 metabolitów kwasu arachidonowego w kontroli ciśnienia krwi i czynności nerek, w aspekcie ich wzajemnych relacji a także znaczenia w modyfikacji ich działania przez różną podaż sodu w diecie. Z bardzo wielu wyników i obserwacji w „Dyskusji” ograniczę się do omówienia najbardziej – moim zdaniem – kluczowych, o rzeczywistym fizjologicznym znaczeniu.

Podawanie paszy o obniżonej zawartości sodu (LS, 0,15% Na w/w) nie wywołało istotnych zmian w wartościach większości parametrów hemodynamicznych i wydalniczych nerki w porównaniu do wartości otrzymanych w tzw. grupie odniesienia (STD, szczury



karmione paszą standardową o zawartości sodu 0,25%). Obserwowano jedynie zwiększone ukrwienie kory nerki (CBF) oraz obniżenie diurezy minutowej. O ile obniżenie wydalania wody w warunkach obniżonej podaży sodu nie wydaje się zaskakujące, to wzrost ukrwienia kory nerki jest obserwacją dość ciekawą, szczególnie wobec braku wzrostu całkowitego przepływu krwi przez nerkę.

Mattson i Cowley (2003) w badaniach polegających na przewlekłej infuzji roztworów soli o różnej zawartości sodu (0,4-4%), także obserwowali wzrost korowego przepływu krwi przy podawaniu płynu o niższym stężeniu sodu; jednocześnie żaden z roztworów nie zmienił ukrwienia rdzenia nerki, zarówno zewnętrznego jak i wewnętrznego.

Za istotne zwiększenie ukrwienia kory mogą być odpowiedzialne prostaglandyny, syntetyzowane przez enzym COX-2, którego ekspresja w komórkach płamki gęstej kanalika dystalnego wzrasta w warunkach niskiej podaży sodu (Schricker i Kurtz, 1996; Harris i wsp., 1994). Wzrost stężenia naczyniorozszerzającej  $PGE_2$  prowadzi być może do rozszerzenia wrażliwych nań dystalnych odcinków tętniczek międzypłacikowych oraz tętniczek doprowadzających kłębuszków (van Rodijnen, 2007). Dodatkowym mechanizmem odpowiedzialnym za obserwowany wzrost ukrwienia kory nerki może być zahamowanie kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego (TGF), którego aktywacja prowadzi do zwężenia tętniczek doprowadzających kłębuszków. Mógłby także odgrywać tu rolę naczyniorozszerzający *NO*, którego synteza w tym samym obszarze wzrasta na diecie niskosodowej. Jednak otrzymane przeze mnie wyniki przemawiają przeciwko temu ostatniemu mechanizmowi, gdyż chroniczne zablokowanie syntaz *NO* u zwierząt utrzymywanych przez 10 dni na diecie niskosodowej (LS) nie spowodowało obniżenia ukrwienia kory nerki.

U szczurów otrzymujących paszę o podwyższonej lub wysokiej zawartości sodu



(4% Na w/w) obserwowano podwyższenie wartości prawie wszystkich mierzonych parametrów hemodynamicznych i wydalniczych nerki oraz średniego ciśnienia krwi, co nie jest wynikiem zaskakującym. U podłoża obserwowanego wzrostu ciśnienia krwi będącego przynajmniej w części „siłą napędową” dla wzrostu wydalania a także ukrwienia nerkowego może leżeć cały szereg czynników.

### **5.2.1. Czynniki kształtujące ciśnienie krwi na diecie wysokosodowej**

Jak wiadomo ciśnienie krwi pozostaje pod kontrolą wielu czynników neuronalnych, endokrynych i parakrynych; aktywność wielu z nich jest modyfikowana przez dostawę sodu (Blaustein, 2005). Zwiększona podaż sodu przekłada się na podwyższenie stężenia sodu w płynie pozakomórkowym i osoczu krwi i wpływa na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego. Friedman i wsp. (1990) stwierdzili, że nawet niewielki wzrost poziomu sodu w osoczu wywołuje proporcjonalny wzrost ciśnienia krwi. Bullpitt i wsp. (1981) w badaniach populacyjnych prowadzonych na Londyńczykach stwierdzili, że wyższemu stężeniu sodu w osoczu odpowiadały wyższe wartości skurczowego ciśnienia krwi; natomiast w podobnych badaniach Feng i wsp. (2004) stwierdzili, że obniżenie stężenia sodu w osoczu krwi powodowało znamienne obniżenie tego parametru.

Wiadomo, że zwiększona podaż sodu powoduje wzrost objętości płynów pozakomórkowych (ang. Extracellular Fluid Compartment, ECF), w konsekwencji zwiększone wypełnienie łożysk naczyniowych oraz naczyniokurczącą reakcją miogenną mięśni gładkich naczyń krwionośnych w odpowiedzi na rozciąganie ich ścian. Według de Wardenera i wsp. (2004), już niewielkie wzrosty stężenia sodu w osoczu krwi mogą bezpośrednio wpływać na ciśnienie krwi i zmiany te następują niezależnie od wspomnianego wzrostu objętości płynu pozakomórkowego. Taka obserwacja może także sugerować bardziej bezpośredni związek pomiędzy ilością sodu w organizmie a strukturą i hydromechaniką



naczyń. Zależna od sodu przebudowa ścian naczyń może doprowadzać do ich sztywności a w konsekwencji do wzrostu ciśnienia krwi. Opisano występowanie wielu zmian strukturalnych w ścianach obwodowych naczyń oporowych u pacjentów z nadciśnieniem, jednak mechanizm procesu przebudowy wciąż pozostaje nieznanym. Jako podstawę tych zmian sugeruje się stres ścian naczyń (ang. vascular wall stress), zmianę ich środowiska neurohormonalnego lub zmiany w białkach macierzy zewnątrzkomórkowej (Aalkjaer i wsp. 1987, Agabiti i wsp., 1995, Rizzoni i wsp. 1996). Wciąż trwa dyskusja, czy zmiany te są przyczyną, czy następstwem podwyższonego ciśnienia krwi.

Także Gu i wsp. (1998) stwierdzili, że dootrzewnowe podawanie szczurom roztworów o różnym stężeniu sodu, powodowało proporcjonalne do tego stężenia zmiany wartości ciśnienia krwi. Ponadto prowadzone przez nich badania na hodowlach tkankowych wskazywały, że niewielkie zmiany stężenia sodu w medium wywoływały zmiany strukturalne zarówno w komórkach mięśni gładkich naczyń, jak i w miocytach serca. Wiadomo także, że wzrost stężenia sodu w płynie pozakomórkowym może prowadzić do wzrostu aktywności współczulnej układu autonomicznego (Brooks i wsp., 2005), który wykazuje toniczny kurczący wpływ na naczynia krwionośne. W rezultacie może to skutkować wzrostem ciśnienia tętniczego krwi, nawet bez uprzedniego wzrostu wolemii.

Z całą pewnością wiadomo, że zwiększona podaż sodu powoduje wzrost ciśnienia krwi u osobników sodowrażliwych, powodując u nich rozwój sodozależnej formy nadciśnienia. Przypuszcza się, że zwiększone przyjmowanie soli prowadzi do retencji sodu, co skutkuje wzrostem jego poziomu w osoczu krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym. Doprowadza to w konsekwencji do pobudzenia współczulnego układu nerwowego poprzez pobudzenie osmoreceptorów (Brooks i wsp., 2005). Wzrost osmolalności płynów ustrojowych lub stężenia sodu powoduje odwodnienie tkanek i deformację błony komórkowej neuronów osmowrażliwych, co powoduje wzrost wydzielania wazopresyny (VP). W obrębie



układu wazopresynergicznego można wyróżnić składową odpowiedzialną za wzrost ciśnienia tętniczego, tachykardię i aktywację nerwów współczulnych unerwiających nerki.

Wazopresyna uwalniana do krwiobiegu powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Działanie pro-hipertensyjne VP spowodowane jest skurczem mięśni gładkich naczyń i wzrostem całkowitego oporu obwodowego oraz wzrostem resorpcji wody w kanalikach nerkowych i wzrostem objętości krwi. Badania elektrofizjologiczne wskazują, że w wyniku aktywacji neuronów wazopresynergicznych jądra przykomorowego dochodzi do wzrostu aktywności neuronów przedwojowych układu współczulnego. Tak więc można się spodziewać, że w sytuacji diety wysokosodowej dochodzi nie tylko do zwiększonej aktywności nerwów nerkowych ale do wzmożonej aktywności w obrębie całego układu współczulnego.

Pewnym ograniczeniem moich badań był brak oznaczeń stężenia sodu w osoczu; mierzyłam jedynie nerkowe wydalanie tego jonu ( $U_{NaV}$ ). U zwierząt otrzymujących paszę wysokosodową obserwowałam znamienne, 20-krotnie większe wydalanie sodu z moczem niż u zwierząt utrzymywanych na diecie standardowej. W badaniach prowadzonych aktualnie w naszej Pracowni dokonujemy pomiaru osmolalności osocza (Posm) w kolejnych dniach diety wysokosodowej. Na podstawie wstępnych wyników stwierdzono, że Posm w 12 dniu diety wynosiła  $334 \pm 10$  mosm/kg  $H_2O$  (wzrost o 35 mosm/kg  $H_2O$ ;  $p < 0,04$ ) natomiast w 21 dniu  $331 \pm 5$  mosm/kg  $H_2O$  (wzrost o 32 mosm/kg  $H_2O$ ;  $p < 0,01$ ). Tak więc po 21 dniach diety HS, czyli po czasie ekspozycji identycznej jak w moich badaniach, obserwowana zmiana była znacząca, co pośrednio wskazuje na wzrost poziomu sodu w osoczu, który, wraz z towarzyszącymi anionami, stanowi ok. 95% osmolalności.

Opisany wzrost osmolalności osocza na diecie wysokosodowej pozwala przypuszczać, że w tej sytuacji dochodzi do zwiększonego uwalniania wazopresyny i wzrostu aktywności współczulnej. W przeglądowym artykule Brooks i wsp. (2005) przytoczono dane mówiące o



tym, że już niewielkie, często niewykrywalne zmiany osmolalności osocza mogą powodować istotne pobudzenie układu współczulnego. Ponadto obserwowany wzrost Posm prowadzi do specyficznego zwiększenia wrażliwości (gain) w obrębie opisanego zależności osmolalności i aktywności współczulnej.

W moich doświadczeniach nie mierzyłam też aktywności układu współczulnego. W innych badaniach prowadzonych w naszej Pracowni dokonywano pomiaru częstości skurczów serca (HR) - co często uznaje się za miarę aktywności układu współczulnego, jednak nie wykazano istotnych różnic w wartościach HR pomiędzy szczurami utrzymywanymi na diecie STD a HS, chociaż obserwowano pewną tendencję wzrostową u tych ostatnich.

Tlenek azotu co najmniej w dwojaki sposób może wpływać na ciśnienie krwi u zwierząt otrzymujących dietę wysokosodową. *NO* jest substancją silnie naczyniorozszerzającą a także, w zgodzie z dość powszechnym poglądem, wywiera zarówno pre- jak i post-synaptyczne hamujące działanie na aktywność neuronalną (Nishida i wsp., 2001). Wiadomo, że u szczurów utrzymywanym na diecie wysokosodowej „biologiczne zużycie” tlenu azotu w nerce jest zwiększone (co m.in. minimalizuje stres oksydacyjny związany z intensywnym transportem kanalikowym). Zmniejszona w konsekwencji ilość biodostępnego *NO*, mimo wzrostu jego syntezy, może odpowiadać za wyższą wartość MAP u tych zwierząt.

Obserwowany wzrost ciśnienia krwi u HS może być z jednej strony wynikiem niedoboru naczyniorozszerzającego *NO*, z drugiej strony może odzwierciedlać zwiększoną aktywność współczulną. Wiadomo, że uwalnianie tlenu azotu ze śródbłonka naczyniowego wykazuje wysoką dodatnią korelację z aktywnością współczulną, co potwierdzono u ludzi mierząc stężenie azotanów w osoczu krwi. Zwiększone uwalnianie *NO* przeciwstawia się niejako naczyniokurczącemu, prohipertensyjnemu działaniu układu współczulnego



(Mc Keogh i wsp., 2004). W moich badaniach zablokowanie syntaz tlenku azotu w każdym właściwie przypadku podwyższało ciśnienie krwi, niezależnie od sposobu podawania inhibitora (blokada ostra vs. przewlekła) oraz rodzaju zastosowanej diety.

Powstaje także pytanie, czy obserwowany wzrost MAP nie wynika, przynajmniej w części, także ze wzrostu aktywności pochodnych AA powstających w szlaku CYP-450. W moich badaniach zwierzęta otrzymujące dietę wysokosodową odpowiedziały obniżeniem wartości ciśnienia krwi zarówno na ostre jak i na chroniczne wyeliminowanie enzymów CYP-450, co potwierdza pewien podstawowy udział naczyniokurczącego 20-HETE w kontrolowaniu MAP. Jak wiadomo, pochodne AA powstające w szlaku monooksygenacji zależnej od CYP-450 odgrywają ważną rolę w długoterminowej kontroli ciśnienia krwi (Roman, 2002). W wielu opisanych zwierzęcych modelach choroby nadciśnieniowej stwierdzono zaburzone powstawanie 20-HETE; np. u szczurów Dahl Salt-sensitive stwierdzono obniżoną syntezę 20-HETE z jednoczesną niezdolnością tych zwierząt do zwiększenia syntezy EETs. Natomiast u szczurów SHR (rozwijających nadciśnienie w sposób spontaniczny) obserwuje się zwiększoną syntezę 20-HETE w czasie do 10-tego tygodnia życia, czyli w okresie, w którym zwierzęta te rozwijają nadciśnienie, przy czym w ustalonej fazie choroby nie obserwuje się już różnic w jego syntezie pomiędzy szczurami SHR a ich normotensyjną kontrolą Wistar Kyoto (WKY). Nie ulega wątpliwości, że podwyższona synteza 20-HETE może prowadzić do rozwoju nadciśnienia poprzez naczyniokurczący wpływ tego związku. Ta zróżnicowana aktywność enzymów szlaku monooksygenacji CYP-450 obserwowana u zwierząt w różnych modelach nadciśnienia i wciąż niesprecyzowana ich rola w powstawaniu nadciśnienia tętniczego, skłoniła mnie do podjęcia badań na zwierzętach bez genetycznych predyspozycji do tej choroby.

Mechanizm odpowiedzialny za obserwowane przeze mnie obniżenie ciśnienia krwi po chronicznym podaniu ABT może być złożony. Po pierwsze, obniżenie MAP mogło zależeć



od wyeliminowania syntezy naczyniokurczących substancji powstających w szlaku CYP-450 metabolizmu kwasu arachidonowego, szczególnie 20-HETE. Ponadto zablokowanie aktywności enzymów CYP-450 eliminuje („uwalnia”) cząsteczkę *NO* ze wspomnianego współzawodnictwa o hem, przez co zwiększa się ilość biodostępnego tlenu azotu. Hipoteza taka znajduje potwierdzenie w obserwowanym wzroście sygnału *NO* w rdzeniu nerki (o około 1200 pA). Warto też zauważyć, że obniżeniu MAP po ABT towarzyszył znaczny (choć nieznamienny) wzrost MBF; znana jest ujemna korelacja między MBF i MAP oraz rola wielkości ukrwienia rdzenia nerki w kształtowaniu ciśnienia krwi.

Wzrost MAP u zwierząt utrzymywanych na diecie wysokosodowej (HS) potwierdza teorię Guytona wg. której do usunięcia większej ilości sodu potrzebne jest wyższe ciśnienie krwi. Wzrost ciśnienia tętniczego, niezależnie od leżących u jego podłoża mechanizmów, wywołuje wzmożone usuwanie wody i sodu przez nerki, czyli tzw. zjawisko diurezy i natriurezy z nadciśnienia („pressure diuresis” oraz „pressure natriuresis”), doprowadzając do przywrócenia kontrolnych wartości ciśnienia krwi. Jednak w przypadku długotrwałego np. (3 tygodniowego) zwiększenia spożycia sodu nie dziwi utrzymywanie się wyższego ciśnienie krwi, mimo uruchomienia całego szeregu mechanizmów dążących do przywrócenia prawidłowych jego wartości.

**Otrzymane wyniki potwierdzają znaczenie zwiększonego spożycia sodu jako istotnego czynnika ryzyka w rozwoju nadciśnienia oraz udziału obu badanych szlaków metabolicznych (NOS i CYP-450) w długoterminowej kontroli ciśnienia tętniczego.**



### **5.2.2. Ukrwienie rdzenia nerki a podaż sodu – uderzający brak zależności. Wstępne wnioski z blokowania NOS i CYP-450**

U szczurów utrzymywanych na diecie wysokosodowej zaskakujący jest brak zmian ukrwienia rdzenia nerki, przy jednoczesnym podwyższeniu wartości wszystkich mierzonych parametrów hemodynamicznych i wydalniczych. Podawanie szczurom paszy niskosodowej także nie wywołało zmian w ukrwieniu rdzenia nerki, co sugeruje, że nerkowy przepływ rdzeniowy, uznawany coraz częściej za istotny element kontrolujący ciśnienie krwi, jest niewrażliwy na różną podaż sodu w diecie, przynajmniej w ciągu 2-3 tygodniowej obserwacji i w zakresie zawartości Na<sup>+</sup> w pokarmie równym 0,15-4% w/w. Według szkoły Cowley'a i wielu innych badaczy rdzeń nerki jest bardzo ważną strukturą odpowiedzialną za długoterminową kontrolę ciśnienia krwi, a obniżenie jego ukrwienia już o 15-30% może prowadzić do rozwoju nadciśnienia. Mattson i Cowley (2003) w badaniach z zastosowaniem przewlekłych infuzji roztworów soli o różnym stężeniu sodu (0,4-4%), otrzymali podobne do moich wyniki; infuzja roztworów o niskiej zawartości sodu wywoływała wzrost korowego przepływu krwi a jednocześnie żaden z roztworów nie zmieniał ukrwienia rdzenia nerki, zarówno zewnętrznego jak i wewnętrznego.

W pracy Grossa i wsp. (1998) zaproponowano kilka możliwych mechanizmów, które potencjalnie powinny prowadzić do zmian w ukrwieniu rdzenia nerki przy zmiennej podaży sodu. Wiadomo, że działanie wielu czynników endokrynnych, parakrynnych i neuronalnych modyfikujących stopień ukrwienia rdzenia nerki ulega zmianie przy wysokiej podaży sodu.

Wzrost MBF przy wysokiej podaży sodu mógłby zależeć od zahamowania aktywności układu RAA i obniżenia poziomu krążącej Ang II. Obserwowany brak wzrostu ukrwienia tego obszaru z powodu obniżenia się poziomu Ang II może jednak tłumaczyć obserwacja Mattsona (1991) i Bądryńskiej i wsp. (2002), którzy wykazali, że rdzeń nerki nie reaguje obniżeniem ukrwienia na Ang II. Z badań Carretero i wsp. (1991) wynika, że rdzeń nerki jest



wrażliwy na naczyniorozszerzające działanie bradykininy, której nerkowa synteza jest pobudzana przez dietę wysokosodową, co teoretycznie, mogłoby także doprowadzić do wzrostu ukrwienia rdzenia nerki w warunkach podwyższonej podaży sodu.

We wczesnych badaniach mikropunkcyjnych Horster i Thureau (1968), stwierdzili, że u szczurów utrzymywanych na diecie wysokosodowej kłębuszki przyrdzeniowe filtrują jedynie 11% całej objętości przesączu nerkowego (dla porównania na diecie niskosodowej udział ten sięgał 41%). W czasach kiedy nie dysponowano wiarygodną metodą pomiaru rozdziału ukrwienia wewnątrz nerki, zakładano, że wyższa filtracja w kłębuszkach przyrdzeniowych na diecie wysokosodowej oznacza także wyższe ukrwienie rdzenia (a więc nie tylko brak wzrostu – jak w naszych badaniach – ale nawet jego obniżenie).

Badania prowadzone już od 10 lat, głównie przez grupę Mattsona, dokumentują, że wysoka podaż sodu powoduje selektywny wzrost syntezy naczyniorozszerzającego *NO* w rdzeniu nerki (Cowley i Mattson, 2003, Mattson i Higgins, 1996). Wyniki moich badań potwierdziły znaczący udział *NO* w kontroli przepływu rdzeniowego (MBF). Chroniczne zablokowanie syntaz *NO* zniżyło ukrwienie rdzenia nerki - w stopniu zależnym od rodzaju podawanej paszy, mimo, że takie zróżnicowanie nie dotyczyło podwyższenia ciśnienia krwi.

Należy podkreślić, że zastosowany w prezentowanych badaniach sposób chronicznego blokowania syntaz *NO* utrudnia jednoznaczną interpretację uzyskanych wyników. Z jednej strony można podejrzewać, że u zwierząt na diecie wysokosodowej pijących trzykrotnie więcej roztworu L-NAME o takim samym (podstawowym) stężeniu jak zwierzęta STD i LS stopień hamowania NOS był znacznie większy niż u szczurów na diecie standardowej i niskosodowej. Z drugiej strony, można uznać, że gdyby zastosowano trzykrotnie bardziej rozcieńczony roztwór inhibitora, ilość aktywnie działającego związku byłaby relatywnie mniejsza niż w pozostałych grupach dietowych, wzięwszy pod uwagę zdecydowanie szybszy



„obróć” i nerkowe usuwanie leku przez zwierzęta utrzymywane na diecie wysokosodowej.

Dodatkowym argumentem przemawiającym za porównywalnym zahamowaniem NOS we wszystkich grupach dietowych przy zastosowaniu roztworu o jednakowym stężeniu L-NAME, niezależnie od ilości wypijanych płynów, jest uzyskanie takiego samego efektu na ciśnienie krwi (wzrost o 22% u STD, o 25% u LS i 22% u HS). Można więc sądzić, że efektywność przyjętej w trzech grupach dawki była zbliżona.

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w obydwu grupach HS (z podstawową i 1/3 podstawowej dawki L-NAME) można uznać, że dieta wysokosodowa wzmacnia produkcję tlenku azotu i staje się on najważniejszą substancją naczyniorozszerzającą odpowiedzialną za utrzymanie prawidłowej hemodynamiki. Brak wzrostu MAP (125 vs. 126 mmHg) i obniżenia całkowitego (7,5 vs. 9,7 ml/min) czy rdzeniowego (139 vs. 143 PU) przepływu krwi po zastosowaniu 1/3 dawki L-NAME może świadczyć, że zmniejszona ilość L-NAME jest zbyt niska (biorąc pod uwagę „obróć” leku) bądź też, że ilość powstającego u zwierząt wysokosodowych *NO* jest tak duża, iż zastosowane hamowanie jest u tych zwierząt niewystarczające do wywołania dającego się zmierzyć efektu fizjologicznego. Z drugiej strony zdecydowanie większe obniżenie ukrwienia rdzenia nerki po chronicznym wyłączeniu NOS (przy zastosowaniu pełnej dawki L-NAME) u zwierząt utrzymywanych na diecie HS w stosunku do zwierząt utrzymywanych na diecie STD (Ryc. 35), może świadczyć albo o zwiększonym efekcie zależnym od dawki (dose response), albo może sugerować większą aktywność syntaz *NO* w rdzeniu nerki a także wskazywać na dominującą rolę *NO* w długoterminowej kontroli ukrwienia tego obszaru w warunkach zwiększonej podaży sodu (głębsze upośledzenie ukrwienia po wyeliminowaniu naczyniorozkurczającego *NO*). Wyniki uzyskane w obu grupach wzmacniają więc interpretację o znaczącym udziale *NO* w kontroli hemodynamiki nerek, szczególnie na diecie wysokosodowej.



Należy podkreślić, że ta spodziewana, duża ilość *NO* u szczurów HS nie przekładała się na wyższe ukrwienie rdzenia nerki w warunkach podstawowych. Wydaje się prawdopodobne, że wzrastająca ilość *NO* może być zużywana w innych procesach metabolicznych potęgowanych przez wysokie spożycie sodu (np. bardzo energochłonny proces transportu  $\text{Na}^+$ , z pewnością dostarczający dużej ilości wolnych rodników, do „wymiatania” których potrzebny jest *NO*) i pozostała ilość biodostępnego tlenu azotu jest już niewystarczająca aby doprowadzić do wzrostu ukrwienia rdzenia nerki.

Wobec obserwowanego braku zmian MBF w warunkach różnej podaży sodu, bardzo ciekawe wydaje się przeanalizowanie zmian w sygnale tlenu azotu mierzonym w tym regionie nerki. Wyniki tego pomiaru mogą tylko w pośredni sposób informować o ogólnoustrojowym wpływie stosowanych diet lub blokowania NOS, natomiast mogą dość dobrze opisywać zmiany zachodzące w interesującym nas obszarze nerki.

U zwierząt utrzymywanych na diecie wysokosodowej sygnał tlenu azotu był tylko nieznamienne wyższy niż u zwierząt na diecie standardowej. Obserwowana w moich badaniach „nadwyżka” sygnału *NO* (na diecie HS w stosunku do diety STD) wynosząca 733 pA, wydaje się dość duża, wzięwszy pod uwagę, że średnia zmiana po wyłączeniu wszystkich syntaz *NO* po podaniu L-NAME w dawce uznawanej za maksymalną wynosiła 560 pA. Dla porównania zakresu zmian w drugim kierunku, w badaniach prowadzonych w naszej Pracowni statystycznie istotny wzrost sygnału *NO* wynoszący 500 pA, był osiągnany po podaniu w doświadczeniach ostrych do tętnicy nerkowej donora *NO* – SNAP (Bądryńska i wsp., 2004). Obserwowany w moich doświadczeniach większy sygnał *NO* u zwierząt HS nie przełożył się jednak na większe ukrwienie rdzenia nerki. U zwierząt poddanych chronicznemu blokowaniu aktywności NOS, sygnał *NO* był niższy niż u zwierząt bez blokady. Różnica ta wynosiła aż 1053 pA, nie była jednak statystycznie znamienna.



Należy jednak podkreślić, że stosowana przeze mnie metoda pomiaru pozwala na dość wiarygodną ocenę zmian biodostępnego tlenu azotu w trakcie ciągłego eksperymentu prowadzonego u tego samego zwierzęcia, natomiast w przypadku porównań między grupami należy liczyć się z trudnościami w interpretacji uzyskanych wyników (szczególnie ze względu na brak uznanego sposobu kalibracji tej metody *in vivo*). Wspominane już wyżej trudności techniczne, takie jak konieczność częstych zmian elementu pomiarowego (selektywnej sondy węglowej), wynikająca z jej dużej delikatności i kruchości oraz dość duży udział komponenty stałej (ok. 6500 pA) w poziomie mierzonego sygnału *NO* w tkance, zmuszają do zachowania ogromnej ostrożności przy porównywaniu danych uzyskanych w różnych grupach doświadczalnych.

Mimo tych zastrzeżeń metodycznych przytoczone dane sugerują, że przy wysokiej podaży sodu aktywność syntaz *NO* jest podwyższona w rdzeniu nerki (a prawdopodobnie również w całym organizmie), co jednak nie prowadzi do wzrostu ukrwienia rdzenia równoległe do wzrostu ciśnienia krwi i ukrwienia całego narządu.

Innymi substancjami parakrynnymi mogącymi zwiększać ukrwienie rdzenia na diecie wysokosodowej są pochodne kwasu arachidonowego powstające w szlaku monoksygenacji zależnej od cytochromu P-450. Należy przypomnieć, że pochodne AA powstające w tym szlaku to substancje działające w sposób przeciwstawny na napięcie naczyń; EETs mają działanie naczyniorozszerzające, natomiast 20-HETE naczyniokurczące. Zastosowanie w prezentowanych badaniach ABT czyli nieselektywnego blokera obydwu podszlaków, pozwala jedynie sugerować przeważający udział pewnych metabolitów spośród szerszej puli związków mogących odgrywać rolę w konkretnej sytuacji doświadczalnej.

Wiadomo, że kwasy epoksyeikozatrienowe (EETs) są zaangażowane w regulację ukrwienia rdzenia nerki oraz, że dieta wysokosodowa zwiększa ich poziom w tym obszarze (Roman, 2002; Fleming, 2001). Otrzymane przeze mnie wyniki nie popierają tego ostatniego



wniosku; po chronicznym zablokowaniu enzymów CYP-450 podobne wzrosty ukrwienia rdzenia nerki obserwowano w każdej grupie (STD, LS, HS), co może świadczyć o większej syntezie naczyniokurczących (głównie 20-HETE) niż naczyniorozszerzających (EETs), pochodnych AA a ponadto, że podstawowy poziom tych pierwszych nie zależy od stosowanej diety. Być może ta dość duża podstawowa aktywność monooksygenazy produkującej 20-HETE jest odpowiedzialna za brak wzrostu ukrwienia rdzenia nerki po zastosowaniu diety HS. Należy podkreślić, że w celu lepszego wyjaśnienia udziału pochodnych AA powstających w szlaku CYP-450 należałoby wykonać doświadczenia z selektywnymi inhibitorami szlaku hydroksylacji zależnej od CYP-450. Ciągłe jednak nie jest to zadanie proste, z powodu braku dobrze rozpuszczalnych inhibitorów, które mogłyby być podawane do krążenia ogólnego.

Należy także zwrócić uwagę, że obserwowane wyższe (o 30%) ukrwienie rdzenia nerki po chronicznym blokowaniu enzymów CYP-450, może być nie tylko wynikiem eliminowania naczyniokurczącego 20-HETE, ale może także odzwierciedlać lepszą biodostępność *NO*, lub może zależeć od obu tych mechanizmów. Większa ilość *NO* po zablokowaniu CYP-450 byłaby wynikiem wyeliminowania istniejącego pomiędzy syntazami *NO* a enzymami CYP-450 współzawodnictwa o hem (Fleming, 2001). Istotnie, po chronicznym wyłączeniu enzymów CYP-450 obserwowano wyższy sygnał *NO* mierzony w rdzeniu nerki - u zwierząt na diecie STD o 1915 pA a u zwierząt HS o 1182 pA (w porównaniu ze zwierzętami bez blokady), jednak różnica ta osiągnęła znamienność jedynie w grupie STD. Zarówno wyższy sygnał *NO* jak i wyższe ukrwienie tego obszaru nerki po ABT mogą być wynikiem wyeliminowania współzawodnictwa hydroksylaz zależnych od CYP-450 o cząsteczkę hemu, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonego ukrwienia rdzenia nerki wynikającego ze zwiększonej biodostępności naczyniorozszerzającego *NO*. Podsumowując, po 3 tygodniach stosowania diety wysokosodowej efekty czynnościowe *NO* i 20-HETE wydają się być w równowadze, co prowadzi do utrzymania ukrwienia rdzenia na niezmiennym poziomie.



Wyniki uzyskane w przeprowadzonych badaniach sugerują, że ukrwienie rdzenia nerki, które coraz częściej uznawane jest za istotny element kontrolujący ciśnienie krwi, pozostaje niewrażliwe na różną podaż sodu w diecie, przynajmniej w ciągu 2-3 tygodniowej obserwacji i w zbadanym zakresie zawartości tego jonu w pokarmie (0,15-4% Na w/w).

### 5.2.3. Podaż sodu a wydalanie nerkowe

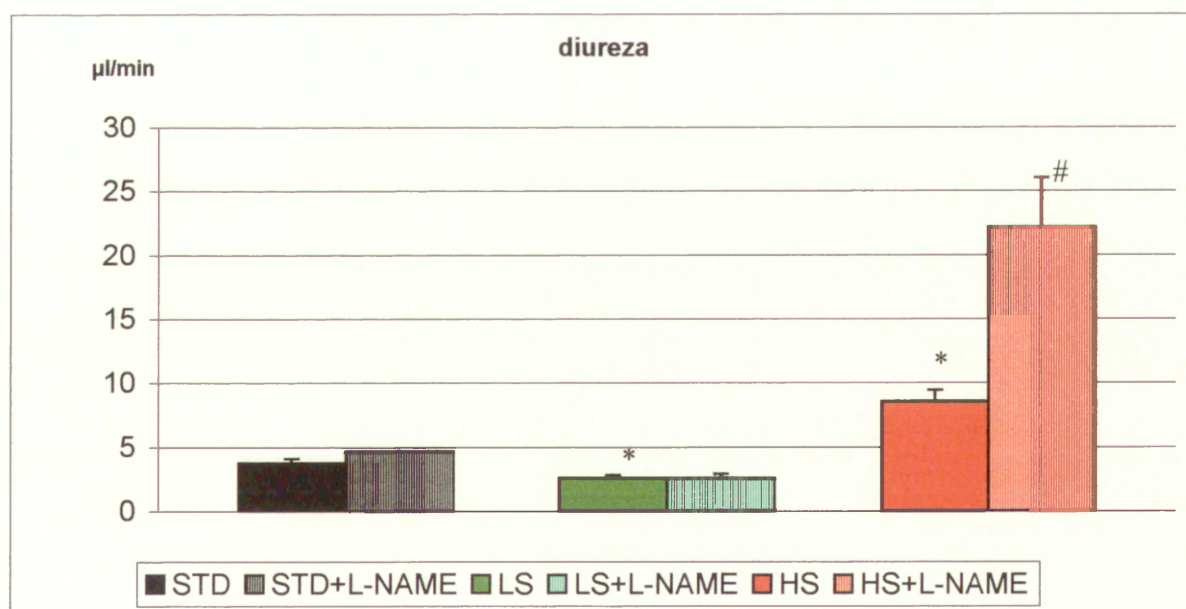
Zwiększenie wydalania nerkowego w następstwie wysokiej podaży sodu wydaje się dość oczywiste. U podłoża tego procesu leży cały szereg mechanizmów, poczynając od tak oczywistych jak diureza i natriureza z nadciśnienia czy też zwiększenie wydalania w następstwie zwiększonego ukrwienia nerki (skojarzonego zwykle ze wzrostem filtracji kłębuszkowej oraz obniżaniem zagęszczania moczu zależnym od rozproszenia gradientu osmotycznego rdzenia – zjawisko „wash out”). Należy także podkreślić, że zmiany w wydalaniu sodu są zwykle dość blisko skorelowane ze zmianami w wydalaniu wody.

Warto zauważyć, że trwająca 3 tygodnie zwiększona podaż sodu wiązała się z 20-krotnie wyższym nerkowym wydalaniem sodu, przy jedynie dwukrotnie wyższym wydalaniu wody (w porównaniu do wydalania obserwowanego u zwierząt utrzymywanych na diecie standardowej). W tej części dyskusji chciałabym zająć się jedynie udziałem badanych substancji parakrynych w procesie wzmożonej diurezy i natriurezy u szczurów wysokosodowych, a szczególnie ich rolą w obserwowanym zjawisku niemal wybiórczego usuwania sodu.

Jak wiadomo dieta wysokosodowa stymuluje powstawanie wszystkich izoform syntaz *NO* w rdzeniu nerki. Z drugiej strony natriuretyczne działanie tlenku azotu zostało potwierdzone w wielu badaniach, zarówno przy użyciu inhibitorów NOS (Bech i wsp., 1996) jak i donorów *NO* (Majid i wsp., 1993), aczkolwiek istnieją również odosobnione doniesienia



o przeciwnym, antynatriuretycznym czy antydiuretycznym działaniu *NO*. Do istotnego wzrostu wydalania wody (diurezy) po zastosowaniu inhibitorów NOS dochodziło tylko u zwierząt HS; taka sama blokada na diecie STD i LS pozostawała bez wpływu na diurezę. Zarówno po chronicznym (Ryc. 36) jak i po ostrym zablokowaniu syntaz *NO* (Ryc. 37) szczury HS wydalają 3-krotnie więcej wody niż zwierzęta z aktywnymi NOS. W związku z tym należy wspomnieć o badaniach mówiących, że aktywność neuronalnej izoformy (nNOS) zwiększa kanalikowy transport wody podobnie jak wazopresyna (Bouley i wsp., 2000; Martin i wsp. 2002). O ile dalszy wzrost diurezy i natriurezy po chronicznym i ostrym blokowaniu syntaz *NO*, można tłumaczyć eliminacją takiego właśnie antydiuretycznego działania, to specyficzny wzrost wydalania  $\text{Na}^+$  zależny jedynie od wysokiej podaży sodu jest trudniejszy do wyjaśnienia.

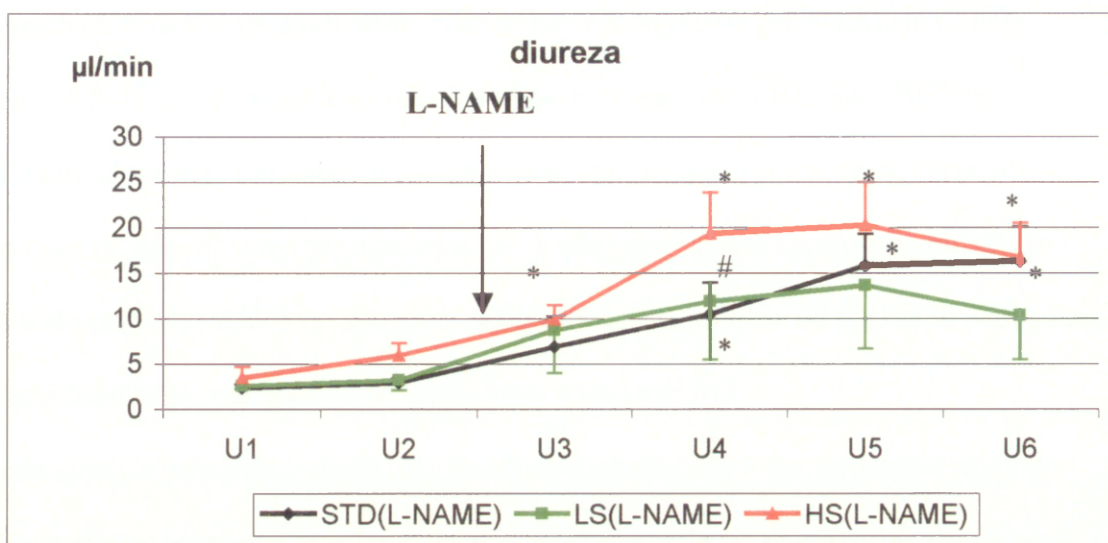


**Ryc. 36. Porównanie wpływu chronicznego blokowania aktywności syntaz *NO* na wydalanie wody, u zwierząt utrzymywanych na dietach o różnej zawartości sodu. Wartości średnie  $\pm$  SEM \* zmiennie różne od diety STD. # zmiennie różne od wartości u szczurów nie otrzymujących L-NAME.**

W świetle powyższych rozważań wydaje się, że specyficzne oszczędzanie wody przy pozbywaniu się nadmiaru sodu możliwe jest dzięki obecności *NO* – niestety zastosowanie



nieselektywnej blokady syntezy *NO* nie pozwala wypowiedzieć się jednoznacznie na temat izoformy *NO* zaangażowanej w ten proces.



**Ryc. 37. Porównanie wpływu ostrego blokowania aktywności syntaz *NO* na wydalenie wody, u zwierząt utrzymywanych na dietach o różnej zawartości sodu.**

Wartości średnie  $\pm$  SEM \* zniemennie różne od wartości kontrolnych, # „duża” średnia ( $X_n$ ) dla danych skumulowanych z okresów  $U_1$ - $U_4$ , zniemennie różna od odpowiedniej średniej dla diety STD ( $p < 0,03$ , niesparowany test Studenta), 1 okres zbiórki moczu = 30 min ( $U_1, U_2, U_3, U_4$  itd.)

Inną, poza przedstawioną, interpretację faktu wzrostu diurezy po blokadzie NOS, można by wiązać z obserwacją wzrostu sygnału *NO* u zwierząt z grupy HS po ostrym podaniu L-NAME.

Wzrost ten może na przykład zależeć od *NO* uwalnianego z S-nitrozotioili – pełniących rolę jego specyficznych magazynów. Wiadomo, że *NO* może być wiązany w S-nitrozotioiach (S-nitrozoglutation lub S-nitrozocystein) oraz z albuminą, skąd powoli uwalnia się pełniąc funkcje regulacyjno-kontrolne (Rodriguez i wsp., 2003; Salomon i wsp., 2005). Wydaje się wysoce prawdopodobne, że ostre zablokowanie syntaz *NO* (szczególnie prowadzące do głębokiego niedokrwienia nerki) powoduje uwalnianie *NO* zmagazynowanego w S-nitrozotioiach, dzięki czemu w tych warunkach doświadczalnych obserwujemy efekt diuretyczny i natriuretyczny działania *NO*.

Udział pochodnych AA powstających w szlaku monoooksygenacji (CYP-450) w niemal selektywnym usuwaniu  $Na^+$  na diecie wysokosodowej jest zapewne złożony.



Wyłączenie pochodnych AA w doświadczeniu ostrym właściwie nie zmienia ani odpowiedzi diuretycznej ani profilu wydalania substancji osmotycznie czynnych u szczurów wystawionych na wysokie spożycie sodu. Natomiast w następstwie przewlekłego (2 dni) wyłączenia CYP-450 (a więc zahamowanie powstawania zarówno EETs jak i HETEs) dochodzi do dwukrotnego obniżenia wydalania sodu oraz do mniej wyraźnego, około 30%, obniżenia diurezy. Można więc przypuszczać, że w długoterminową kontrolę wybiórczego usuwania sodu przy wysokim jego spożyciu zaangażowane są zależne od CYP-450 pochodne kwasu arachidonowego, niezależnie od omówionej wyżej roli *NO*.

Jednocześnie powstaje pytanie, czy do obserwowanego wzrostu wydalania wody po L-NAME u zwierząt utrzymywanych na diecie HS przyczyniają się diuretycznie działające pochodne AA zależne od CYP-450 (Roman, 2002). Skoro dieta wysokosodowa powoduje wzrost syntezy EET w korze i rdzeniu nerki a dodatkowo po podaniu L-NAME dochodzi do wyeliminowania omówionego wcześniej współzawodnictwa o hem syntaz *NO* i monooksygenaz zależnych od CYP-450, jest bardzo prawdopodobne, że za obserwowany wzrost wydalania wody przez zwierzęta HS po zablokowaniu NOS odpowiadają pochodne AA, zarówno EET jak i 20-HETE (Roman, 2002; Fleming, 2001).

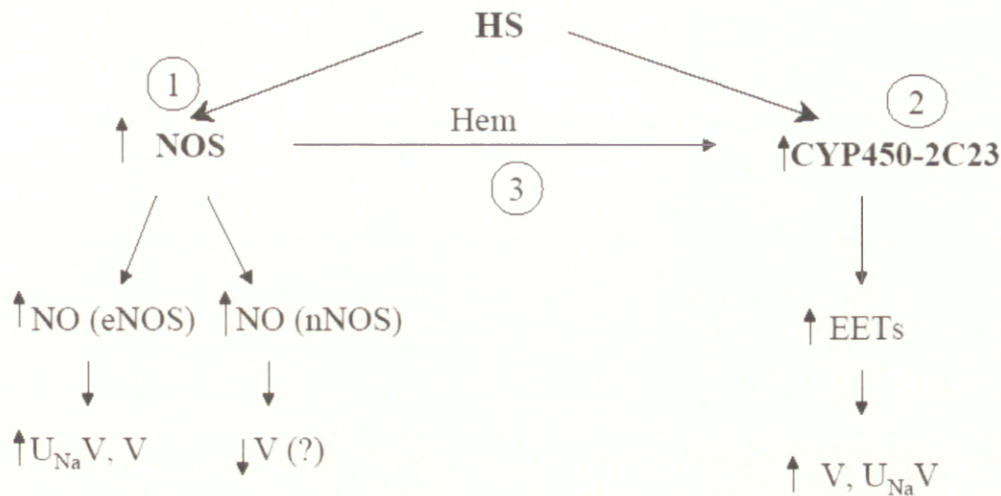
W warunkach chronicznego zablokowania aktywności syntaz *NO* wzrost nerkowego wydalania wody i sodu mógłby także zależeć od zwiększenia biodostępności hemu dla enzymów szlaku monooksygenacji CYP-450 i zwiększonej generacji ich natriuretycznie działających produktów. Co więcej, związki te mogą być w tej sytuacji czynnikami kompensującymi brak działającego natriuretycznie i antyhipertensyjnie tlenku azotu. Pośrednio przeciwko roli metabolitów szlaku CYP-450 w tej konkretnej sytuacji przemawiają jednak dane otrzymane w doświadczeniach, w których przed ostrym podaniem L-NAME zwierzętom chronicznie zablokowano szlak cytochromu P-450. Mimo takiego przygotowania, uniemożliwiającego powstawanie EETs i 20-HETE, podanie L-NAME w dalszym ciągu



zwiększało diurezę i wydalanie sodu. Próbę syntezy i proponowane mechanizmy udziału NOS i CYP-450 w kontroli wydalania sodu i wody przedstawiono na Ryc 38.

**Wyniki wskazują na funkcjonalne znaczenie (1) natriuretycznego i diuretycznego działania pochodnych AA zależnych od CYP-450 oraz (2) zjawiska kompetycji (o biodostępność hemu) pomiędzy NOS a CYP-450 w kontroli wydalania nerkowego. Zarówno *NO* - poprzez działanie podobne do AVP - oraz EETs jak i HETEs wydają się być zaangażowane w usuwanie sodu (z niewielką tylko ilością wody) przy wysokim jego spożyciu.**





Ryc. 38. Schemat proponowanych zmian w aktywności syntaz NO i CYP-450 zależnych od diety wysokosodowej i niespecyficznego blokady NOS (L-NAME). Rola w wybiórczym usuwaniu sodu na diecie HS.

1. Dieta wysokosodowa (HS) powoduje wzrost aktywności syntaz tlenku azotu (NOS), i zwiększoną jego syntezę. Tlenek azotu powstający przy udziale izoformy endotelialnej (eNOS) wykazuje działanie natriuretyczne i diuretyczne, natomiast NO powstający przy udziale izoformy neuronalnej (nNOS) prawdopodobnie ma działanie antydiuretyczne (naśladujące działanie wazopresyny).
2. Dieta HS powoduje również wzrost aktywności enzymów szlaku epoksygenacji zależnej od CYP-450 (CYP450-2C23), co powoduje wzrost syntezy natriuretycznie i diuretycznie działających kwasów epoksyeikozatrienowych (EETs).
3. Pomiędzy NO generowanym przez NOS i CYP-450 istnieje zjawisko współzawodnictwa o hem.

Podanie niespecyficznego inhibitora NOS (L-NAME) powoduje wzrost diurezy na diecie HS prawdopodobnie poprzez eliminację antydiuretycznego działania NO pochodzącego z nNOS. Ponadto L-NAME eliminuje NO z konkurencji o cząsteczkę hemu; w związku z tym aktywność CYP-450, synteza EETs i ich działanie natriuretyczne i diuretyczne wzrastają. Oba działania L-NAME prawdopodobnie sumują się. W schemacie pominięto udział kwasów hydroksyeikozatetraenowych (np. 20-HETE), których poziom według danych literaturowych ulega obniżeniu w nerce na diecie wysokosodowej.



**5.2.4. NOS i CYP-450 w kontroli ciśnienia krwi**

Wpływ zablokowania syntaz *NO* na ciśnienie krwi jest kolejnym tematem wymagającym komentarza. W przeprowadzonych doświadczeniach, zarówno chroniczne jak i ostre zablokowanie NOS wywołało oczekiwany wzrost wartości średniego ciśnienia krwi. Co ciekawe, po blokowaniu chronicznym wzrost MAP był porównywalny (w ujęciu procentowym), na różnych dietach i wynosił odpowiednio: STD - 21%, LS - 25% i HS - 22%.

Stwierdzenie zbliżonego wzrostu MAP po L-NAME jest szczególnie interesujące w odniesieniu do widocznego zróżnicowania odpowiedzi ze strony ukrwienia rdzenia nerki. Zgodnie z teorią Cowley'a, mówiącą o roli ukrwienia tego obszaru w długoterminowej kontroli MAP, można było spodziewać się większego wzrostu ciśnienia krwi u zwierząt utrzymywanych na diecie wysokosodowej, to jest tych, które zareagowały najgłębszym (50%) obniżeniem MBF na chroniczne podanie L-NAME. Należy jednak wziąć pod uwagę siłę zastosowanego bodźca; być może przewlekłe blokowanie powstawania *NO* jest tak silnym, bezpośrednim „ogólnoustrojowym” bodźcem prohipertensyjnym, że udział upośledzenia ukrwienia rdzenia nerki w ew. dalszym podwyższeniu ciśnienia krwi ma już tylko znaczenie drugorzędne i pozostaje niezauważalny.

Wiadomo również, że pod wpływem diety wysokosodowej wzrasta synteza *NO* w ośrodkowym układzie nerwowym (przegląd: Szczepańska-Sadowska, 1998), co sugeruje, że *NO* może przeciwdziałać rozwojowi nadciśnienia zależnego od zwiększonej podaży NaCl. U zwierząt normotensyjnych wzrost uwalniania tlenu azotu w ośrodkowym układzie nerwowym, szczególnie w obszarach odpowiedzialnych właśnie za regulację czynności układu krążenia (m.in. w dogłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego-RVLM), powoduje obniżenie ciśnienia tętniczego krwi oraz zmniejszenie aktywności układu współczulnego (Paczwa i wsp., 1997 w Szczepańska-Sadowska, przegląd, 1998). Podając nieselektywny inhibitor NOS, prawdopodobnie powodowałam zahamowanie aktywności

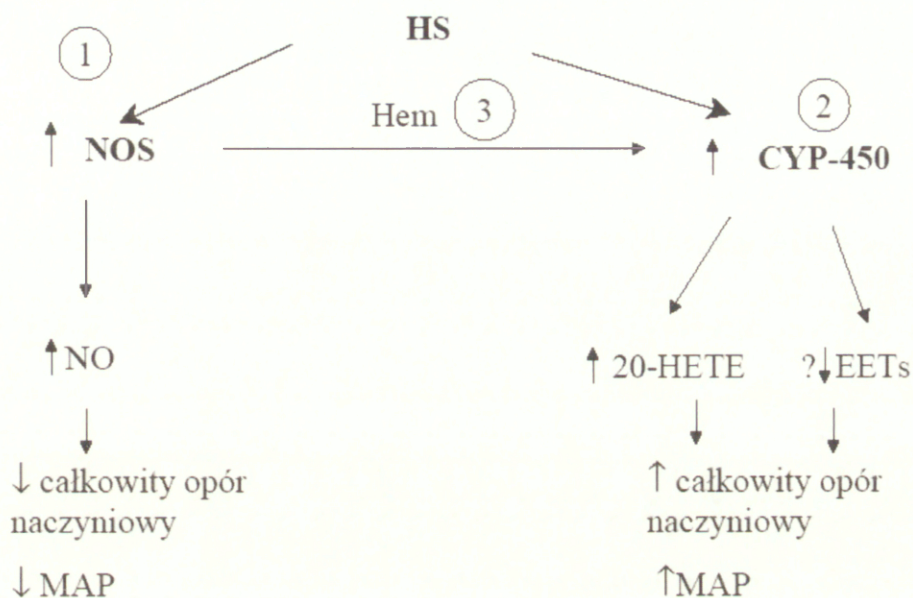


syntaz *NO* nie tylko w nerce, ale również w centralnym oraz obwodowym układzie nerwowym, a wzrost impulsacji współczulnej w obu tych układach i obszarach mógł przyczynić się do wzrostu napięcia naczyń krwionośnych po podaniu L-NAME.

Rozważając potencjalną rolę czynników kompensacyjnych w łagodzeniu wzrostu MAP po wyeliminowaniu *NO*, szczególnie u zwierząt na diecie wysokosodowej, należy wspomnieć o kwasach epoksyeikozatrienowych (EETs). Jak wiadomo, w warunkach fizjologicznych naczyniorozszerzające EETs nie wykazują znaczącego działania tonicznego na naczynia krwionośne, natomiast ich rola w kontroli ciśnienia krwi istotnie wzrasta w warunkach patologicznych, za które można uznać obniżoną czy zahamowaną syntezę *NO* (Fleming, 2001). Ponadto uważa się, że dieta HS stymuluje powstawanie EETs. Jednak otrzymane przeze mnie dane nie potwierdzają takiej interpretacji zjawisk. Dożylne podanie ABT, blokera pochodnych AA w szlaku CYP-450, na tle chronicznego zablokowania NOS obniżało istotnie ciśnienie krwi u zwierząt na diecie wysokosodowej, a także w pozostałych grupach dietowych. Wskazuje to na dominującą rolę naczyniokurczących 20-HETE, mogących jeszcze bardziej podwyższać ciśnienie krwi pod nieobecność tlenu azotu - raczej niż naczyniorozszerzających EETs, kompensujących brak *NO*. Dlatego też w schemacie ilustrującym proponowane zmiany w aktywności szlaków CYP-450 i NOS oraz ich udział w kontroli ciśnienia krwi (MAP) założono, że dochodzi do obniżenia syntezy EETs u badanych szczurów (?↓ EETs, Ryc. 39).

Równocześnie należy podkreślić, że dożylne podanie ABT na tle diety wysokosodowej obniżało ciśnienie krwi także bez uprzedniego wyeliminowania syntaz *NO*. Może to wskazywać na ważną rolę naczyniokurczącego 20-HETE w krótkoterminowej (szybkiej) kontroli MAP w warunkach wysokiego spożycia sodu. Potwierdzałoby to doniesienia literaturowe mówiące o wzroście aktywności hydroksylacji zależnej od CYP-450





Ryc. 39. Schemat proponowanych zmian w aktywności syntaz NO i CYP-450 zależnych od diety wysokosodowej i niespecyficznej blokady NOS (L-NAME). Rola w kontroli ciśnienia krwi (MAP).

1. Dieta wysokosodowa powoduje wzrost aktywności NOS i zwiększoną generację naczyniorozszerzającego NO (główna substancja hipotensyjna).
2. Dieta wysokosodowa powoduje również wzrost aktywności enzymów szlaku monoooksygenacji zależnej od CYP-450. Prawdopodobnie dochodzi do zwiększenia syntezy naczyniokurczącego 20-HETE w tętniczkach mięśni szkieletowych (co doprowadza do wzrostu całkowitego oporu naczyniowego i wzrostu MAP) i - być może - jednoczesnego obniżenia syntezy naczyniorozszerzających EETs (dalszy wzrost MAP).
3. Pomiędzy NO generowanym przez NOS i CYP-450 istnieje zjawisko współzawodnictwa o hem.

Obserwowany wzrost MAP po podaniu L-NAME zależy głównie od obniżenia poziomu naczyniorozszerzającego NO oraz od dalszego wzrostu syntezy 20-HETE, zależnie od wyeliminowania współzawodnictwa o hem. Podstawowy udział 20-HETE (komponenta hipertensyjna) w kontroli MAP na diecie wysokosodowej popierają obserwacje obniżenia MAP po podaniu nieselektywnego inhibitora CYP-450 (ABT).



pod wpływem diety wysokosodowej w naczyniach krezkowych, skórnych oraz mięśni szkieletowych (Frisbee i wsp., 2000, Wang i wsp., 2005) a więc w obszarach decydujących o całkowitym oporze naczyniowym.

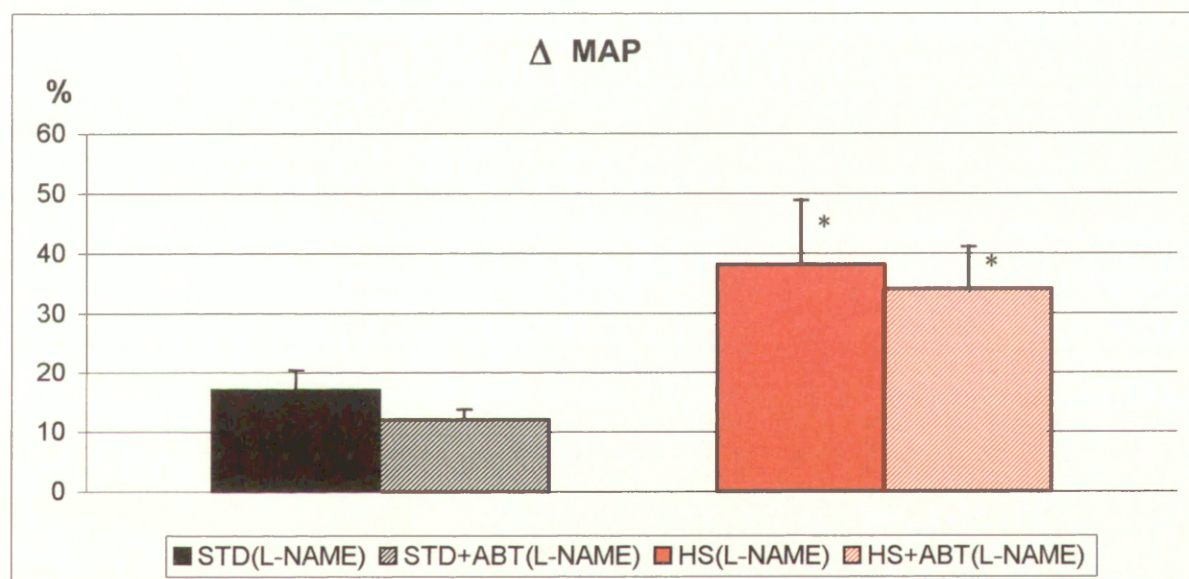
Inaczej wyglądała zmiana ciśnienia tętniczego w odpowiedzi na ostre zablokowanie NOS, które nie pozwalało na ujawnienie się, wymagających dłuższego czasu, reakcji adaptacyjnych. Obserwowano wzrost MAP po dożylniej infuzji L-NAME, tym większy im wyższa była podaż sodu w diecie. W grupie LS wzrost ten (nieznamienny) wyniósł 10%, STD - 16%, a HS - 30%, w stosunku do wartości ciśnienia krwi rejestrowanych w czasie okresów kontrolnych doświadczeń ostrych. Ponadto dożylnie podanie L-NAME u HS wywołało większy wzrost ciśnienia krwi niż przewlekłe podawanie tego związku (odpowiednio 30% i 22%), co wskazuje na dominującą rolę *NO* jako czynnika wazorelaksacyjnego biorącego udział w krótkoterminowej kontroli ciśnienia krwi, szczególnie u zwierząt wysokosodowych.

W oparciu o uzyskane wyniki można przypuszczać, że na diecie wysokosodowej *NO* jest głównym czynnikiem naczyniorozszerzającym, biorącym udział w regulacji ciśnienia krwi. Może to zależeć m.in. od faktu, że wysoka podaż sodu pociąga za sobą wzrost aktywności wszystkich trzech typów syntaz *NO* w rdzeniu nerki, ale także w innych obszarach krążeniowych (Zhu i wsp. 2007). Szybkie obniżenie ukrwienia rdzenia nerki po L-NAME mogło dodatkowo przyczynić się do obserwowanego wzrostu ciśnienia krwi (MAP), czego nie stwierdziłam po chronicznym blokowaniu NOS. Tak więc moje dane tylko częściowo potwierdzają poglądy prezentowane przez Cowley'a i wsp. o udziale hemodynamiki rdzenia w kontroli ciśnienia krwi.

Należy także pamiętać, że obserwowany wzrost MAP po ostrym podaniu blokerów NOS może być odzwierciedleniem nie tylko prostego wyeliminowania naczyniorozszerzającego *NO*, ale zależnego od braku *NO* wzrostu aktywności układu



współczulnego czy też, podobnie jak po blokadzie chronicznej, stymulacji syntezy naczyniokurczącego 20-HETE. Przeciw istotnej roli tego ostatniego czynnika przemawiają jednak dane z doświadczeń, w których dożylna infuzja L-NAME była prowadzona na tle wcześniejszej blokady enzymów CYP-450 (Ryc. 38). Wzrost MAP po L-NAME był praktycznie identyczny w przypadku potencjalnej dostępności 20-HETE jak i po wcześniejszym jego wyeliminowaniu, przynajmniej u szczurów na diecie standardowej i wysokosodowej. U szczurów otrzymujących dietę niskosodową wzrost ciśnienia po L-NAME był słabiej wyrażony a po zablokowaniu enzymów CYP-450 – przemijający (Ryc. 18).



**Ryc. 40. Porównanie zmian procentowych MAP po ostrym zablokowaniu aktywności syntaz NO u zwierząt utrzymywanych na dietach STD (czarne słupki) i HS (czerwone słupki), z aktywnymi bądź nie enzymami CYP-450 (słupki pełne lub zakreskowane). Wartości średnie  $\pm$  SEM \* zniemiennie różne od diety STD.**

**Podsumowując, po chronicznym wyłączeniu syntaz NO do wzrostu ciśnienia krwi przyczynia się prawdopodobnie 20-HETE, natomiast najważniejszą substancją hipotensyjną, szczególnie w warunkach wysokiego spożycia sodu jest tlenek azotu. Rola 20-HETE w krótkoterminowej kontroli ciśnienia krwi wydaje się być znacząca jedynie w warunkach wysokiego spożycia sodu.**



### **5.2.5. Modyfikacje interakcji pomiędzy NOS a CYP-450 przez dietę niskosodową**

Jak wspomniano wcześniej (rozdział „Wyniki”: Tabela 1), nie obserwowano uderzających różnic w ciśnieniu krwi i czynności nerki zależnych jedynie od podawania paszy niskosodowej, natomiast niska podaż sodu modyfikowała w pewnym stopniu hemodynamiczną i czynnościową odpowiedź na ingerencje w obrębie badanych szlaków metabolicznych.

Dość nieoczekiwanym wynikiem był obserwowany w grupie LS relatywnie niewielki wzrost ciśnienia krwi po dożylnym podaniu L-NAME. Jest dość oczywiste, że dieta niskosodowa stymuluje uwalnianie reniny i powstawanie angiotensyny II, substancji naczyniokurczącej oraz zwiększającej kanalikową reabsorbcję sodu. Trudno określić jaki jest udział w tym procesie stymulacji zwiększonej syntezy *NO*. Wiadomo, że niskie spożycie sodu zwiększa aktywność neuronalnej izoformy syntazy (nNOS) w komórkach płamki gęstej, co pociąga za sobą stymulację uwalniania reniny i aktywację systemu renina-angiotensyna (RAAS) (Beierwalters, 2003). Jeśli udział tej drogi stymulacji jest znaczący, można przypuszczać, że obserwowany brak wzrostu ciśnienia krwi po podaniu L-NAME może być następstwem zrównoważenia efektu braku naczyniorozszerzającego działania *NO* pochodzącego z izoformy endotelialnej (antagonizującego w warunkach podstawowych naczyniokurczące działanie Ang II) z jednej strony oraz częściowego wyeliminowania stymulacji RAAS w wyniku zablokowania izoformy neuronalnej z drugiej strony.

Również wyniki badań własnych, prowadzonych wspólnie z Zakładem Fizjologii i Farmakologii w Odense (Dania) pokazują, że aktywność reninowa osocza zależy od obecności zarówno współczulnych nerwów nerkowych jak i od aktywności nNOS. Obniżenie aktywności reninowej osocza obserwowano zarówno u zwierząt, u których przeprowadzono odnerwienie nerek jak i u tych, u których zablokowano aktywność neuronalnej syntazy NOS



(Kompanowska-Jeziarska i wsp., 2008). Otrzymane wyniki sugerują, że nerwy nerkowe stymulują uwalnianie reniny za pośrednictwem *NO* syntetyzowanego przez nNOS, oraz wskazują, że obecność obydwu elementów jest niezbędna do osiągnięcia pełnej aktywności reniny, w odpowiedzi na zmniejszenie podaży sodu. Mechanizm ten (eliminacja stymulacji RAAS przez *NO*) może więc łagodzić wzrost ciśnienia krwi, także po nioselektywnym zablokowaniu NOS u zwierząt na diecie niskosodowej.

Rozpatrując udział pochodnych AA zależnych od CYP-450 w zmianach ciśnienia po L-NAME należy wspomnieć, że ich obecność zapobiegała szybkiemu powrotowi ciśnienia krwi do wartości kontrolnych, po wzroście wywołanym przez dożylnie podanie tego inhibitora (patrz „Wyniki”, Ryc. 18). Można przypuszczać, że w tej konkretnej sytuacji utrzymujące się podwyższone stężenie naczyniokurczącego 20-HETE jest ważniejszym niż sam brak *NO* czynnikiem, odpowiedzialnym za niezbyt duży ale utrzymujący się przez 2 godziny wzrost ciśnienia krwi na diecie niskosodowej.

Równocześnie nie obserwowano także żadnych zmian ciśnienia krwi po dożylnym podaniu ABT u szczurów LS, u których syntazy *NO* były aktywne. Dopiero wcześniejsze wyłączenie NOS pozwoliło na ujawnienie się obniżenia MAP po dożylnym podaniu ABT (po nałożeniu blokady CYP-450). Wydaje się prawdopodobne, że w warunkach diety niskosodowej wpływy produktów badanych szlaków metabolicznych znajdują się w równowadze, i dlatego nie można wykazać dominującej roli żadnego z nich w krótkoterminowej (szybkiej) kontroli ciśnienia tętniczego.

W prezentowanych badaniach, na podstawie danych uzyskanych w doświadczeniach z nioselektywnym blokerem CYP-450 (ABT) podawanym w sposób przewlekły, wykazywano natriuretyczne działanie metabolitów AA powstających w szlaku zależnym od CYP-450, szczególnie u szczurów na diecie STD i HS. Ostre, dożylnie podanie ABT nie prowadziło u



tych zwierząt do obniżenia diurezy i natriurezy. Na diecie niskosodowej obserwowano nieco inną reakcję na blokowanie enzymów szlaku CYP-450 (Ryc. 30).

Należy zwrócić uwagę, że obniżenie wydalania wody i sodu u szczurów LS w wyniku chronicznego podawania ABT było słabiej wyrażone niż u zwierząt utrzymywanych na diecie standardowej i wysokosodowej (nie osiągnęło znamienności statystycznej, mimo dużej liczebności w obrębie porównywanych grup). Z drugiej strony tylko w grupie LS podany dożylnie inhibitor CYP-450 wywoływał znaczącą odpowiedź wydalniczą. Infuzja rozpuszczalnika - soli izotonicznej (Ryc. 30 panele: górny i dolny) u szczurów LS powodowała wzrost diurezy i natriurezy (wynikający najprawdopodobniej z nadmiernego tempa infuzji), natomiast dożylnie podanie ABT w czasie doświadczenia hamowało to zjawisko.

W świetle dostępnej wiedzy u szczurów na diecie niskosodowej dochodzi do kilkukrotnego wzrostu ekspresji białka CYP-450 4A, odpowiedzialnego za syntezę 20-HETE. Stwierdzono, że powstawanie 20-HETE jest istotnie większe zarówno w kłębuszku nerkowym (Ito i wsp., 1999) jak i w rdzeniu zewnętrznym (najprawdopodobniej w komórkach kanalików) (Hoagland i wsp., 2004); w tych ostatnich badaniach stwierdzono, że także wydalanie 20-HETE w moczu istotnie wzrasta po dwutygodniowej diecie niskosodowej. Z drugiej strony wykazano, że u szczurów Dahl salt sensitive (Dahl SS) nie dochodzi do zmian aktywności białka CYP-450 4A w zależności od podaży sodu i - co ważniejsze - aktywność ta jest zdecydowanie niższa niż u szczurów kontrolnych (tzw. sodoopornych). W związku z tym można podejrzewać, że istotną przyczyną obserwowanej w moich badaniach wzmoczonej czynności wydalniczej nerki w odpowiedzi na ostre „przewodnienie” (nadmierne tempo infuzji) są natriuretycznie działające pochodne AA zależne od CYP-450, najprawdopodobniej 20-HETE. Należy także pamiętać, że kwasy 20-hydroksyeikozatetraenowe są odpowiedzialne za uwrażliwienie kanalikowo-kłębuszkowego



sprężenia zwrotnego (TGF), jednak z powodu braku informacji dotyczących np. poziomu sodu w osoczu, czy filtracji kłębuszkowej trudno roztrząsać kierunek zmian zależnych od podwyższonej reaktywności tego sprężenia. Podsumowując, skoro dożylne podanie ABT upośledzało diuretyczną i natriuretyczną reakcję na zwiększoną podaż płynów, można uznać, że na diecie niskosodowej pochodne AA powstające w szlaku zależnym od CYP-450 (przede wszystkim 20-HETE) mają istotne znaczenie w utrzymywaniu stałej objętości i składu płynów ustrojowych.

**Wydaje się, że ani tlenek azotu ani i pochodne AA (szlak CYP-450) nie odgrywają kluczowej roli w krótkoterminowej kontroli MAP w warunkach niskiej podaży sodu, natomiast 20-HETE jest prawdopodobnie zaangażowany w szybką regulację objętości i składu płynów ustrojowych.**



Zastosowanie u szczurów wyprzedzającej, chronicznej blokady aktywności syntaz tlenku azotu (NOS) lub enzymów szlaku monoooksygenacji kwasu arachidonowego zależnej od cytochromu P-450 (CYP-450) z następczym blokowaniem aktywności „nietkniętego” szlaku w doświadczeniach ostrych, umożliwiło porównawczą ocenę udziału produktów badanych szlaków w regulacji ukrwienia i czynności wydalniczej nerki oraz w krótko- i długoterminowej kontroli ciśnienia krwi w warunkach różnej podaży sodu.

1. Potwierdzono znaczenie zwiększonego spożycia sodu jako istotnego czynnika sprzyjającego rozwojowi nadciśnienia oraz udział obu badanych szlaków metabolicznych (NOS i CYP-450) w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi. Potwierdzono również, że różna podaż sodu modyfikuje wzajemne relacje pomiędzy NOS i CYP-450 i ponadto zmienia ich udział w regulacji czynności nerki.
2. Ukrwienie rdzenia nerki, obszaru coraz częściej uznawanego za istotny w kontroli ciśnienia krwi, pozostaje niewrażliwe na różną podaż sodu w diecie, przynajmniej w ciągu 2-3 tygodniowej obserwacji i w badanym zakresie zawartości tego jonu w pokarmie (0,15-4% Na w/w).
3. Potwierdzono natriuretyczne i diuretyczne działanie pochodnych kwasu arachidonowego powstających w szlaku monoooksygenacji zależnej od CYP-450, oraz przedstawiono dane zgodne z koncepcją kompetycji o biodostępność hemu pomiędzy *NO* (produkt NOS) a CYP-450.



4. Najważniejszą substancją wykazującą działanie hipotensyjne, szczególnie w warunkach wysokiego spożycia sodu, jest tlenek azotu; 20-HETE w sposób istotny przyczynia się do wzrostu ciśnienia krwi pod nieobecność *NO*.
  
5. Można podejrzewać, że zarówno tlenek azotu jak i badane pochodne AA nie odgrywają kluczowej roli w krótkoterminowej (szybkiej) kontroli ciśnienia w warunkach niskiej podaży sodu. Naczyniokurczące pochodne AA zaangażowane są prawdopodobnie w długoterminową kontrolę ciśnienia krwi zarówno przy niskiej jak i wysokiej podaży sodu w diecie, pozostając bez wpływu na ciśnienie u szczurów pozostających na diecie standardowej.
  
6. W warunkach niskiej podaży sodu pochodne AA zależne od CYP-450, prawdopodobnie 20-HETE, wydają się odgrywać istotną rolę w krótkoterminowej regulacji objętości i składu płynów ustrojowych





1. Aaklajaer C., Haegerty A.M., Petersen K.K. Evidence for increased media thickness, increased neural amine uptake, and depressed excitation-contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ. Res.*; 61: 181-186, 1987
2. Agabiti-Rosei E., Risoni D., Castellano M. Media: lumen ratio in human small resistance arteries is related to forearm minimal vascular resistance. *J. Hypertens.*; 13:341-347, 1995
3. Arnal J.F., Warin L., Michel J.B. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.*; 90: 647-652, 1992
4. Bachmann S., Bosse H.M., Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am. J. Physiol. 268 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 37)*; F885-898, 1995
5. Bądryńska B., Grzelec-Mojzesowicz M., Dobrowolski L., Sadowski J. Differential effect of angiotensin II on blood circulation in the renal medulla and cortex of anaesthetized rats. *J. Physiol.*; 538: 159-166, 2002
6. Bech J.N., Nielson C.G., Pederson E. B., Effects of NO synthesis inhibition on RPF, GFR,  $U_{Na}$  and vasoactive hormones in healthy humans. *Am. J. Physiol.* 270: F845—F851, 1996
7. Beierwalters W.H. Sympathetic stimulation of renin is independent of direct regulation by renal nitric oxide. *Vascul. Pharmacol.* 40(1): 43-9, 2003
8. Biondi M.L., Romero J.C. Nitric oxide mediated reactions stimulate cyclic GMP in the dog kidney. *J. Vasc. Med. Biol.*; 2: 294-298, 1990
9. Bouley R., Breton S., Sun T.X., McLaughlin M., Nsumu N.N., Lin H.Y., Ausiello D.A., Brown D. Nitric oxide and atrial natriuretic factor stimulate cGMP-dependent membrane insertion of aquaporin 2 in renal epithelial cells. *J. Clin. Invest.*; 106: 1115-1126, 2000
10. Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W., Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Froehner S.C., Brendt D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*; 84: 757-767, 1996
11. Breyer M.D., Breyer R.M. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 279: F12-23, 2000
12. Brooks V.L., Haywood J.R., Johnson A.K. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 32: 426-432, 2005
13. Bullpitt C.J., Shipley M.J., Semmence A. Blood pressure and plasma sodium and potassium. *Clin. Sci. (Lond)*, 61: 85-75, 1981
14. Burdan F., Chałas A., Szumilo J. Cyclooxygenase and prostanoids – biological implications. *Postepy Hig. Med. Dośw.*; 60: 129-141, 2006
15. Capdevila J.H., Falck J.R. The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases: from cell signaling to blood pressure regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 285: 571-576, 2001.
16. Carroll M.A., Balazy M., Huang D.D., Rybalova S., Falck J.R., McGiff J.C. Cytochrome P-450-derived renal HETEs: storage and release. *Kidney Int.*; 51: 1696-1702, 1997



17. Carroll M.A., Garcia M., Falck J.R., McGiff J.C. 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid, a novel arachidonate metabolite. Mechanism of vasoactivity in the rat. *Circ. Res.*; 67: 1082-1088, 1990
18. Carretero O., Scicli A.G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* 18: 158-169, 1991
19. Chataigneau T., Feletou M., Duhault J., Vanhoutte P.M. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*; 123: 574-580, 1998
20. Chen J.K., Capdevila J., Harris R.C. Cytochrome P450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*; 21: 6322-6331, 2001
21. Chen J., Capdevila J.H., Zeldin D.C., Rosenberg R.L. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by epoxyeicosatrienoic acids. *Mol. Pharmacol.*; 55: 288-295, 1999
22. Cho H.J., Xie Q.W. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *Journal of Experimental Medicine.*; 176: 599-604, 1992
23. Cooper C.E. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*; 5:1411, 1999
24. Cowley A.W., Mori T., Mattson D., Zou A.P. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284(6): R1355-1369, 2003
25. Dahl L. K. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. *Essential hypertension-an International Symposium. Berlin: Springer, 1960*
26. de Wardener H.E., He F.J., MacGregor G.A., Plasma sodium and hypertension. *Kidney Int.*; 66(6): 2454-2466, 2004
27. Denton D. Can hypertension be prevented? *J. Hum. Hypertens.*; 11: 563-569, 1997
28. Dobrowolski L., Bądryńska B., Sadowski J. Differential effect of furosemide on renal medullary and cortical blood flow in the anaesthetised rat. *Exper. Physiol.*; 85: 783-789, 2000
29. Fang X., Hu S., Watanabe T., Weintraub N. L., Snyder G.D., Yao J., Liu Y., Shyy J.Y.J., Hammock B.D., Spector A.A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by substituted urea-derived soluble epoxide hydrolase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314: 260-270, 2005
30. Fisslthaler B., Popp R., Kiss L., Potente M., Harder D.R., Fleming I., Busse R. Cytochrome P-450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*; 401: 493-497, 1999
31. Fleming I. Cytochrome P450 and Vascular Homeostasis. *Circ. Res.*; 89: 753-762, 1991
32. Fleming I, Busse R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension*; 47: 629-633, 2006.
33. Franco M., Bell P.D., Navar L.G. Evaluation of prostaglandins as mediators of tubuloglomerular feedback. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.*; 254: F642-F649, 1988
34. Friedman S.M., McIndoe R.A., Tanaka M. The relation of blood sodium concentration to blood pressure in the rat. *J Hypertens*; 8:61-66, 1990
35. Frisbee C.J., Falck J.R., Lombard J.H. Contribution of cytochrome P-450  $\omega$ -hydroxylase to altered arteriolar reactivity with high-salt diet hypertension. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*; 278: H1517-H1526, 2000
36. Froment A., Milon H., Gravier C. Relationship of sodium intake and arterial hypertension. Contribution of geographical epidemiology. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.*; 27:437-454, 1979
37. Gibson G.C. Comparative aspects of the mammalian cytochrome P-450 IVA gene family. *Xenobiotica*; 19: 1123-1148, 1989



38. Gleibermann L. Blood pressure and dietary salt in human populations. *Ecol. Food Nutr.*; 2:143-156, 1973
39. Gross V., Kutrh T., Skelton M.M., Mattson D.L., Cowley A.W. Effects of daily sodium intake and ANGII on cortical and medullary renal blood flow in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: 1317-1323, 1998
40. Grzelec-Mojzesowicz M., Sadowski J. Renal tissue NO and intrarenal haemodynamics during experimental variations of NO content in anaesthetized rats. *J. Physiol. Pharmacol.*; 58: 149-163, 2007
41. Gu J.W., Anand V., Shek E.W., Moore M.C., Brady A.L., Kelly W.C., Adair T.H. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension*; 31: 1083-1087, 1998
42. Guyton A.C. Blood pressure control - special role of the kidneys and body fluids. *Science*; 252, 1813-1816, 1991
43. Harris R.C., McKanna J.A., Akai Y., Jacobson H.R., Dubois R.N., Breyer M.D., Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of the rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest*; 94: 2504-2510, 1994
44. He X.R., Greenberg S.G., Briggs J.P., Schnermann J.B. Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 37); 268: F95395-F95399, 1995
45. Helvig C., Dishman E., Capdevila J.H. Molecular, enzymatic and regulatory characterization of rat kidney cytochromes P-450 4A2 and 4A3. *Biochemistry*; 37: 12546-12558, 1998
46. Heyman S. Intrarenal nitric oxide monitoring with a Clark-type electrode: potential pitfalls. *Kidney Int.*; vol.51; 1619-1623, 1997
47. Higashi Y., Oshima T., Ono N. Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in humans. *J. Clin. Endocr. Metab.* 80: 239-242, 1995
48. Hoagland K.M., Flasch A.K., Roman R.J. Inhibitors of 20-HETE formation promote salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension*; 42: 669-673, 2003
49. Hoagland K.M., Maier K.G., Godbert S.L., Aebly M.R., Falsch A.K., Roman R.J. Effects of dietary salt on renal metabolism of arachidonic acid in inbred strains of rats (Abstract). *FASEB J* 15: A147, 2001
50. Horster M., Thurau K. Micropuncture studies on the filtration rate of single superficial and juxtamedullary glomeruli in the rat kidney. *Arch. Gen. Physiol*; 301: 162-181, 1968
51. Hu S., Kim H.S. Activation of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur. J. Pharmacol.*; 230: 215-221, 1993
52. Imig J.D. Eicosanoid regulation of the renal vasculature *Am. J. Physiol. Renal Physiology.*; 279, F965-F981, 2000
53. Imig J.D., Navar L.G., Roman R.J., Reddy K.K., and Falck J.R. Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *J. Am. Soc. Nephrol.*; 7: 2364-2370, 1996
54. Imig John D. Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 289: F496-F503, 2005
55. Intersalt Cooperative Research Group, Intersalt: An International Study of Electrolyte Excretion and Blood Pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *Br. Med. J.*; 297: 319-328, 1988
56. Ito O., Alonso-Galicia M., Hopp K.A., Roman R.J. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 274: F395-F404, 1998



57. Januszewicz A., Januszewicz W., Szczepańska-Sadowska E., Sznajderman M. Nadciśnienie tętnicze. Medycyna Praktyczna; Kraków 2004
58. Januszewicz W., Sznajderman M. Nadciśnienie tętnicze. PZWL; Warszawa 1987
59. Kakoki M., Zou A., Mattson D. The influence of nitric oxide synthase 1 on blood and interstitial nitric oxide in the kidney. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative Comp. Physiol.* 281: R91-R97, 2001
60. Katoh T., Takahashi K., Capdevila J., Karara A., Falck J.R., Jacobson H.R., Badr K.F. Glomerular stereospecific synthesis and hemodynamic actions of 8,9-epoxyeicosatrienoic acid in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte. Physiol.*; 261:F578-F586, 1991
61. Khan K.N., Venturini C.M., Bunch R.T., Brassard J.A., Koki A.T., Morris D.L., Trump B.F., Maziasz T.J. Alden C.L. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol. Pathol.*; 26, 612-620, 1998
62. Kiechle F.L., Maliński T. Nitric oxide. Biochemistry; Pathophysiology and Detection. *Am. J. Clin. Pathol.*; 100:67-575, 1993
63. Knowles R.G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* 298: 249-258, 1994
64. Kompanowska-Jezińska E., Wolff H., Kuczeriszka M., Gramsbergen J.B., Walkowska A., Johns E. J., Bie P. Renal nerves and nNOS: roles in natriuresis of acute isovolumetric sodium loading in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*; 294, R1130-R1139, 2008
65. Kreötz F., Riexinger T., Buerkle M.A., Nithipatikom K., Gloe T., Sohn H.Y., Campbell W.B., Pohl U. Membrane potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 24: 595-600, 2004.
66. Laethem R.M., Koop D.R. Identification of rabbit cytochromes P-450 2C1 and 2C2 as arachidonic acid epoxygenases. *Mol. Pharmacol.*; 42: 958-963, 1992
67. Lee H.C., Lu T., Weintraub N.L., VanRollins M., Spector A.A., Shibata EF. Effect of epoxyeicosatrienoic acids on the cardiac sodium channels in isolated rat ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)*; 519: 153-168, 1999
68. Maier K.G., Roman R.J. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*; 10, 81-87, 2001
69. Majid D.S.A, Williams A., Kadowitz P.J., Navar L.G. Renal responses to intra-arterial administration of nitric oxide donors in dogs. *Hypertension*; 22: 535-541, 1993
70. Makita K., Takahashi K., Karara A., Jacobson H.R., Falck J.R. Capdevila J.H. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induce hypertension in rats fed a high salt diet. *J. Clin. Invest.*; 94: 2414-2420, 1994.
71. Marsden P.A., Hall A.V., Brenner B.M. reactive nitrogen and oxygen intermediates and the kidney. *The Kidney*: 713-753, 1996
72. Martin P.Y., Bianchi M., Roger F., Niksic L. Feraille E. Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 283, F559-F568, 2002
73. Mattson D.L., Higgins D.J. Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension* 27: 688-692, 1996
74. Mattson D.L., Raff H., Roman R.J. Influence of angiotensin II on pressure-natriuresis and renal hemodynamics in volume-expanded rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol.* 29: R1200-R1209, 1991



75. McConnaughey M.M., McConnaughey J.S., Ingenito A.J. Practical considerations of the pharmacology of angiotensin receptors blockers. *J. Clin. Pharmacol.*; 39:547-559, 1999
76. McKeogh D.F., O'Donaughy T.L., Brooks V.L. NO and endogenous angiotensin II interact in the generation of renal sympathetic nerve activity in conscious rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*; 284: H1258-H1265, 2004
77. Michaelis U.R., Fisslthaler B., Barbosa-Sicard E., Falck J.R., Fleming I., Busse R. Cytochrome P450 epoxygenases 2C8/9-derived are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *J. Cell Sci.*; 118: 5489-5498, 2005.
78. Michaelis U.R., Fleming I. From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacol. Ther.*; 111: 584-595, 2006.
79. Mohaupt M.G., Elzie J.L., Clapp W.L., Wilcox C.S., Kone B.C. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int.*; 46: 653-665, 1994
80. Nishida Y., Chen Q.H., Tandai-Himura M., Terada S., Horiuchi J. Neuronal nitric oxide strongly suppresses sympathetic outflow in high-salt Dahl rats. *J. Hypertens.* 19: 627-634, 2001
81. Oikarinen L., Nieminen M.S., Toivonen L. LIFE Study of echocardiographic and electrocardiographic left ventricular hypertrophy in hypertensive patients: the Losartan Intervention For Endpoint Reduction (LIFE) Study. *Am. Heart J.*; 145: 919-925, 2003
82. Ortiz M.C., Fortepiani L.A., Martinez-Salgado C., Eleno N., Atucha N.M., Lopez-Nova J.M., Garcia-Estan J. Renal effects of the chronic inhibition of nitric oxide synthesis in cirrhotic rats with ascites. *Nefrologia.*; 21(6):556-564, 2001
83. Ortiz P.A., Garvin J.L. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*; 282: F777-F784, 2002
84. Oyekan O. Differential effects of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid on intrarenal blood flow on the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 313(3): 1289-1295, 2005
85. Paczwa P., Budzikowski A.S., Szczepańska-Sadowska E. Role of endogenous centrally released NO in cardiovascular adaptation to hypovolemia in WKY and SHR. *Am. J. Physiol.* 272:H2282-H2288, 1997
86. Pratt P.F., Li P., Hillard C.J. Kurian J., Campbell W.B. Endothelium independent, ouabain-sensitive relaxation of bovine coronary arteries by EETs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; 280: H1113-H1121, 2001
87. Raij L. Nitric oxide in the kidney. *Circulation*; 87: 26-29, 1993
88. Ribeiro M.O., Antunes E. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis a new model of arterial hypertension. *Hypertension*; 20:298-303, 1992
89. Rizzoni D., Porteri E., Castellano M. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*; 28:785-790, 1996
90. Rocznik A.I., Burns K.D. Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol.*; 270: F106-F115, 1996
91. Rodriguez J., Maloney R.E., Rassaf T., Bryan N.S., Feelisch M. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 100: 336-341; 2003
92. Roman R.J. P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the control of Cardiovascular Function. *Physiol. Rev.*, 82:131-185, 2002
93. Sacks F.M., Svetney L.P., Vollmer M.W. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH – Sodium Collaborative Research Group. *N. England. J. Med.*; 344-310, 2001



94. Salom M.G., Arregui B., Carbarell L., Ruiz F., Gonzales-Mora J.R., Fenoy F. Renal ischemia induces an increase in nitric oxide levels from tissular stores. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*; 289: R1459-R1466, 2005
95. Sarkis A., Roman R.J. Role of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid in hypertension. *Curr. Drug Metab.*; 5 (3): 245-56, 2004
96. Schiffrin E.L. Reactivity of small blood vessel in hypertension: relation with structural changes. *Hypertension*; 19 (suppl II): 9, 1992
97. Schmieder R.E., Langfeld M.R.W., Friedrich A. Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation*; 89: 1304-1309, 1994
98. Schricker K., Kurtz A. Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflugers. Arch.*; 432(2): 187-191, 1996
99. Sessa W.C., Pritchard K., Seyedi N., Wang J., Hintze T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circulation Research*; 74 (2): 349-353, 1994
100. Siragy H.M., Inagami T., Carey R.M. NO and cGMP mediate angiotensin AT2 receptor-induced renal renin inhibition in young rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*; 293: R1461-R1467, 2007
101. Spector A. A., Norris A.W., Action of epoxyeicatrieonic acids on cellular function. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*; 292: 996-1012; 2007
102. Stamler J. Setting the TONE for ending the hypertension epidemic. *JAMA*; 279: 878-879, 1998
103. Stec D.E., Trollet M.R., Krieger J.E., Jacob H.J., Roman R.J. Renal cytochrome P-450A activity and salt-sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*; 27: 1329-1336, 1996
104. Stoos B.A., Garcia N.H., Garvin J.L. Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in isolated perfused cortical collecting duct. *J. Am. Soc. Nephrol.*; 6: 89-94, 1995
105. Szczepańska-Sadowska E., Trzebski A., Januszewicz W., Januszewicz A. Nadciśnienie neurogenne. PWN, Warszawa, 1998
106. Takahashi K., Capdevila J., Karara A., Falck J.R., Jacobson H.R., Badr K.F. Cytochrome P-450 arachidonate metabolites in rat kidney: characterization and hemodynamic responses. *Am. J. Physiol. Renal. Fluid. Electrolyte Physiol.*; 258: F781-F789, 1990
107. Terada Y., Tomita, K., Nonoguchi H., Marumo, F. Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. *J. Clin. Invest.*; 90, 659-665, 1992
108. Uematsu M., Ohara Y., Navas J.P., Nishida K., Murphy T.J., Alexander R.W., Nerem R.M., Harrison D.G. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol.*; 269: C1371-C1378, 1995
109. van Rodijnen W., Korstejns I. J., Legestree N., ter Wee P., Tangelder G. Direct vasoconstrictor effect of prostaglandin E2 on renal interlobular arteries: role of the EP3 receptor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; 292: F1094-F1101, 2007
110. Wang H., Carretero, O.A. Garvin, J.L. Nitric oxide produced by THAL nitric oxide synthase inhibits TGF. *Hypertension*; 39; 662-666, 2002
111. Wang J., Roman R.J., Falck J.R. Effects of high-salt on CYP450-4A  $\omega$ -hydroxylase expression and active tone in mesenteric resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*; 288: H1557-H1565, 2005



112. Wang J., Roman R.J., Falck R., de la Cruz L., Lombard J.H. Effects of high-salt diet on CYP450-4A  $\omega$ -hydroxylase expression and active tone in mesenteric resistance arteries. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*; 288: H1557-H1565, 2005
113. Wang, X., Lu, M., Gao, Y., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. Wang, W. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in principal cell of collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*; 275: F395-F399, 1998
114. Weinberg M.H. Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension*; 27: 481-490, 1996
115. Wilcox C.S. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*; 7: 443-449, 1998
116. Wilcox C.S., Welch W.J., Murad F.D., Gross S.S., Tylor G., Levi R., Schmidt H.H. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:11993-11997, 1992
117. Wolf C.R. Oxidation of Foregin Compounds at Carbon Atoms. W: Metabolic Basis of Detoxication (red. W.B. Jacoby, J.R. Bend, J. Caldwell). New York 1982
118. Wu S., Moomaw C.R., Tomer K.B., Falck J.R., Zeldin D.C. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J. Biol. Chem.*; 271: 3460-3468, 1996
119. Yasuhiro Nishida, Qing-hui Chen, Megumi Tandai-Hiruma, Shin-ichi Terada, Jouji Horiuchi. Neuronal nitric oxide strongly suppresses sympathetic outflow n high-salt Dahl rats. *Journal of Hypertension*; 19: 627-634, 2001
120. Zhao X., Pollock D.M., Inscho E.W., Zeldin D.C., Imig J.D. Decreased renal CYP2C enzymes and impaired vasodilation are associated with salt-sensitive hypertension. *Hypertension*; 41: 709-714, 2003
121. Zhu D., Bousamra M. II, Zeldin D.C., Falck J.R., Townsley M., Harder D.R., Roman R.J., Jacobs E.R. Epoxyeicosatrienoic acids constrict isolated pressurized rabbit pulmonary arteries. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*; 278: L335-L343, 2000
122. Zou A.P., Ma Y.H., Sui Z.H., Ortiz de Montellano P.R., Clark J.E. Masters B.S., and Roman R.J. Effects of 17-octadecynoic acid, a suicide-substrate inhibitor of P-450 fatty acid  $\omega$ -hydroxylase, on renal function of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 268: 474-481, 1994





## Tlenek azotu a pochodne kwasu arachidonowego w metabolizmie zależnym od CYT P-450 w nerce szczura – korelacja z ukrwieniem i czynnością wydalniczą nerki w zależności od podaży sodu w diecie

### STRESZCZENIE

Tlenek azotu (*NO*) oraz metabolity kwasu arachidonowego (*AA*) powstające z jego przekształcenia przez monooksygenazy zależne od cytochromu P-450 (*CYP-450*), takie jak kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy (20-HETE) czy kwasy epoksyekozatrienowe (*EETs*), są istotnymi czynnikami parakrynnymi uczestniczącymi w wielu procesach fizjologicznych. Najnowsze badania wskazują na ich kluczowe znaczenie dla autoregulacji przepływu krwi oraz wydalania nerkowego, szczególnie w stanach zaburzenia objętości płynów ustrojowych. Uważa się, że zaburzenia ich syntezy mogą prowadzić do rozwoju choroby nadciśnieniowej, co potwierdzają liczne dane uzyskane w badaniach na genetycznych i farmakologicznych zwierzęcych modelach tej choroby.

Z drugiej strony wiadomo, że homeostaza płynów ustrojowych i utrzymanie prawidłowego ciśnienia tętniczego pozostaje w ścisłej zależności od stanu krążenia nerkowego a szczególnie krążenia w rdzeniu nerki; mechanizmy regulacji tego krążenia wciąż nie są jasne. Wielkość ukrwienia jest wypadkową wpływów wielu wazoaktywnych hormonów i substancji parakrynnych, naczyniokurczących, do których m.in. należy 20-HETE oraz naczyniorozszerzających, takich jak *NO* i szereg *EET*.

Związek metabolitów *AA*, powstających w przekształceniach zależnych od *CYP-450* z genezą nadciśnienia jest szczególnie interesujący, gdyż wykazują one działanie pro- jak i antyhipertensyjne. 20 HETE jako czynnik silnie naczyniokurczący sprzyja rozwojowi nadciśnienia, podczas gdy *EET* poprzez swoje działanie naczyniorozkurczające działa przeciwnie. W obrębie kanalik nerkowego omawiane metabolity hamują transport i zwiększają wydalanie sodu, przez co przeciwstawiają się rozwojowi nadciśnienia. Ponadto 20-HETE jest w dużej mierze odpowiedzialny za aktywność kanalikowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego (*TGF*); wzrost jego aktywności prowadzi do obniżenia filtracji kłębuszkowej, nerkowej retencji płynów i do podwyższenia ciśnienia krwi. Wobec tych współobecnych antagonistycznych i synergistycznych działań, trudno ustalić, dysregulacja którego ze szlaków metabolicznych zależnych od *CYP-450* ma decydujący wpływ na rozwój choroby nadciśnieniowej.

Czynnikiem dodatkowo komplikującym opisywane zależności jest stan bilansu ustrojowego sodu. Zwiększona podaż  $\text{Na}^+$  jest znanym czynnikiem ryzyka w rozwoju choroby nadciśnieniowej. Z wielu badań wiadomo, że zwiększona podaż sodu prowadzi do



podwyższenia ekspresji wszystkich trzech izoform NOS w rdzeniu nerki. Natomiast w położonej w korze płamce gęstej zarówno zwiększone jak i zmniejszone spożycie sodu podwyższa aktywność nNOS. W świetle przedstawionych danych wciąż pozostaje niejasne, jaki może być ostateczny efekt upośledzenia czy nadmiernej aktywności syntaz *NO*, a także, która z izoform ma w tym procesie znaczenie dominujące. Podobne wątpliwości dotyczą roli metabolitów kwasu arachidonowego. Wiadomo, że dieta niskosodowa zwiększa ekspresję mRNA i białka CYP-450 4A, a więc powstawanie 20-HETE, natomiast dieta wysokosodowa powoduje obniżenie jego powstawania w nerce natomiast wzrost w innych naczyniach obwodowych. Jednocześnie zwiększona podaż sodu wywołuje wzrost ekspresji CYP-450 2C a więc zwiększone powstawanie EETs, zarówno w korze jak i w rdzeniu nerki. Wiedząc, że obniżona lub podwyższona podaż sodu w diecie nie tylko w sposób odmienny wpływa na aktywność badanych enzymów oraz, że wpływ ten jest także zróżnicowany w zależności od rozważanego obszaru nerki, można się spodziewać, że ilość spożywanego sodu może być w pewnych warunkach elementem rozstrzygającym o zachwianiu równowagi w kontrolowaniu objętości płynów ustrojowych i powstawaniu warunków do rozwoju nadciśnienia.

Interakcja NOS jak i CYP-450 może odbywać się na kilku poziomach; poza wspomnianą rolą sodu istnieje bezpośrednia biochemiczna zależność obydwu enzymów. Tlenek azotu w formie wolnego rodnika tworzy trwałe kompleksy ze zredukowanym jodem żelazawym w cząsteczce hemu hamując w ten sposób NOS oraz inne enzymy, także CYP-450, posiadające tę formę hemu w swojej cząsteczce. Wzajemna konkurencja szlaków enzymatycznych wchodzących w skład kaskady *NOS* oraz CYP-450 oraz zróżnicowana podaż sodu w diecie mogą mieć kluczowe znaczenie dla precyzyjnej współpracy badanych przez nas czynników zaangażowanych w kontrolę ukrwienia i czynności wydalniczej nerki a pośrednio długoterminowej kontroli ciśnienia.

**Celem** podjętych przeze mnie badań była ocena wpływu różnej podaży sodu w diecie na ciśnienie krwi oraz parametry hemodynamiczne i wydalnicze nerek u zdrowych szczurów nie posiadających żadnych predyspozycji genetycznych w kierunku nadciśnienia. Bliżej precyzując, głównym zadaniem podjętym w prezentowanych badaniach było ustalenie roli *NO* i zależnych od cytochromu P-450 metabolitów kwasu arachidonowego w kontroli ciśnienia krwi i czynności nerek, w aspekcie ich wzajemnych relacji a także znaczenia w modyfikacji ich działania przez różną podaż sodu w diecie.

Badania przeprowadzono na szczurach ze stada Wistar usypianych za pomocą preparatu Thiopental i odpowiednio przygotowanych chirurgicznie. Przed doświadczeniem właściwym/ostrym zwierzęta były utrzymywane na dietach o różnej zawartości sodu; standardowej STD (0,25%), niskosodowej LS (0,15%), wysokosodowej HS (4%) oraz były



poddawane chronicznemu zablokowaniu aktywności odpowiednich szlaków metabolicznych (NOS lub CYP-450) za pomocą niespecyficznych inhibitorów: estru metylowego-Nitro-L-argininy (L-NAME) i 1-aminobenzotriazole (ABT). Lewą nerkę eksponowano tak aby możliwe było umieszczenie sond do pomiaru ukrwienia różnych jej obszarów. Za pomocą przepływomierza typu laser-Doppler w sposób ciągły mierzono przepływ krwi przez korę (CBF) i rdzeń (MBF) nerki, dokonywano również pomiaru całkowitego przepływu krwi przez tętnicę nerkową przy pomocy sondy typu Transonic. Mierzono też siłę sygnału *NO* w rdzeniu nerki za pomocą sondy elektrochemicznej (ISO-NOP 200), średnie ciśnienie tętnicze krwi, diurezę minutową ( $V$ ) oraz wydalanie substancji osmotycznie czynnych ( $U_{osm}V$ ) i sodu w moczu ( $U_{Na}V$ ). W czasie doświadczenia właściwego zwierzęta otrzymywały infuzję inhibitorów badanych szlaków i/lub roztworu soli fizjologicznej. W doświadczeniach ostrych te same inhibitory były podawane dożylnie zwierzętom nietkniętym lub w tzw. układzie krzyżowym; przykładowo zwierzęta, którym wstępnie (w sposób chroniczny) zablokowano NOS w czasie doświadczenia ostrego otrzymywały inhibitor CYP-450 bądź tylko jego rozpuszczalnik (sól fizjologiczną). Taki sam schemat doświadczeń obowiązywał na każdej z diet.

## WYNIKI

### *Wpływ diety na wyjściowe parametry hemodynamiczne i wydalnicze*

Dane przedstawione w tej części wyników zebrano z okresów kontrolnych doświadczeń ostrych (różne serie eksperymentalne).

Dane czynnościowe u szczurów utrzymywanych na diecie niskosodowej były w większości zbliżone do rejestrowanych w tzw. grupie odniesienia (STD). U LS stwierdzono jedynie istotnie wyższy przepływ krwi przez korę nerki ( $531 \pm 17$  vs.  $455 \pm 4$  PU;  $p < 0,05$ ) oraz istotnie niższą diurezę ( $2,5 \pm 0,2$  vs.  $3,8 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $p < 0,05$ ) niż u zwierząt otrzymujących dietę standardową.

Zwierzęta otrzymujące paszę o zwiększonej zawartości sodu miały istotnie wyższe ciśnienie krwi (wzrost o 17 mmHg w stosunku do grupy STD;  $p < 0,001$ ), całkowity oraz korowy przepływ krwi przez nerkę niż zwierzęta utrzymywane na diecie standardowej. Wobec zbliżonej ilościowo zmiany RBF i ukrwienia korowego (dla RBF i CBF wzrost rzędu 40%), bardzo interesującym znaleziskiem był brak podobnych zmian w obrębie rdzenia nerki. Jeszcze wyraźniejszy wzrost dotyczył wydalania sodu i wody. Szczury utrzymywane na diecie wysokosodowej miały ponad dwukrotnie wyższą diurezę ( $8,5 \pm 0,9$  vs.  $3,7 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $p < 0,001$ ) i aż dwudziestokrotnie wyższe wydalanie sodu ( $2,16 \pm 0,30$  vs.  $0,12 \pm 0,02$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;  $p < 0,001$ ) niż szczury otrzymujące paszę standardową.



Wydaje się, że u zdrowych szczurów nerkowy przepływ rdzeniowy, uznawany coraz częściej za istotny element kontrolujący ciśnienie krwi, jest niewrażliwy na zróżnicowaną podaż sodu, przynajmniej w badanym zakresie podaży sodu (0,15 – 4% Na).

Ogromna dysproporcja pomiędzy wzrostem  $V$  i  $U_{Na}V$  wskazuje, że zwiększone usuwanie sodu u HS odbywało się poprzez wybiórcze hamowanie jego reabsorpcji.

### ***Wpływ chronicznego zablokowania NOS***

Zgodnie z przewidywaniem zwierzęta otrzymujące roztwór L-NAME miały podwyższone ciśnienie krwi niezależnie od rodzaju zastosowanej diety.

Mimo podobnej odpowiedzi ze strony krążenia ogólnego, hemodynamiczna odpowiedź nerki była odmienna w zależności od podaży sodu. RBF i MBF był istotnie obniżony u wszystkich szczurów otrzymujących L-NAME, przy czym zmiany te, szczególnie dla RBF, były najgłębsze u szczurów spożywających dietę wysokosodową ( $\Delta RBF$  odpowiednio dla STD=2,2, dla LS=3,5 oraz dla HS=6,5 ml/min;  $p < 0,05$ ). Odmiennie zachował się przepływ krwi przez korę, który był istotnie niższy po L-NAME u HS ( $330 \pm 25$  vs.  $636 \pm 23$  PU), natomiast nie zmienił się u LS.

Mniejsze obniżenie wartości RBF i MBF, obserwowane na diecie niskosodowej po chronicznym zablokowaniu NOS, pozwala przypuszczać, że NO w warunkach obniżonej podaży sodu pełni marginalną rolę w utrzymywaniu hemodynamiki nerek, przynajmniej w obrębie rdzenia. Ponadto wydaje się, że obserwowany wzrost CBF u LS, nie zależał od zwiększonej aktywności NOS, skoro ich zablokowanie nie wpłynęło na poziom ukrwienia tej strefy nerki. U szczurów LS zmiany wydalania były niewielkie i co znamienne skierowane w przeciwnym kierunku (raczej obniżenie  $U_{osm}V$  i  $U_{Na}V$ ) niż u szczurów HS czy STD. Można spekulować, że wyłączenie NOS sprzyja efektywniejszemu zatrzymywaniu  $Na^+$  u zwierząt na diecie niskosodowej.

Diureza i wydalanie substancji osmotycznie czynnych u szczurów wysokosodowych były jeszcze wyższe (podwyższone uprzednio w związku z wysokim spożyciem sodu) po zablokowaniu NOS, niż u szczurów nie poddanych chronicznej blokadzie (odpowiednio  $V$ :  $22,1 \pm 3,9$  vs.  $8,5 \pm 0,9$   $\mu$ l/min;  $U_{osm}V$ :  $12,8 \pm 1,4$  vs.  $8,2 \pm 0,8$   $\mu$ osm/min;  $p < 0,05$ ). Sygnał tlenu azotu w rdzeniu był niższy jedynie u szczurów HS otrzymujących L-NAME ( $6520$  vs.  $7915$  pA), choć obniżenie to nie osiągnęło istotności statystycznej.

### ***Wpływ chronicznego zablokowania CYP-450***

Zarówno u szczurów LS jak i HS stwierdzono niższe ciśnienie krwi po chronicznym zablokowaniu CYP-450 (odpowiednio: u LS:  $98 \pm 2$  vs.  $110 \pm 2$  mmHg a u HS:  $116 \pm 3$  vs.  $128 \pm 2$ ). Jednocześnie nie było istotnych zmian ukrwienia nerki na żadnej z zastosowanych diet. Jedynie



w obrębie rdzenia nerki odnotowano prawie identyczną ilościowo, nieznamienią tendencję do wzrostu ukrwienia u szczurów otrzymujących ABT (STD: wzrost o 29% HS: o 29% i LS: o 24%).

Wyraźniejsze zmiany po zablokowaniu CYP-450 dotyczyły czynności wydalniczej nerki, choć i w tym przypadku nie wszystkie osiągnęły znamienność statystyczną. Zanotowano istotne obniżenie diurezy ( $5,6 \pm 0,9$  vs.  $8,5 \pm 1,0$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $p < 0,01$ ) i wydalania sodu ( $1,05 \pm 0,27$  vs.  $2,06 \pm 0,27$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ ;  $p < 0,01$ ) u HS oraz diurezy ( $1,6 \pm 0,2$  vs.  $3,8 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $p < 0,05$ ) w tzw. grupie odniesienia (STD). Podobne tendencje do obniżenia wydalania po ABT obserwowano w pozostałych grupach doświadczalnych.

Szczury utrzymywane na diecie standardowej, u których zablokowano CYP-450 miały istotnie wyższy sygnał *NO* w rdzeniu ( $9260$  vs.  $7370$  pA,  $p < 0,05$ ), podobnie jak szczury wysokosodowe ( $9070$  vs.  $7900$  pA), przy czym w tej ostatniej grupie zmiana nie osiągnęła istotności statystycznej.

### ***Wpływ ostrego zablokowania NOS***

Ostre podanie inhibitora NOS spowodowało wzrost MAP oraz obniżenie hemodynamiki nerek.

W przypadku zwierząt z grupy otrzymującej paszę STD wcześniejsze wyeliminowanie aktywności CYP-450 nie spowodowało różnic w odpowiedzi na ostre podanie L-NAME, zarówno ze strony ciśnienia jak i hemodynamiki narządu. Również zmiany w funkcji wydalniczej nerek po ostrym podaniu L-NAME nie były w sposób istotny modyfikowane przez uprzednie wyłączenie enzymów CYP-450; ostre podanie L-NAME podwyższyło diurezę i wydalanie substancji osmotycznie czynnych. Co godne odnotowania ostre zablokowanie NOS wywołało obniżenie rdzeniowego sygnału *NO* jedynie u zwierząt u których chronicznie wyłączono enzymy CYP-450 (STD+ABT i.p.); zmiana wynosiła  $1300$  pA ( $p < 0,05$ ).

Warty odnotowania jest fakt, że u zwierząt utrzymywanych na diecie niskosodowej wzrost MAP na ostre podanie L-NAME był mniej wyraźny i przejściowy. Ostre podanie L-NAME spowodowało porównywalny spadek RBF, niezależnie czy enzymy CYP-450 były aktywne czy nie. Podobnie zachowało się krążenie rdzeniowe; zmiany MBF wynosiły odpowiednio dla LS (L-NAME) = 42%, dla LS+ABT(L-NAME) = 37%. Ostre podanie L-NAME istotnie (4 krotnie) zwiększyło wydalanie sodu jedynie w grupie szczurów LS+ABT(L-NAME).

W przypadku ostrego zablokowania aktywności NOS u zwierząt HS obserwowano zbliżoną wzrostową odpowiedź ze strony MAP (31-33%). Ostre zablokowanie NOS spowodowało wyraźniejsze obniżenie RBF i MBF u zwierząt HS z zablokowanym chronicznie



szlakiem CYP-450. Największe obniżenie MBF obserwowano po 60 min od podania inhibitora i wynosiło ono 37% ( $p < 0,01$ ) dla grupy z aktywnym CYP-450 i 45% ( $p < 0,02$ ) dla grupy z wyłączonymi enzymami CYP-450. Wzrost wydalania wody, sodu i substancji osmotycznie czynnych był znacznie silniejszy po ostrym zablokowaniu NOS u zwierząt z zablokowanym uprzednio szlakiem CYP-450.

### ***Wpływ ostrego zablokowania CYP-450***

Na diecie standardowej ostre podanie inhibitora szlaku monoooksygenacji powodowało istotne obniżenie MAP jedynie u zwierząt STD z zahamowanymi uprzednio syntazami NOS. RBF i MBF po podaniu inhibitora obniżały się podobnie niezależnie czy enzymy NOS były aktywne czy nie. Ostre zablokowanie CYP-450 nie spowodowało istotnych zmian w wydalaniu wody, jedynie u zwierząt z zablokowanymi syntazami NOS obserwowano nieznaczny wzrost wydalania wody.

Ostre podanie ABT zwierzętom utrzymywanym na diecie niskosodowej (LS) spowodowało istotne obniżenie (10%;  $p < 0,01$ ) ciśnienia krwi jedynie u zwierząt pozbawionych w sposób chroniczny syntaz *NO*, nie spowodowało natomiast istotnych zmian w hemodynamice nerek. Dożylne podanie ABT istotnie zwiększyło (o 80%;  $p < 0,05$ ) wydalanie substancji osmotycznie czynnych u zwierząt z aktywnym szlakiem *NO*.

Ostre podanie ABT zwierzętom utrzymywanym na diecie HS spowodowało istotne obniżenie MAP zarówno u zwierząt z aktywnymi (o 8%) jak i wyłączonymi (o 22%) syntazami *NO*. Obserwowano także obniżenie wydalania wody, sodu i substancji osmotycznie czynnych w obu grupach eksperymentalnych.

## **WNIOSKI**

Podsumowując, zastosowanie u szczurów wyprzedzającej, chronicznej blokady aktywności syntaz tlenu azotu (NOS) lub enzymów szlaku monoooksygenacji kwasu arachidonowego zależnej od cytochromu P-450 (CYP-450) z następczym blokowaniem aktywności „nietkniętego” szlaku w doświadczeniach ostrych, umożliwiło porównawczą ocenę udziału produktów badanych szlaków w regulacji ukrwienia i czynności wydalniczej nerki oraz krótko- i długoterminowej kontroli ciśnienia krwi w warunkach różnej podaży sodu.



1. Potwierdzono znaczenie zwiększonego spożycia sodu jako istotnego czynnika sprzyjającego rozwojowi nadciśnienia oraz udział obu badanych szlaków metabolicznych (NOS i CYP-450) w kształtowaniu ciśnienia tętniczego krwi. Potwierdzono również, że różna podaż sodu modyfikuje wzajemne relacje pomiędzy NOS i CYP-450 i ponadto zmienia ich udział w regulacji czynności nerki.
2. Ukrwienie rdzenia nerki, obszaru coraz częściej uznawanego za istotny w kontroli ciśnienia krwi, pozostaje niewrażliwe na różną podaż sodu w diecie, przynajmniej w ciągu 2-3 tygodniowej obserwacji i w badanym zakresie zawartości tego jonu w pokarmie (0,15-4% Na w/w).
3. Potwierdzono natriuretyczne i diuretyczne działanie pochodnych kwasu arachidonowego powstających w szlaku monoooksygenacji zależnej od CYP-450, oraz przedstawiono dane zgodne z koncepcją kompetycji o biodostępność hemu pomiędzy *NO* (produkt NOS) a CYP-450.
4. Najważniejszą substancją wykazującą działanie hipotensyjne, szczególnie w warunkach wysokiego spożycia sodu, jest tlenek azotu; 20-HETE w sposób istotny przyczynia się do wzrostu ciśnienia krwi pod nieobecność *NO*.
5. Można podejrzewać, że zarówno tlenek azotu jak i badane pochodne AA nie odgrywają kluczowej roli w krótkoterminowej (szybkiej) kontroli ciśnienia w warunkach niskiej podaży sodu. Naczyniokurczące pochodne AA zaangażowane są prawdopodobnie w długoterminową kontrolę ciśnienia krwi zarówno przy niskiej jak i wysokiej podaży sodu w diecie, pozostając bez wpływu na ciśnienie u szczurów pozostających na diecie standardowej.
6. W warunkach niskiej podaży sodu pochodne AA zależne od CYP-450, prawdopodobnie 20-HETE, wydają się odgrywać istotną rolę w krótkoterminowej regulacji objętości i składu płynów ustrojowych

