

mgr farm. Aneta Marta Sawicka

**Udział zmian naczyniowych w rozwoju  
sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego.  
Porównanie skuteczności inhibitorów lokalnego i osoczowego  
układu renina-angiotensyna w leczeniu tego typu nadciśnienia**

Rozprawa na stopień naukowy doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Ewa Koźniewska-Kołodziejska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Krzysztof H. Olszyński



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora  
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, rok 2023

**Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie zostały przedstawione na następujących konferencjach naukowych i częściowo wydrukowane w suplementach do indeksowanych czasopism naukowych:**

1. Uszyńska A, Olszyński KH, Koźniewska E. Zmiany regulacji napięcia środkowej tętnicy mózgu i tętnicy zaopatrującej mięsień szkieletowy szczura w warunkach zwiększonej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. XXI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK, Rynia, 13-15.10.2016. Abstrakt opublikowany w: *Kardiologia Polska*; 74 (supl. VI), 2016, s.92, wystąpienie ustne.

2. Uszyńska A, Olszyński KH, Koźniewska E. Does long-lasting high sodium intake predispose cerebral blood vessels to stroke? Comparison with sodium-dependent hypertension; 28th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function and the 13th International Conference on Quantification of Brain Function with PET, Berlin, Niemcy, 1-4.04.2017. Abstrakt opublikowany w: *J Cereb Blood Flow Metab*; 37 (supl. 1), 2017, s. 448-449, sesja plakatowa.

3. Uszyńska A, Olszyński KH, Koźniewska E. Participation of local and systemic renin-angiotensin system in blood pressure increase and in vascular changes in sodium-dependent hypertension in rats. Kongres Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, Białystok, 21-23.09.2017; wystąpienie ustne.

4. Sawicka A, Olszyński KH, Koźniewska E. Wpływ chymostatyny – inhibitora tkankowego układu renina-angiotensyna na ciśnienie tętnicze i odpowiedzi naczyniowe w szczurzym modelu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. XXIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK, Łódź, 13-15.10.2018; wystąpienie ustne.

5. Sawicka A, Aleksandrowicz M, Koźniewska E. High salt intake promotes endothelial dysfunction and impairs brain function. Role of immune system. XXVIII Kongres PTF, Gdańsk, 15-17.09.2021, Abstrakt opublikowany w: *Journal of Physiology and Pharmacology*; vol. 72, (Suppl. 1): s. 74; wystąpienie ustne.

**Badania przedstawione w tej rozprawie były finansowane z programu KNOW-MMRC/KNOW05 „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego” (2013-2017).**

## ***Podziękowania***

*Pragnę bardzo serdecznie podziękować mojej promotor prof. dr hab. Ewie Koźniewskiej-Kołodziejskiej za umożliwienie mi wykonania pracy doktorskiej oraz za nadzór merytoryczny, wyrozumiałość i nieocenioną pomoc.*

*Dziękuję także promotorowi pomocniczemu dr n. med. Krzysztofowi Hubertowi Olszyńskiemu za pomoc w przeprowadzeniu badań oraz za życzliwość, zaangażowanie i cierpliwość podczas pisania pracy.*

*Bardzo serdecznie dziękuję pracownikom Pracowni Neurochirurgii Doświadczalnej i Klinicznej dr n. med. Marcie Aleksandrowicz oraz dr n. med. Łukaszowi Przykaziu za życzliwość i cenne wskazówki, a szczególnie Marcie za pomoc w realizacji części badań.*

*Słowa podziękowania pragnę złożyć również moim Rodzicom i mojemu Mężowi za pomoc w opiece nad dziećmi podczas pisania pracy i wsparcie w trudnych momentach.*

## Spis treści

Streszczenie.....	7
Summary .....	13
Lista skrótów stosowanych w pracy.....	18
Innowacyjność rozprawy.....	20
<b>1. Wstęp .....</b>	<b>21</b>
1.1. Udział naczyń tętniczych w regulacji ciśnienia tętniczego krwi.....	24
1.1.1. Budowa naczyń oporowych .....	24
1.1.2. Regulacja napięcia ściany oporowych naczyń krwionośnych .....	25
1.2. Nerka jako narząd utrzymujący homeostazę sodową.....	31
1.2.1. Formowanie moczu oraz diureza i natriureza .....	31
1.2.2. Diureza i natriureza z nadciśnienia .....	32
1.2.3. Aparat przykłębuszkowy i jego znaczenie dla homeostazy sodowej .....	33
1.3. Układy renina-angiotensyna .....	34
1.3.1 Renina .....	35
1.3.2. Angiotensynogen .....	36
1.3.3. Angiotensyna II.....	36
1.3.4. Receptory dla angiotensyny II .....	36
1.3.5. Enzymy biorące udział w powstawaniu peptydów angiotensynowych.....	37
1.4. Wpływ diety wysokosodowej na układy zaangażowane w regulację ciśnienia krwi ..	41
1.4.1. Zmiany w układzie renina-angiotensyna .....	41
1.4.2. Zmiany w układzie współczulnym .....	41
1.4.3. Zmiany strukturalne i czynnościowe w naczyniach krwionośnych.....	41
<b>2. Hipotezy badawcze .....</b>	<b>44</b>
<b>3. Materiały i metody .....</b>	<b>46</b>
3.1. Zwierzęta .....	46
3.2. Przebieg doświadczenia.....	47
3.2.1. Monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi i stężenia jonów sodu w osoczu ....	47
3.2.2. Zabieg jednostronnej nefrektomii lub nefrektomii pozorowanej.....	49
3.2.3. Pomiary w klatkach metabolicznych .....	49
3.2.4. Podawanie substancji hipotensyjnych.....	49
3.2.5. Porównanie skuteczności substancji hipotensyjnych.....	50
3.3. Badania czynnościowe <i>ex vivo</i> .....	50
3.3.1. Pobranie naczyń krwionośnych i krwi do dalszych analiz .....	50
3.3.2. Przygotowanie naczyń do badań.....	51
3.3.3. Potwierdzenie żywotności wyizolowanego naczynia .....	52
3.3.4. Badanie reaktywności GMA i MCA.....	53

3.4. Analiza próbek osocza i moczu .....	54
3.4.1. Pomiar stężenia jonów sodu w osoczu i moczu, zbieranych w doświadczeniu chronicznym .....	54
3.4.2. Analiza osocza zebranego w chwili uśpienia terminalnego .....	55
3.5. Analiza statystyczna .....	56
<b>4. Wyniki .....</b>	<b>57</b>
4.1. Wpływ 28-dniowej diety wysokosodowej na wybrane parametry fizjologiczne w badanych grupach zwierząt .....	57
4.1.1. Masa ciała zwierząt .....	57
4.1.2. Zmiany ciśnienia tętniczego krwi i stężenia sodu w osoczu .....	57
4.1.3. Pomiar dobowe w klatkach metabolicznych: spożycie wody, diureza i natriureza .....	59
4.2. Wpływ wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na reaktywność izolowanych naczyń krwionośnych .....	61
4.2.1. Odpowiedź na substancje naczyniozężające .....	61
4.2.2. Odpowiedź na śródbłonkozależne substancje naczyniorozszerzające .....	65
4.2.3. Odpowiedź na zablokowanie syntazy tlenu azotu .....	67
4.3. Analiza osocza zwierząt z na diecie wysokosodowej i z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym .....	68
4.3.1. Pomiar stężenia wybranych substancji czynnych .....	68
4.3.2. Pomiar stężenia wybranych wskaźników uszkodzenia glikokaliksu i toksycznych metabolitów bakterii jelitowych .....	71
4.4. Odpowiedź zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym na przewlekłe podawanie enalaprilu lub chymostatyny .....	73
4.4.1. Zmiany masy ciała .....	73
4.4.2. Zmiany ciśnienia tętniczego i stężenia sodu w osoczu .....	73
4.4.3. Porównanie hipotensyjnej skuteczności enalaprilu i chymostatyny .....	76
4.5. Wpływ enalaprilu i chymostatyny na reaktywność izolowanych naczyń krwionośnych w sodo-zależnym nadciśnieniu tętniczym .....	77
4.5.1. Odpowiedź GMA na podanie naczyniokurczącego agonisty receptora AT1 ..	77
4.5.2. Odpowiedź MCA na podanie śródbłonkozależnego naczyniorozszerzającego ATP .....	79
4.5.3. Odpowiedź GMA i MCA na zablokowanie syntazy tlenu azotu .....	80
4.6. Analiza osocza zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym otrzymujących enalapril lub chymostatynę .....	81
4.6.1. Pomiar stężenia metabolitów NO .....	81
4.7. Suplement .....	82
<b>5. Podsumowanie wyników .....</b>	<b>84</b>
<b>6. Dyskusja .....</b>	<b>87</b>
6.1. Model badawczy .....	87

6.2. Jony sodu jako niezależny czynnik ryzyka uszkodzenia naczyń .....	88
6.2.1. Zwiększenie wrażliwości GMA na związki naczyniokurczące u zwierząt na diecie wysokosodowej .....	88
6.2.2. Diecie wysokosodowej nie towarzyszy wzrost stężenia sodu w osoczu .....	89
6.2.3. Obniżenie biodostępności NO u zwierząt na diecie wysokosodowej a odpowiedź tętnic oporowych na śródbłonkozależne substancje naczyniorozszerzające .....	90
6.3. Sodo-zależne nadciśnienie tętnicze jako czynnik zaburzający reaktywność naczyń... ..	94
6.3.1. Zastosowany model sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego okazał się skuteczny.....	94
6.3.2. Stężenie sodu w osoczu szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym pozostało prawidłowe .....	94
6.3.3. Sodo-zależne nadciśnienie a wrażliwość naczyń oporowych na substancje naczynioaktywne.....	95
6.4. Potencjalne przyczyny uszkodzenia śródbłonka naczyń.....	96
6.4.1. Wzrost stężenia TMAO w osoczu zwierząt na diecie wysokosodowej.....	96
6.4.2. Podwyższone stężenie syndekanu-1 w osoczu .....	98
6.5. Porównanie skuteczności terapii hipotensyjnej enalapilem i chymostatyną.....	99
6.5.1. Odpowiedź MCA na podanie śródbłonkozależnego naczyniorozszerzającego ATP ulega normalizacji w efekcie stosowania obu inhibitorów.....	99
6.5.2. Odpowiedź GMA na podanie agonisty receptora AT1 ulega normalizacji tylko w efekcie podawania chymostatyny .....	100
6.5.3. Terapia hipotensyjna chymostatyną jest bardziej skuteczna niż enalapilem	103
<b>7. Wnioski.....</b>	<b>106</b>
<b>8. Piśmiennictwo .....</b>	<b>107</b>

## Streszczenie

Dieta wysokosodowa jest jednym z istotnych czynników ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienia tętniczego, zaburzeń kognitywnych i udaru mózgu. Mechanizm leżący u podłoża wzrostu ciśnienia tętniczego pod wpływem wysokiego spożycia sodu nie jest do końca poznany. Wiadomo, że dieta wysokosodowa prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego w przypadku dysfunkcji nerek lub w przypadku sodo-wrażliwości, zjawiska obserwowanego u 30 % populacji na świecie. Przez długi czas uważano, że sodo-wrażliwość związana jest z zaburzeniem funkcji nerki, oraz z nadmierną aktywacją osoczonego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Kluczowym enzymem aktywującym ten układ jest renina – enzym proteolityczny wytwarzany w aparacie przykłębuszkowym nerki – katalizujący przekształcenie angiotensynogenu osoczonego w angiotensynę I, która pod wpływem enzymu konwertującego (ACE) ulega przemianie w angiotensynę II (Ang II). Angiotensyna II za pośrednictwem receptorów błonowych AT1R wywiera w organizmie wiele działań prowadzących do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi. Jednym z nich jest silne działanie kurczące mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, prowadzące do wzrostu całkowitego oporu obwodowego. Wyniki badań doświadczalnych ostatnich dziesięcioleci nad wpływem diety wysokosodowej na układ krążenia zwróciły uwagę badaczy na naczyniowy układ renina-angiotensyna (RAS). Jest to jeden z układów tkankowych, w którym Ang I jest przekształcana w Ang II lokalnie, pod wpływem proteaz serynowych takich jak chymaza i elastaza-2, blokowanych chymostatyną. Koncepcja aktywacji RAS pod wpływem diety wysokosodowej spowodowała przesunięcie punktu ciężkości badań nad przyczynami sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego w kierunku układu naczyniowego. Badanie zmian naczyniowych w kontekście przyczyn sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego stało się jeszcze bardziej zasadne, kiedy wykazano, że podwyższenie stężenia jonów sodu w środowisku zewnątrzkomórkowym powoduje zmniejszenie wrażliwości komórek śródbłonka na odkształcenie mechaniczne (sztywnienie śródbłonka) i zmniejszenie wydzielania tlenku azotu (NO) w odpowiedzi na naprężenie ścinające. Konsekwencją takich zmian w obwodowych oporowych naczyniach krwionośnych jest wzrost całkowitego oporu obwodowego (TPR) i zwiększenie ciśnienia tętniczego krwi. Natomiast, w naczyniach krążenia mózgowego, zmniejszenie wydzielania NO zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń poznawczych, powstania zatorów wewnątrznaczyniowych i może prowadzić do udaru mózgu.

Na podstawie badań *in vitro* postuluje się, że u podstaw zmian czynnościowych obserwowanych w naczyniach krwionośnych pod wpływem zwiększonego stężenia jonów sodu

leży uszkodzenie warstwy glikokaliksu, pokrywającej śródbłonek od strony wnętrza naczynia. Glikokaliks zapobiega nie tylko adhezji elementów komórkowych krwi do ściany naczyniowej, ale stanowi również bufor dla jonów sodu (może wiązać je w swojej strukturze) i jest czujnikiem napięcia ścinania, od którego zależy toniczne wydzielanie tlenu azotu ze śródbłonka naczyniowego.

Mechanizm niekorzystnego działania diety wysokosodowej na regulację napięcia ściany naczyń krwionośnych nie został w pełni poznany. Badania wpływu nadmiernej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na regulację oporu naczyń krwionośnych są fragmentaryczne, a wnioski dotyczące tego zagadnienia są często wyprowadzane na podstawie wyników uzyskanych z badań na hodowlach komórek wchodzących w skład ściany naczyń krwionośnych. Nie wiadomo, w jakim stopniu zmiany powstające w naczyniach oporowych w przebiegu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego są uwarunkowane zwiększoną podażą sodu w diecie, a w jakim samym nadciśnieniem. Nie wiadomo również czy, i w jakim stopniu, naczyniowy układ renina-angiotensyna bierze udział w powstawaniu lub utrzymaniu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. Zbadanie tego ostatniego zagadnienia wydaje się szczególnie istotne z punktu widzenia pewnych problemów związanych z leczeniem nadciśnienia tętniczego za pomocą inhibitorów ACE. Długotrwałe leczenie za pomocą leków z tej grupy traci skuteczność u około 15% pacjentów. Zjawisko to nosi nazwę „ucieczki angiotensyny” (ang. *angiotensin escape*) i charakteryzuje się postępującym zwiększaniem osoczowego stężenia Ang II mimo kontynuacji leczenia. W związku z tym, ze wszech miar zasadne wydaje się poszukiwanie leków hamujących powstawanie angiotensyny II w sposób niezależny od inhibitorów ACE.

Osobnym, także bardzo ważnym zagadnieniem, jest wpływ nadmiernego spożycia sodu – istotnego czynnika ryzyka udaru mózgu – na regulację napięcia tętnicy środkowej mózgu. Jest to naczynie krwionośne, którego niedrożność jest najczęstszą przyczyną udaru niedokrwiennego, a zaburzenia regulacji mogą prowadzić do deficytów poznawczych. Wpływ diety wysokosodowej i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na mechanizmy regulacji napięcia tej tętnicy nie był systematycznie badany.

W związku z powyższym **celem pracy było sprawdzenie następujących hipotez:**

1. Długotrwałe stosowana dieta wysokosodowa wywołuje zmiany czynnościowe:
  - i. w obwodowych naczyniach krwionośnych typu oporowego, mające istotny wpływ na rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego;
  - ii. w tętnicy środkowej mózgu, prowadząc do zaburzenia śródbłonkozależnej regulacji krążenia mózgowego;



2. Długotrwanie stosowana dieta wysokosodowa wpływa niekorzystnie na mikrobiotę jelitową, prowadząc do nadmiernej produkcji trimetyloaminy (TMA) i jej utlenowanej pochodnej TMAO;
3. Rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego jest związany zarówno z pobudzeniem osoczkowego, jak i lokalnego układu renina-angiotensyna;
4. Inhibitory chymazy są skuteczniejsze w leczeniu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego niż inhibitory osoczkowego enzymu konwertującego angiotensynę.

Badania były finansowane z programu MMRC-KNOW/KNOW 05: „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego”. Na przeprowadzenie badań otrzymano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach Doświadczalnych (zezwolenia nr: 05/2014, WAW2/076/2018, WAW2/075/2018). Przeprowadzono je na 139 tętnicach środkowych mózgu i 137 tętnicach zaopatrujących mięsień smukły, izolowanych z samców szczurów szczepu Sprague-Dawley (SD) o masie ciała około 300g. Szczury utrzymywane były przez 28 dni w otwartych klatkach z wolnym dostępem do pokarmu i wody. Pokarm stanowiła karma granulowana o standardowej (NS) lub zwiększonej (HS) zawartości sodu. Ogółem użyto 140 zwierząt.

Utworzono następujące grupy doświadczalne: 1. SD z pozorowaną nefrektomią na diecie NS (SHAM-NS) – grupa kontrolna 1; 2. SD z pozorowaną nefrektomią na diecie HS (SHAM-HS); 3. SD z jednostronną nefrektomią na diecie NS (UNX-NS) – grupa kontrolna 2; 4. SD z jednostronną nefrektomią na diecie HS (UNX-HS) – model sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego; 5. UNX-HS otrzymujące enalapril (UNX-HS+Enal), 6. UNX-HS otrzymujące chymostatynę (UNX-HS+Chym).

Jednostronną operację nefrektomii (pozorowanej nefrektomii w grupie szczurów SHAM) wykonywano w sterylnych warunkach w znieczuleniu (ketamina 50 mg/kg i ksylazyna 7,5 mg/kg, i.p.). Okolice miejsca nacięcia były golone i dezynfekowane. Otwierano jamę brzuszną przez nacięcie boczne, a otaczające tkanki oddzielano, aby odstąpić nerkę. Po oddzieleniu i podwiązaniu pęczka naczyniowego i moczowodu, nerkę usuwano. Operację pozorowanej nefrektomii przeprowadzano w ten sam sposób, ale bez podwiązania i usuwania nerki. Po zabiegu/zabiegu pozorowanym ranę zszywano. W celu złagodzenia bólu pooperacyjnego, stosowano Metacam (0,2 mg/kg, s.c.). Zwierzęta umieszczano ponownie w klatkach bytowych i obserwowano do czasu pełnego wybudzenia z narkozy.

Podczas trwania diety raz w tygodniu prowadzono pomiary ciśnienia tętniczego krwi metodą nieinwazyjną (system IITC Life Sciences Blood Pressure, Woodland Hills, CA, USA).

Oznaczano również stężenie jonów sodu w osoczu krwi pobieranej z żyły ogonowej (fotometr PFP7/C, Jenway Ltd, Stone, Wielka Brytania).

W celu pobrania krwi do oznaczeń biochemicznych oraz naczyń krwionośnych do badań *ex vivo* zwierzę znieczulano mieszaniną O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O (30%/70%) zawierającą 5% izofluranu. Po sprawdzeniu, że zwierzę nie cofa łapy w odpowiedzi na ucisk, wykonywano dekapitację za pomocą specjalnie do tego celu przeznaczonych gilotyny. Mieszana krew wypływająca z naczyń szyjnych pobierano do próbek i wirowano, zebrane osocze zamrażano w temperaturze -80 °C. Mózg wyjmowano w czasie krótszym niż 3 min od dekapitacji i umieszczano w jałowym roztworze 0,9% NaCl o temperaturze 4 °C. W tym samym czasie pobierano odpowiednie wycinki mięśnia smukłego, umieszczano je w takim samym roztworze jak mózg. Następnie izolowano po jednej tętnicy każdego rodzaju – tętnicę zaopatrującą mięsień smukły (GMA) i tętnicę środkową mózgu (MCA) – i umieszczano je w komorach arteriografu, wypełnionych roztworem soli fizjologicznej buforowanej kwasem 3-(N-morpholino)-propanesulfonowym (MOPS-PSS) z dodatkiem 1% dializowanej albuminy wołowej, w których prowadzono badania czynnościowe. Pozostałe tętnice mrożono w suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -80 °C.

Po przeniesieniu do komory arteriografu, naczynie kaniulowano za pomocą szklanej kapilary i perfundowano (MOPS-PSS). Perfuzja odbywała się pod stałym ciśnieniem hydrostatycznym, uzyskanym dzięki umieszczeniu zbiornika zawierającego bufor do perfuzji odpowiednio wyżej niż zbiornik, do którego odpływa bufor z perfundowanego naczynia. Płyn na zewnątrz naczynia (MOPS-PSS), o temperaturze 37 °C i pH 7,4 wymieniano w tempie 20 ml/min przy użyciu pompy perystaltycznej. Naczynie obserwowano przy pomocy toru wizyjnego złożonego z kamery i monitora telewizyjnego. Średnicę naczynia mierzono bezpośrednio na ekranie monitora. Podczas fazy stabilizacyjnej wynoszącej 60 minut naczynie nabierało napięcia miogenne.

Badano odpowiedzi GMA i MCA na podanie: i) substancji naczyniokurczących: agonisty receptora AT1 (AT1<sub>agon</sub>, 5 × 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 5 × 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M) i endoteliny-1 (ET-1, 10<sup>-10</sup> M, 5 × 10<sup>-10</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 5 × 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M); ii) substancji o zależnym od śródbłonna działaniu naczyniorozszerzającym: acetylocholiny (ACh, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-8</sup> M, 5 × 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 5 × 10<sup>-7</sup> M) w przypadku GMA i adenozy-5'-trifosforanu (ATP 10<sup>-8</sup> M, 5 × 10<sup>-8</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 5 × 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-6</sup> M) w przypadku MCA; iii) inhibitora syntazy tlenku azotu – ester metyloxy-nitro-L-argininy (L-NAME, 10<sup>-5</sup> M) w celu zbadania udziału NO w utrzymaniu napięcia podstawowego badanych naczyń. ATP podawano do wewnątrz naczynia, pozostałe związki

podawano zewnątrznaczyniowo. Średnica GMA i MCA była mierzona po 5 ( $AT1_{agon}$ ), 15 (ACh, ATP, ET-1) lub 30 minutach (L-NAME) po podaniu badanej substancji.

W dalszych doświadczeniach, pobierano GMA i MCA od zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem UNX-HS, którym przez 14 dni podawano substancje hipotensyjne – enalapril lub chymostatynę. Na tych naczyniach badano związki testowe, w przypadku których obserwowano nieprawidłową reakcję w grupie nieleczonych UNX-HS; tak więc powtórzono badanie dawka - odpowiedź na podanie:  $AT1_{agon}$  w przypadku GMA, ATP w przypadku MCA oraz odpowiedź na podanie L-NAME w przypadku obu naczyń.

Schemat podawania substancji hipotensyjnych wyglądał następująco – u szczurów z nefrektomią na diecie HS po 2 tygodniach diety podawano przez 2 kolejne tygodnie w wodzie do picia enalapril w dawkach 5, 10, 20, 40 mg/kg (grupy UNX-HS+Enal) lub chymostatynę w dawkach 1, 2, 4, 6 mg/kg (grupy UNX-HS+Chym).

Ponadto, raz w tygodniu przez cały czas trwania doświadczenia w klatkach metabolicznych (Tecniplast Gazzada, Buguggiate, Włochy) wykonywano pomiary natriurezy, dobowej diurezy i dobowego spożycia wody. Stężenie jonów sodu w osoczu oznaczano przy użyciu fotometru płomieniowego (PFP7/C, Jenway Ltd, Stone, Wielka Brytania).

W próbkach osocza pobranych po 28 dniach, na zakończenie doświadczenia, oznaczano poziom angiotensyny II, syndekanu-1, TMA i TMAO oraz ADMA.

Do analizy statystycznej danych stosowano test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i test wielokrotnych porównań Tukey'a (porównania międzygrupowe) lub test t-Studenta. Prawdopodobieństwo nie przekraczające wartości  $p < 0,05$  uznawano za istotne statystycznie.

#### **Uzyskano następujące wyniki:**

1. U zwierząt z wysoką podażą sodu w diecie nie obserwowano zmian stężenia jonów sodu w osoczu. Pomimo to, odpowiedź na podanie L-NAME była zmniejszona zarówno w przypadku GMA, jak i MCA, co wskazuje na dysfunkcję śródbłonna.
2. Dieta wysokosodowa prowadziła do zwiększenia odpowiedzi tętnicy zaopatrującej mięsień smukły na substancje naczyniokurczące - agonistę  $AT1R$  oraz endotelinę-1, przy czym odpowiedź GMA na podanie śródbłonkozależnej ACh nie uległa zmianie.
3. Dieta wysokosodowa nie wywołała zmian w odpowiedzi MCA ani na podanie substancji naczyniokurczących - agonisty  $AT1R$  oraz endoteliny-1 ani substancji naczyniorozszerzającej – śródbłonkozależnego ATP.

4. U zwierząt z wysoką podażą sodu w diecie w osoczu krwi obserwowano zmniejszenie stężenia azotynów i endogennego inhibitora syntaz NO – ADMA oraz zwiększenie wskaźnika uszkodzenia glikokaliksu – syndekanu-1.
5. Wysoka podaż sodu w diecie spowodowała wyraźną tendencję do zwiększenia stężenia toksycznych metabolitów bakterii jelitowych TMA i TMAO w osoczu.
6. U zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym UNX-HS zaobserwowano zwiększenie wrażliwości GMA na naczyniokurczącą endotelinę-1, w porównaniu z wrażliwością GMA w grupie SHAM-HS na diecie wysokosodowej bez nadciśnienia.
7. U zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym UNX-HS obserwowano znaczne zmniejszenie wrażliwości MCA na podanie substancji naczyniorozszerzającej i śródbłonkozależnej jaką jest ATP.
8. Chymostatyna była bardziej skuteczna w obniżaniu ciśnienia tętniczego krwi niż enalapril.
9. Chymostatyna, w przeciwieństwie do enalaprilu, normalizowała zależność dawka-odpowieź dla agonisty receptora AT1.
10. Żadna z badanych substancji o działaniu hipotensyjnym nie poprawiła odpowiedzi na podanie L-NAME.

**Podsumowując**, przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań wskazują, że podwyższona podaż sodu w diecie, nawet jeśli nie towarzyszy jej wzrost stężenia jonów sodu w osoczu i nadciśnienie, prowadzi do dysfunkcji śródbłonka. Dysfunkcja śródbłonka dotyka zarówno obwodowe, jak i mózgowie naczynia oporowe. Ponadto, dieta wysokosodowa nasila odpowiedź na substancje naczyniokurczące w obwodowych, ale nie mózgowych naczyniach oporowych. W rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego biorą udział zarówno osoczowy jak i tkankowy układ renina–angiotensyna, jednakże blokowanie układu tkankowego wydaje się być bardziej skuteczne w obniżaniu ciśnienia tętniczego niż blokowanie układu osoczowego.

## Summary

A high-sodium diet is one of the important risk factors for developing cardiovascular diseases, including high blood pressure, cognitive deficits and stroke. The mechanisms underlying the increase in blood pressure due to high sodium intake is not well understood. It is known that a high-sodium diet leads to an increase in blood pressure in the case of kidney dysfunction or sodium sensitivity, a phenomenon observed in 30% of the world's population. For a long time, it was believed that sodium sensitivity is associated with renal dysfunction and excessive activation of the plasma renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) system. The key enzyme activating this system is renin – a proteolytic enzyme produced in the renal juxtaglomerular apparatus – catalyzing the conversion of plasma angiotensinogen into angiotensin I, which is further metabolized by of the converting enzyme (ACE) to angiotensin II (Ang II). Angiotensin II, acting at the AT1R membrane receptors, exerts many actions leading to an increase in blood pressure. One of them is the strong contracting effect of vascular smooth muscles, leading to an increase in total peripheral resistance and thus promoting hypertension. The results of experimental studies of the last decades on the effect of a high-sodium diet on the circulatory system have drawn the attention of researchers to the vascular system of renin-angiotensin (RAS). This is one of the tissue systems where Ang I is converted to ANG II locally with a help of serine proteases such as chymase and elastase-2, which are blocked by chymostatin.

The concept of RAS activation in response to a high-sodium diet has shifted the focus of research on the etiology of sodium-dependent hypertension towards the vascular system. The study of vascular changes in the context of sodium-dependent hypertension became even more relevant when it was shown that an increase in the concentration of sodium ions in the extracellular environment reduces the sensitivity of endothelial cells to mechanical deformation (endothelial stiffening) and reduces the secretion of nitric oxide (NO) in response to shear stress, the disturbance known as endothelial dysfunction. The consequence of such changes in peripheral resistance vessels is an increase in vascular resistance and an increase in blood pressure. In the cerebral circulation endothelial dysfunction increases the risk of dementia and intravascular emboli, which may result in stroke.

The effect of a high-sodium diet on the regulation of vascular wall tone is not fully understood. Based on *in vitro* studies, it is postulated that the functional changes observed in blood vessels exposed to increased concentration of sodium ions are due to damage to the glycocalyx of the endothelium. Glycocalyx, lining blood vessels from the inside, prevents not

only the adhesion of blood cells to the vascular wall, but also acts as a buffer for sodium ions (it can bind them in its structure) and is a shear stress sensor, required for the flow-dependent basal production of NO.

Studies on the effect of a high-sodium diet and sodium-dependent hypertension on the regulation of resistance blood vessel are fragmentary, and conclusions are often derived from *ex vivo* studies on cell cultures of cells that are constituents of the vessel wall. It is not known to what extent the changes occurring in the resistance vessels in the course of sodium-dependent hypertension are conditioned by the increased supply of sodium in the diet, and to what extent by hypertension itself. It is also unknown whether and to what extent the renin-angiotensin vascular system is involved in the development or maintenance of sodium-dependent hypertension. Examination of the latter issue seems to be particularly important from the point of view of some problems associated with the treatment of human hypertension with ACE inhibitors. Long-term treatment with drugs from this group loses effectiveness in about 15% of patients. This phenomenon is called 'angiotensin escape' and is characterized by a progressive increase in plasma Ang II levels despite continued treatment. Therefore, it seems reasonable to search for drugs that inhibit the formation of angiotensin II independent of ACE inhibitors.

A separate and very important issue is also the effect of excessive sodium intake – an important risk factor for stroke – on the regulation of the tone of the middle cerebral artery. The occlusion of this vessel occurs in the majority of cases of ischemic stroke in humans. The influence of a high-sodium diet and sodium-dependent hypertension on the mechanisms regulating the tone of this artery has not been systematically investigated.

Thus the **aim of this project was to test the following hypotheses:**

1. A long-term high-sodium diet causes functional changes: i. in peripheral resistance blood vessels, which have a significant impact on the development of sodium-dependent arterial hypertension; ii. in the middle cerebral artery, leading to impairment of endothelium-dependent regulation of cerebral circulation;
2. Long-term high-sodium diet adversely affects the intestinal microbiota, leading to excessive production of trimethylamine (TMA) and its oxidized derivative TMAO;
3. The development of sodium-dependent hypertension is associated with the activation of both plasma and local renin-angiotensin system;
4. Chymase inhibitors are more effective than ACE inhibitors as hypotensive therapy in sodium-dependent hypertension.

The project was financed from the MMRC-KNOW/KNOW 5 program: "The participation of vascular changes in the development of sodium-dependent hypertension". The

study was approved by the IV Local Ethical Committee for Research on Experimental Animals (approvals No. 05/2014, WAW2/076/2018, WAW2/075/2018). They were carried out on 139 middle cerebral arteries and 137 gracilis muscle arteries, isolated from male Sprague-Dawley (SD) rats weighing about 300 g. The rats were kept for 28 days in open cages with free access to chow pellets and water. Chow pellets contained either a standard (NS) or increased (HS) sodium content. In total, 140 animals were used.

The following experimental groups were created: 1. SD with sham nephrectomy on NS diet (SHAM-NS) – control group 1; 2. SD with sham nephrectomy on HS diet (SHAM-HS); 3. SD with unilateral nephrectomy on NS diet (UNX-NS) – control group 2; 4. SD with unilateral nephrectomy on HS diet (UNX-HS) – sodium-dependent hypertension model; 5. UNX-HS receiving enalapril (UNX-HS+Enal); 6. UNX-HS receiving chymostatin (UNX-HS+Chym).

Unilateral nephrectomy (sham nephrectomy in a group of SHAM rats) was performed in sterile conditions under anesthesia (ketamine 50 mg/kg and xylazine 7.5 mg/kg, i.p.). The incision area was shaved and disinfected. The abdominal cavity was opened through a lateral incision and the surrounding tissues were separated to expose the kidney. After separation and ligation of the vascular bundle and ureter, the kidney was removed. Sham nephrectomy was performed in the same manner, but without ligation and removal of the kidney. After surgery/sham surgery, the wound was sutured. Metacam (0.2 mg/kg, s.c.) was used to relieve postoperative pain.

During the diet, blood pressure was measured once a week using a non-invasive method (IITC Life Sciences Blood Pressure system, Woodland Hills, CA, USA). At the same time points, concentration of plasma sodium ions was determined in the plasma of blood taken from the caudal artery (PFP7/C photometer, Jenway Ltd, Stone, UK).

In addition, in a separate group of rats, natriuresis, daily diuresis and daily water consumption were measured once a week, throughout the experiment, in metabolic cages (Tecniplast Gazzada, Buguggiate, Italy).

In order to collect blood for biochemical assays and blood vessels for *ex vivo* studies, the animal was anesthetized with an O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O mixture (30%/70%) containing 5% isoflurane. After checking that the animal did not withdraw its paw in response to pressure, decapitation was performed using a specially designed guillotine. Mixed blood from the jugular vessels was collected into test tubes and centrifuged, the collected plasma was frozen at -80 °C. The brain was removed less than 3 minutes after decapitation and placed in a sterile 0.9% NaCl solution at 4 °C. At the same time, appropriate sections of the gracilis muscle were taken and placed in

a separate petri dish filled with a sterile 0.9% NaCl. Then, one artery of each type was isolated – an artery supplying the gracilis muscle and the middle cerebral artery, and placed in arteriograph chambers filled with 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid buffered saline (MOPS-PSS) solution with the addition of 1% dialysed bovine albumin, in which functional tests were performed. The remaining arteries were frozen in dry ice and stored at -80 °C.

After transfer to the arteriograph chamber, the vessel was cannulated with a glass capillary, and perfused with MOPS-PSS. Perfusion took place under constant hydrostatic pressure, obtained by placing the reservoir containing the perfusion buffer appropriately higher than the reservoir into which the buffer from the perfused vessel drains. The fluid outside the vessel (MOPS-PSS), 37 °C, pH 7.4, was exchanged at a rate of 20 ml/min using a peristaltic pump. The vessel was observed using a video track consisting of a camera and a television monitor. The diameter of the vessel was measured directly on the monitor screen. During the stabilization phase of 60 minutes, the vessel acquired myogenic tension.

GMA and MCA responses to the administration of: i) vasoconstrictors: AT1 receptor agonist (AT1R<sub>agon</sub>,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M) and endothelin-1 (ET-1,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M); (ii) endothelium-dependent vasodilators: acetylcholine (ACh,  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M) for GMA and adenosine 5'-triphosphate (ATP,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M) for MCA; iii) nitric oxide synthase inhibitor - methyl-nitro-L-arginine ester (L-NAME,  $10^{-5}$  M) in order to test the share of NO in maintaining the basic tension of the tested vessels were studied. ATP was administered intravascularly, the remaining compounds were administered extravascularly. GMA and MCA diameters were measured 5 (AT1R<sub>agon</sub>), 15 (ACh, ATP, ET-1) or 30 minutes (L-NAME) after administration of the compound.

In the next experiments, GMA and MCA were isolated from animals with sodium-dependent hypertension UNX-HS, treated for 14 days with hypotensive substances - enalapril or chymostatin. In these series only test compounds were studied for which the impaired responses was observed in previous experiments in the UNX-HS untreated group. Thus, the following dose-response study was repeated: AT1<sub>agon</sub> for GMA, ATP for MCA, and L-NAME response for both vessels.

The schedule of hypotensive treatment was as follows - in UNX-HS rats, after 2 weeks of HS diet, enalapril ( 5, 10, 20 or 40 mg/kg, UNX-HS+Enal groups) or chymostatin (1, 2, 4 or 6 mg/kg, UNX-HS+Chym groups) were administered *per os*.

Plasma samples collected upon the completion of the experiment i.e. on the 28<sup>th</sup> day, were assayed for angiotensin II, syndecan-1, TMA and TMAO, and ADMA.



For the statistical analysis of the data, the one-way analysis of variance (ANOVA) test and Tukey's multiple comparisons test (intergroup comparisons) or Student's t-test were used. Probability not exceeding  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

**The following results were obtained:**

1. In animals fed high sodium diet, there were no changes in the concentration of sodium ions in the blood plasma. Despite this, the response to L-NAME was significantly decreased in both GMA and MCA, demonstrating dysfunctional endothelium;
2. High sodium diet led to an increased constriction of the GMA in response to AT1R agonist and endothelin-1, without affecting the vasodilatory response of this artery to the endothelium-dependent ACh;
3. High-sodium diet did not affect the MCA response to vasoconstrictors and to endothelium-dependent dilator ATP;
4. High sodium diet lead to a decrease in nitrite and ADMA, and to increase in syndecan-1 concentration in blood plasma;
5. Rats on high sodium diet demonstrated a tendency to an increased blood plasma concentration of TMA and TMAO;
6. In animals with sodium-dependent hypertension, an increased response of the GMA to vasoconstrictors was exaggerated in comparison with the response observed in rats on high sodium diet;
7. In animals with sodium-dependent hypertension, blunted MCA response to endothelium-dependent dilator ATP was observed;
8. Chymostatin was more effective in lowering blood pressure than enalapril;
9. Chymostatin, unlike enalapril, normalized the dose-response relation for the AT1 receptor agonist;
10. None of the tested antihypertensive substances improved the response to L-NAME administration.

**Concluding**, the obtained results indicate that high sodium diet, even if it is not accompanied by an increase in plasma sodium ions concentration and hypertension, leads to endothelial dysfunction demonstrated both in peripheral and cerebral resistance arteries. Moreover, a high sodium diet enhances the response to vasoconstrictors of peripheral but not cerebral resistance arteries. Both plasma and tissue renin-angiotensin systems are involved in the development of sodium-dependent hypertension, however, blocking the tissue system seems to be more effective in lowering blood pressure than blocking the blood plasma RAS.

## Lista skrótów stosowanych w pracy

- 20-HETE – kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy (ang. *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid*)
- ACE, ACE1 – enzym konwertujący angiotensynę typu 1 (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*)
- ACE2 – enzym konwertujący angiotensynę typu 2 (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*)
- ACEi – inhibitory konwertazy angiotensyny (ang. *Angiotensin-Converting-Enzyme inhibitors*)
- ACh – acetylocholina
- ADMA – asymetryczna dimetyloarginina
- AGT – angiotensynogen
- Ang I – angiotensyna I
- Ang II – angiotensyna II
- AT1, AT1R – receptory typu 1 dla angiotensyny II (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor*)
- AT1R<sub>agon</sub> – agonista receptora typu 1 dla angiotensyny II (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor Agonist*)
- AT2, AT2R – receptory typu 2 dla angiotensyny II (ang. *Angiotensin II Type 2 Receptor*)
- ATP – adenozyno-5'-trifosforan
- Chym – chymostatyna
- CO – pojemność minutowa (ang. *Cardiac Output*)
- DBP – rozkurczowe ciśnienie tętnicze krwi (ang. *Diastolic Blood Pressure*)
- EDRFs – czynniki rozkurczowe pochodzenia śródbłonkowego (ang. *Endothelium-Derived Relaxing Factors*)
- ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- Enal – enalapril
- ET-1 – endotelina typu 1
- ET<sub>A</sub> – receptor typu A dla endoteliny
- ET<sub>B</sub> – receptor typu B dla endoteliny
- GMA – tętnica zaopatrująca mięsień smukły (ang. *Gracilis Muscle Artery*)
- HR – częstość skurczów serca, tętno (ang. *Heart Rate*)
- HS – dieta wysokosodowa (ang. *High Salt diet*)
- IC50 – połowa maksymalnego stężenia hamującego (ang. *half-maximal inhibitory concentration*)
- L-NAME – ester metylowy nitro-L-argininy (ang. *Nitro-L-arginine Methyl Ester*)
- MABP – średnie ciśnienie tętnicze krwi (ang. *Mean Arterial Blood Pressure*)

MCA – tętnica środkowa mózgu (ang. *Middle Cerebral Artery*)

MOPS-PSS – roztwór soli fizjologicznej buforowanej kwasem 3-[N-morfolino]propanosulfonowym

MOPS-PSS-Alb – roztwór soli fizjologicznej buforowanej kwasem 3-[N-morfolino]propanosulfonowym z dodatkiem 1% dializowanej albuminy wołowej

NA – noradrenalina

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

NS – dieta standardowa/normosodowa (ang. *Normal Salt diet*)

P<sub>ATP</sub> – stężenie ATP w osoczu

PGE<sub>2</sub> – prostaglandyna E<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub> – prostacyklina (prostaglandyna I<sub>2</sub>)

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

RAS – układ renina-angiotensyna (ang. *renin-angiotensin system*)

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

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

SHAM-HS – szczury z nefrektomią pozorowaną (ang. *sham*) na diecie wysokosodowej (HS)

SHAM-NS – szczury z nefrektomią pozorowaną (ang. *sham*) na diecie standardowej (NS)

SHR – szczury spontanicznie nadciśnieniowe (ang. *spontaneously hypertensive rats*)

SS – napężenie ścinające (ang. *shear stress*)

SV – objętość wyrzutowa (ang. *stroke volume*)

UNX-HS – szczury z jednostronną nefrektomią (ang. *uninephrectomized*) na diecie wysokosodowej (HS)

UNX-NS – szczury z jednostronną nefrektomią (ang. *uninephrectomized*) na diecie standardowej (NS)

## Innowacyjność rozprawy

1. Temat – po raz pierwszy porównano efektywność hipotensyjnego działania inhibitorów osoczowego (enalapril) i lokalnego (chymostatyna) układu renina-angiotensyna w sodo-zależnym nadciśnieniu tętniczym.

2. Po raz pierwszy przeprowadzono porównawcze badanie i wykazano różnice we wpływie diety wysokosodowej i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na funkcję obwodowego oporowego naczynia krwionośnego, biorącego udział w regulacji całkowitego oporu obwodowego i funkcję naczynia krwionośnego mózgowego, od którego zależy odpowiednie zaopatrzenie mózgu w krew.

3. Wykazano, że dieta wysokosodowa *per se* zwiększa odpowiedź obwodowego naczynia oporowego na substancje naczyniokurczące, nie wywołując takiego wpływu na naczynie krążenia mózgowego.

4. Wykazano, że niekorzystny wpływ diety wysokosodowej i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na strukturę i funkcję naczyń krwionośnych nie jest związany bezpośrednio ze wzrostem stężenia jonów sodu w osoczu.

3. Wykazano, że chymostatyna, w przeciwieństwie do enalaprilu, normalizuje odpowiedź tętnicy obwodowej szczurów na diecie wysokosodowej i z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym na substancje naczyniokurczące, co stanowi istotną przyczyną, jej skuteczniejszego działania hipotensyjnego w szczurzym modelu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego.

## 1. Wstęp

Ciśnienie tętnicze krwi jest jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących układ krążenia wykorzystywanych w diagnostyce medycznej. Utrzymanie właściwego ciśnienia tętniczego jest konieczne do prawidłowego ukrwienia tkanek i narządów, a przez to ich optymalnego utlenowania, tempa dostarczania substratów energetycznych i budulcowych, a także tempa odbierania metabolitów.

Ciśnienie krwi w układzie naczyniowym zależne jest zarówno od pracy serca, jak i od stanu napięcia ścian naczyń krwionośnych. Im mniejsza jest średnica naczynia krwionośnego, tym większy opór stawia ono płynącej krwi. Suma oporu naczyń tętniczych nazywana jest całkowitym oporem naczyniowym (TPR – ang. *total peripheral resistance*). Szczególną rolę w kształtowaniu TPR mają arteriole – małe naczynia tętnicze o silnie rozbudowanej mięśniówce gładkiej, które dzięki niej potrafią zmieniać średnicę swojego światła w dużym zakresie.

Ciśnienie tętnicze opisuje się używając kilku wartości mierzalnych. Ciśnienie rozkurczowe (DBP, ang. *diastolic blood pressure*) to najniższe ciśnienie panujące w aorcie w chwili rozkurczu komór serca. Wartość DBP jest wprost proporcjonalna do TPR. Ciśnienie skurczowe (SBP, ang. *systolic blood pressure*) to szczytowe ciśnienie panujące w aorcie w chwili skurczu komór. Wartość SBP jest bezpośrednio powiązana z pojemnością minutową serca (CO, ang. *cardiac output*) – gdy CO rośnie, SBP także rośnie. Wartość SBP jest także zależna od podatności aorty na rozciąganie – obniżenie podatności aorty prowadzi do wzrostu SBP. Z wartości DBP i SBP wyliczane jest średnie ciśnienie tętnicze (MABP, ang. *mean arterial blood pressure*) podczas cyklu pracy serca:

$$(1) \text{MABP} = \text{DBP} + 1/3 \times (\text{SBP} - \text{DBP})$$

Wartość MABP jest więc zawsze bardziej zbliżona do DBP niż SBP. Znając zmienne kształtujące wartości DBP i SBP można stwierdzić, że średnie ciśnienie krwi tętniczej (MABP) jest pochodną pojemności minutowej (CO) i całkowitego obwodowego oporu naczyniowego (TPR):

$$(2) \text{MABP} = \text{CO} \times \text{TPR}$$

Czynnik, który zwiększa wartość CO lub TPR, zwiększa także MABP. W warunkach prawidłowych zmiana CO jest kompensowana zmianą TPR i odwrotnie, dzięki czemu wartości ciśnienia tętniczego krwi mogą być utrzymywane na względnie stałym poziomie. Wielkość CO i TPR może być regulowana niezależnie od siebie, choć wiele mechanizmów prowadzących

do utrzymania optymalnego ciśnienia tętniczego krwi reguluje równolegle obie te wielkości [Chaudhry *i wsp.*, 2023].

Utrzymanie stałych wartości ciśnienia krwi tętniczej zależy od mechanizmów odruchowych, związanych z aktywnością autonomicznego układu nerwowego, od stężenia we krwi substancji naczynioaktywnych (ogólnoustrojowych lub działających lokalnie) oraz od czynności nerek.

Wielkość TPR jest wypadkową czynników działających na mięśniówkę gładką ściany naczyniowej, wywołujących jej skurcz lub relaksację. Głównymi czynnikami utrzymującymi prawidłowy TPR są: i. pobudzenie współczulne tonicznie wywołujące obkurczenie naczyń; ii. substancje wydzielane przez śródbłonek wyściełający światło naczyń, tonicznie rozszerzające naczynia (przede wszystkim tlenek azotu, NO); iii. różnego rodzaju naczyniokurczące/naczyniorozszerzające substancje ogólnoustrojowe, które docierają do naczynia z krwią krążącą. Śródbłonek wytwarza także substancje naczyniokurczące, takie jak endotelina-1, tromboksan A2 czy jego prekursor – nadtlenek prostaglandyn PGH<sub>2</sub>, ale w warunkach fizjologicznych ich działanie nie ujawnia się.

Głównymi czynnikami utrzymującymi prawidłowy CO są: i. pobudzenie układu autonomicznego, regulujące częstość skurczów serca i kurczliwość kardiomiocytów; ii. mechanizmy nerkowe związane z utrzymaniem prawidłowego składu i objętości płynów ustrojowych (szczególnie stężenia jonów sodowych), które wpływają na objętość krwi krążącej.

Zaburzenia prowadzące do wzrostu ciśnienia tętniczego krwi, a w konsekwencji do rozwoju nadciśnienia tętniczego, mogą mieć więc pochodzenie nerwowe [Folkow *i wsp.*, 1958], śródbłonkowe [Noll *i wsp.*, 1997] i/lub nerkowo-sodowe [Guyton *i wsp.*, 1972]. Nadciśnienie tętnicze, ze względu na przyczynę, dzielone jest na dwie podstawowe kategorie: nadciśnienie pierwotne, o nieuchwytnej etiologii, stanowiące większość przypadków nadciśnienia tętniczego u człowieka oraz nadciśnienie wtórne, będące konsekwencją zdefiniowanych zaburzeń homeostazy układu sercowo-naczyniowego.

Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego, w oparciu o wytyczne European Society of Hypertension (ESH) i European Society of Cardiology (ESC), definiuje nadciśnienie tętnicze jako ciśnienie krwi tętniczej przekraczające wartości 140 mmHg dla ciśnienia skurczowego oraz 90 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego [Mancia *i wsp.*, 2013]. Nadciśnienie tętnicze jest jedną z najczęściej występujących chorób cywilizacyjnych. W 2014 roku rejestrowano je u ok. 22% dorosłych; szacuje się, że ten odsetek urośnie do ok. 29% (1,56 miliarda osób) do roku 2025 [World Health Organization, 2014]. W Stanach

Zjednoczonych Ameryki Północnej w latach 2009-2010 aż 23,1% dorosłych znajdowało się w stanie przednadciśnieniowym (SBP w przedziale 120-139 mmHg i/lub DBP w przedziale 80-90 mmHg), a 29,5% miało zdiagnozowane nadciśnienie tętnicze [Yoon *i wsp.*, 2012]. American Heart Association szacuje, że bezpośrednie i pośrednie koszty związane z występowaniem tej choroby w tak dużej populacji dorosłych przekraczają 93,5 miliarda dolarów rocznie [Heidenreich *i wsp.*, 2011]. Częstość występowania podwyższonego ciśnienia tętniczego wśród dorosłych Polaków w wieku 19-99 lat wynosiła w 2014 roku aż 42,7%. Liczba chorych na nadciśnienie tętnicze w Polsce szacowana jest obecnie na ok. 11 mln osób. Utrzymanie się tych tendencji może spowodować, że do roku 2035 liczba pacjentów z nadciśnieniem tętniczym zwiększy się o połowę [Piwońska *i wsp.*, 2018, Tykarski *i wsp.*, 2019].

Nadciśnienie tętnicze jest główną przyczyną ponad połowy przypadków chorób sercowo-naczyniowych, w tym udaru mózgu i niewydolności serca, a także jest ważnym czynnikiem ryzyka zgonu płodu lub ciężarnej w przebiegu ciąży, wystąpienia zaburzeń poznawczych i demencji oraz niewydolności nerek [Chobanian *i wsp.*, 2003].

Czynnikami ryzyka nadciśnienia tętniczego są: obciążenie genetyczne, brak aktywności fizycznej, nadmierna konsumpcja alkoholu, otyłość oraz nieprawidłowa dieta, w której najważniejszym czynnikiem jest nadmierne spożycie sodu [Mills *i wsp.*, 2020]. Mimo tego rekomendacje odnośnie poprawy jakości żywienia są w Polsce wydawane pacjentom z nadciśnieniem tętniczym zdecydowanie za rzadko [Piwońska *i wsp.*, 2018].

Wartości ciśnienia tętniczego wyraźnie korelują z ilością spożywanego sodu [Elliott *i wsp.*, 1989]. Fizjologiczne zapotrzebowanie organizmu człowieka na sód pokrywane jest przez dzienną konsumpcję tego jonu na poziomie 10-20 mmol (0,58-1,16 g soli kuchennej, NaCl). Jednak przedstawiciele społeczeństw rozwiniętych nierzadko spożywają ponad 100 mmol (5,8 g NaCl), a na Dalekim Wschodzie nawet ponad 200 mmol (11,6 g NaCl) jonów sodu na dobę, co przekracza odpowiednio dziesięć i dwadzieścia razy zapotrzebowanie fizjologiczne [Brown *i wsp.*, 2009]. Dieta wysokosodowa (ang. *High Salt Diet*, HS) przyczynia się do zwiększenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych nie tylko przez zwiększanie ciśnienia tętniczego, lecz także przez zmniejszanie elastyczności naczyń tętniczych [Mancia *i wsp.*, 2007]. Ograniczenie spożycia soli poniżej 2,3 gramów na dobę obniża śmiertelność u pacjentów z wysoką skłonnością do incydentów sercowo-naczyniowych o 49% [Merino *i wsp.*, 2015]. U wielu osób rozwój nadciśnienia tętniczego w wyniku wysokiej konsumpcji sodu jest odroczone w czasie (tzw. osoby sodooporne). Jednakże u części populacji używającej soli w nadmiarze zmiany wartości ciśnienia tętniczego postępują szybko (tzw. osoby

sodowrażliwe). Sodobrażliwość warunkowana jest przez wiele czynników, takich jak podłoże genetyczne, pochodzenie etniczne, wiek, skład ciała czy inne choroby. Obserwowana jest szczególnie u osób z chorobami nerek, otyłością czy w zaawansowanym wieku. Obserwacje te sugerują, że nadciśnienie sodo-zależne związane jest z upośledzeniem funkcji nerek, odpowiedzialnych za homeostazę sodową.

## **1.1. Udział naczyń tętniczych w regulacji ciśnienia tętniczego krwi**

### **1.1.1. Budowa naczyń oporowych**

Naczyniami oporowymi są tętnice typu mięśniowego średniego i małego kalibru oraz tętniczki (arteriole). Średnica wewnętrzna tętnic średniego kalibru wynosi mniej niż 400  $\mu\text{m}$ , małych tętnic około 100  $\mu\text{m}$ , a tętniczek poniżej 100  $\mu\text{m}$  [Hill *i wsp.*, 2001, Lee *i wsp.*, 2017].

Tętnice i tętniczki typu mięśniowego, podobnie jak inne naczynia tętnicze, zbudowane są z trzech warstw: błony wewnętrznej (łac. *tunica intima*), błony środkowej (łac. *t. media*) i zewnętrznej (przydanka, łac. *t. adventitia*).

Błona wewnętrzna naczyń składa się ze śródbłonna pokrytego warstwą glikokaliksu i z tkanki łącznej. Rolą śródbłonna jest: i. ochrona ściany naczyń przed mechanicznymi czynnikami związanymi z przepływem krwi; ii. tworzenie chemicznej bariery krew-tkanka, dzięki której przepływ substancji z krwi do ściany naczyń i odwrotnie podlega kontroli; iii. synteza i wydzielanie substancji wazoaktywnych (tj. zdolnych zmieniać stopień napięcia ściany naczyniowej). Należy podkreślić, że w warunkach fizjologicznych śródbłonek wydzielają substancje o działaniu hamującym na mięśniówkę gładką.

Błona środkowa zbudowana jest z warstw miocytów gładkich ułożonych okręźnie. Tętnice średniego kalibru zawierają około 30 warstw miocytów, tętnice małego kalibru 3-4, a w tętniczkach jest 1 lub 2 warstwy miocytów [Sawicki, 1993]. Między miocytami znajduje się tkanka łączna, głównie kolagen i elastyna. U szczurów warstwa miocytów w tętnicach oporowych mięśni szkieletowych zajmuje około 60-65% powierzchni przekroju ściany naczyń, co decyduje o dużym napięciu miogennym [Lee *i wsp.*, 1983]. Napięcie miogenne wynika z charakteru miocytów gładkich, które mają właściwości lepko-sprężyste i odpowiadają skurczem na rozciągnięcie ściany.

W mięśniówce gładkiej zewnętrznej części błony środkowej oraz w strefie przejściowej między błoną środkową i zewnętrzną znajdują się włókna zakończeń współczulnych neuronów



adrenergicznych [Cuevas *i wsp.*, 1987]. Ich toniczna aktywność pobudzająca mięśnie gładkie do skurczu jest odpowiedzialna za napięcie neurogenne ściany naczyniowej.

Błona zewnętrzna zbudowana jest głównie z włókien kolagenowych, elastyny i fibroblastów. Stanowi ona warstwę ochronną, stabilizującą strukturę naczynia w sytuacji wysokich wartości ciśnienia krwi.

Należy podkreślić, że w tętnicach i tętniczkach pomiędzy przylegającymi do siebie komórkami śródbłonna i mięśniówki gładkiej błony środkowej występują niskooprowe połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*). Takie połączenia umożliwiają szczególną dwukierunkową komunikację tych warstw ściany naczyniowej, określaną mianem mięśniowo-śródbłonkowego sprzężenia zwrotnego (MEF, ang. *myoendothelial feedback*) [Kerr *i wsp.*, 2015, Lee *i wsp.*, 2017]. Dzięki MEF możliwe jest przekazanie hiperpolaryzacji śródbłonna bezpośrednio do mięśni gładkich, co stanowi podstawę działania śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego EDHF. Natomiast kurcząca się mięśniówka gładka aktywuje komórki śródbłonna do wydzielania substancji naczyniorozszerzających, dzięki czemu występuje samoograniczenie stopnia skurczu tych mięśni. Nadmierny skurcz mógłby doprowadzić do niebezpiecznego obniżenia dopływu krwi do narządu. Mechanizm MEF opisywany jest w różnego typu naczyniach oporowych [Kerr *i wsp.*, 2015], ale nie wiadomo w których naczyniach ma on istotne znaczenie [Wei *i wsp.*, 2018]. Wydaje się jednak, że ten typ regulacji ma zasadnicze znaczenie w regulacji miejscowej w zjawisku wstępującego rozszerzenia naczyń, umożliwiającego dostosowanie przepływu krwi do zwiększonego zapotrzebowania narządu na substraty metaboliczne [Figuroa i Duling, 2009].

### **1.1.2. Regulacja napięcia ściany oporowych naczyń krwionośnych**

#### ***Rola unerwienia współczulnego***

Unerwienie współczulne posiadają mięśnie gładkie wszystkich obwodowych oporowych naczyń tętnicznych, dzięki czemu regulacja nerwowa napięcia mięśni gładkich naczyń odgrywa podstawową rolę w regulacji TPR i ciśnienia tętniczego krwi. Chociaż trzeba podkreślić, że gęstość unerwienia współczulnego jest różna w różnych obszarach krążeniowych [Aalkjaer *i wsp.*, 2021].

Napięcie współczulne generowane jest przez ośrodkowo położone neurony, tworzące w rdzeniu przedłużonym ośrodek naczynioruchowy [Guyenet, 2006]. Jego najważniejszą częścią jest dogłowy brzuszo-boczny obszar rdzenia przedłużonego (RVLM, ang. *rostral ventrolateral medulla*), generujący toniczne pobudzenie neuronów współczulnych położonych

w istocie szarej rogów bocznych rdzenia kręgowego. Wypustki tych neuronów biegną do zwojów współczulnych, a stamtąd bezpośrednio do naczyń krwionośnych i serca. Toniczna aktywność tych włókien nerwowych odpowiada za napięcie neurogenne mięśni gładkich ściany naczyń oporowych. Podstawowym neuroprzekaźnikiem w zakończeniach współczulnych jest noradrenalina (NA), która działając na receptory adrenergiczne  $\alpha_1$ , licznie obecne w mięśniówce małych tętnic i arterioli, pobudza ich skurcz [Motiejunaite *i wsp.*, 2021]. Skurcz potęgowany jest przez jednoczesne pobudzenie naczyniowego receptora  $\alpha_2$ . Jest to receptor adrenergiczny zlokalizowany w głębszych warstwach ściany naczyniowej, dostępny dla katecholamin krążących we krwi. Wykazano, że hamowanie aktywności tego receptora umożliwia zwiększenie dopływu krwi do mięśnia szkieletowego w przypadku wzrostu zapotrzebowania metabolicznego [Tateishi i Faber, 1995].

W transmisji sygnału we współczulnych zakończeniach nerwowych istotną rolę odgrywają także współprzekaźniki, takie jak adenozylo-5'-trifosforan (ATP) i neuropeptyd Y (NPY) [Morris, 1995, Grasby *i wsp.*, 1999], przy czym udział tej kotransmisji w porównaniu z udziałem NA w odpowiedzi skurczowej różni się znacznie w zależności od łoża naczyniowego [Ralevic i Burnstock, 1998].

W przeciwieństwie do serca, naczynia oporowe nie mają unerwienia przywspółczulnego, co oznacza, że ich toniczne napięcie neurogenne jest funkcją wyłącznie zmian napięcia układu współczulnego. Natomiast, naczynia te mogą posiadać unerwienie niecholinergiczne/ nieadrenergiczne i unerwienie czuciowe, które nie ma charakteru tonicznego [Hill *i wsp.*, 2001, Westcott i Segal, 2013, Lee *i wsp.*, 2017].

Wpływ układu współczulnego na naczynia potęgują substancje naczyniokurczące, wydzielane zarówno lokalnie, jak i krążące we krwi. Należą do nich przede wszystkim: noradrenalina, angiotensyna II, wazopresyna, tromboksan A2, nadtlenki prostaglandyn i endotelina-1 [Juan i Sametz, 1986, Kawano *i wsp.*, 1997, Sandoo *i wsp.*, 2010]. W warunkach fizjologicznych śródbłonek działa jako warstwa hamująca napięcie ściany naczyniowej, zarówno miogenne, jak i neurogenne. Najsilniejszym związkami naczyniorozszerzającym jest, powstający lokalnie w śródbłonce, tlenek azotu (NO). Do substancji naczyniorozszerzających należą także mediatory stanu zapalnego, takie jak histamina, bradykinina, prostaglandyna E2 czy leukotrieny [Hogan *i wsp.*, 1998, Yang i Du, 2012, Pober i Sessa, 2014].

Zachowanie prawidłowej wrażliwości naczyń na związki naczynioaktywne ma fundamentalne znaczenie dla regulacji ciśnienia tętniczego krwi.

## ***Rola komórek śródbłonna***

Śródbłonek stanowi pojedynczą warstwę komórek nabłonka płaskiego, wyściełającego naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne i jamy serca. Jako warstwa będąca w niemal bezpośrednim kontakcie ze strumieniem przepływającej krwi, podlega działaniu sił fizycznych powstających na styku krew-ściana naczynia. Na ścianę naczyń krwionośnych oddziałują dwie siły – naprężenie rozciągające (TS, ang. *tensile stress*) i naprężenie ścinające (SS, ang. *shear stress*). Naprężenie rozciągające skierowane jest prostopadle do ściany naczynia i stanowi bodziec decydujący o napięciu miogennym. Naprężenie ścinające jest skierowane stycznie do śródbłonna, przez co jego oddziaływanie ogranicza się tylko do tej warstwy naczynia. Jest ono zależne od prędkości deformacji ściany i lepkości krwi. Przy stabilnym przepływie krwi SS na obwodzie naczynia utrzymuje stałą wartość [Wasilewski *i wsp.*, 2012]. Komórki śródbłonna zabezpieczone są przed nadmiernym oddziaływaniem SS przez ułożenie wzdłuż osi naczynia [Aird, 2007]. Dodatkowo pokryte są cienką warstwą (do kilkuset nm) glikokaliksu – ujemnie naładowanego porowatego żelu złożonego z proteoglikanów, glikoprotein i glikozaminoglikanów (siarczanu heparanu, kwasu hialuronowego i siarczanu chondroityny) [Reitsma *i wsp.*, 2007]. Jeden z proteoglikanów siarczanu heparanu – syndekan-1 – jest swoistym markerem stanu śródbłonna naczyń [Johansson *i wsp.*, 2011]. Wzrost stężenia syndekanu-1 w osoczu koreluje dodatnio z dysfunkcją komórek śródbłonna.

Toniczne oddziaływanie SS na śródbłonek pobudza go do produkcji substancji naczyniorozszerzających, takich jak tlenek azotu (NO), czynniki rozkurczowe pochodzenia śródbłonkowego (EDRFs, ang. *endothelium-derived relaxing factors*) i prostacyklina (PGI<sub>2</sub>). Substancje czynne krążące z krwią mogą dodatkowo modulować (pobudzać lub hamować) wydzielanie z komórek śródbłonna. W pewnych warunkach obserwuje się także zależną od śródbłonna hiperpolaryzację mięśni gładkich ściany naczyniowej (EDH – ang. *endothelium-derived hyperpolarization*) [Félétou i Vanhoutte, 2013].

Zadaniem śródbłonna jest hamowanie napięcia ściany naczyniowej, odgrywa więc istotną rolę buforową w stosunku do pobudzającego wpływu unerwienia autonomicznego i pomaga w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi. Najważniejszą substancją zmniejszającą napięcie miogenne i neurogenne w warunkach prawidłowych jest tlenek azotu.

Komórki śródbłonna są także miejscem syntezy substancji naczyniokurczących, takich jak endotelina-1 (ET-1), tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), angiotensyna II, prostaglandyna H<sub>2</sub> i reaktywne formy tlenu (ROS) [Vanhoutte, 1989], ale ich działanie nie ujawnia się w warunkach fizjologicznych.

## ***Tlenek azotu***

Tlenek azotu (NO) jest silnie reaktywnym wysoce niestabilnym wolnym rodnikiem, posiadającym zdolność dyfuzji przez błony komórkowe. Za powstawanie NO odpowiedzialne są syntazy tlenku azotu (NOS), występujące w trzech izoformach: neuronalnej (nNOS, NOS1), śródbłonkowej (eNOS, NOS3) i indukowalnej (iNOS, NOS2) [Forstermann i Sessa, 2012]. Obie formy konstytutywne (eNOS i nNOS) są wapnio-zależne, tzn. do ich aktywacji niezbędny jest wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce. W układzie sercowo-naczyniowym dominuje izoforma eNOS [Forstermann i Li, 2011], aktywowana naprężeniem ścinającym [Shimokawa, 2014]. Cząsteczka eNOS jest dimerem, który do utrzymania swej struktury wymaga kofaktorów, m. in. tetrahydrobiopteryny (BH4). Substratem dla eNOS jest L-arginina, a endogennym inhibitorem eNOS jest asymetryczna dimetyloarginina (ADMA). W sytuacji niedoboru BH4 i/lub L-argininy lub w sytuacji wzrostu stężenia ADMA dimer eNOS ulega rozprzężeniu; monomer eNOS, zamiast NO, wytwarza ponadtlenki  $\cdot\text{O}^{2-}$  [Hebbel i Vercellotti, 2021]. Postuluje się, że istotne znaczenie w regulacji biodostępności NO ma stosunek ADMA/arginina. ADMA konkuruje z L-argininą o eNOS [Stuehr *i wsp.*, 2001] i hamuje import L-argininy z osocza [Bode-Boger *i wsp.*, 2007].

Działanie NO odbywa się nie na drodze wiązania receptorów, a przez modyfikację cząsteczek, co prowadzi do zmiany ich aktywności. Podstawowym mechanizmem działania NO jest nitrozylacja rozpuszczalnej formy cyklicznej guanylanowej, co prowadzi do zwiększenia tempa produkcji cGMP [Moncada *i wsp.*, 1991]. Efektem tego działania jest przesunięcie równowagi MLCK/MLCP w stronę większej aktywności fosfatazy miozyny i rozkurcz komórki mięśniowej. Ponadto, następuje otwarcie kanałów dla jonów potasu (odkomórkowy prąd potasowy powoduje hiperpolaryzację komórek mięśniowych), a pobudzenie transportu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do siateczki sarkoplazmatycznej obniża stężenie wolnych jonów wapnia w płynie wewnątrzkomórkowym. Ostatecznie dochodzi do obniżenia napięcia mięśnia gładkiego i rozszerzania naczynia, dzięki czemu utrzymywane jest prawidłowe napięcie spoczynkowe [Zhao *i wsp.*, 2015].

Wyrazem tonicznego działania NO na mięśnie gładkie ściany naczyniowej są: trwały wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz zmniejszenie przepływu krwi we wszystkich narządach obserwowane po zablokowaniu wytwarzania tlenku azotu [Kozniwska *i wsp.*, 1992, Takahashi *i wsp.*, 1992, Haynes *i wsp.*, 1993].

Wiele hormonów, substancji wydzielanych parakrynnie oraz, jak wspomniano wcześniej, neuroprzekazniki AUN, o działaniu pobudzającym na mięśnie gładkie, posiada

także receptory w śródbłonku i moduluje swoje bezpośrednie działanie na mięśnie gładkie za pośrednictwem NO [Hemmens i Mayer, 1998]. Należą do nich między innymi acetylocholina (receptory  $M_1$  i  $M_5$ ), noradrenalina (receptor  $\alpha_1$ ), bradykinina (receptor  $B_2$ ), ATP (receptor  $P_{2y}$ ) i endotelina-1 (receptor  $ET_B$ ). W przypadku dysfunkcji śródbłonka dochodzi do nasilenia skurczu naczyń pod wpływem tych substancji. Skurcz naczyń w przypadku dysfunkcji śródbłonka i zmniejszenia wydzielania NO może być również związany z aktywacją receptorów dla tromboksanu  $TxA_2$  oraz zwiększoną produkcją kwasu 20-hydroxyeikozatetraenowego (20-HETE). 20-HETE jest eikozanoidem, produktem omega-hydroksylacji kwasu arachidonowego [Imig, 2004]. Jest on związkiem o silnym działaniu naczyniokurczącym, którego produkcja jest hamowana tonicznie przez NO [Hoopes *i wsp.*, 2015]. Zmniejszenie biodostępności NO umożliwia ujawnienie się naczyniozwężającego działania tej cząsteczki. W przypadku tętnicy środkowej mózgu skurcz obserwowany po podaniu L-NAME jest w 60% zależny od zahamowania produkcji NO, a w 40% związany z uwalnianiem 20-HETE [Alonso-Galicia *i wsp.*, 1999].

### ***Hiperpolaryzacja pochodzenia śródbłonkowego (EDH)***

Hiperpolaryzacja mięśniówki pochodzenia śródbłonkowego (EDH, ang. *endothelium-dependent hyperpolarization*) jest ważnym mechanizmem obniżającym napięcie mięśni gładkich ściany tętnic oporowych [Garland i Dora, 2017].

W małych tętnicach krezkowych ludzi głównym czynnikiem wywołującym EDH jest  $H_2O_2$  [Matoba *i wsp.*, 2002], powstały w wyniku generowania anionów nadtlenkowych przede wszystkim przez eNOS [Stuehr *i wsp.*, 2001]. Aniony nadtlenkowe mogą jednak pochodzić od wszystkich trzech izoform NOS [Takaki *i wsp.*, 2008]. Dlatego też EDH działa jako mechanizm naczyniorozszerzający, który jest w stanie kompensować upośledzoną produkcję NO [Saito *i wsp.*, 2018, Shimokawa i Godo, 2020]. Uwolniony ze śródbłonka  $H_2O_2$  zwiększa stężenie wapnia w cytozolu komórek mięśniówki ściany naczyń, co prowadzi do aktywacji błonowych kanałów potasowych o małej ( $K_{Ca2.3}$ ) i średniej ( $K_{Ca3.1}$ ) przewodności. Dodatkowo  $H_2O_2$  bezpośrednio aktywuje kanały potasowe o dużej przewodności ( $K_{Ca1.1}$ ). Otwarte kanały potasowe powodują hiperpolaryzację, która dzięki połączeniom szczelinowym między komórkami mięśniówki rozprzestrzenia się w ścianie naczyń, powodując jego rozszerzenie [Kloza *i wsp.*, 2019].

### ***Prostacyklina i tromboksan***

Aktywacja receptorów błonowych, działających za pośrednictwem fosfolipaz, doprowadza do wycinania z błony komórkowej komórek śródbłonka kwasu arachidonowego (AA, ang. *arachidonic acid*), którego metabolizm daje szeroką gamę związków wazoaktywnych. Przekształcenie AA przez cyklooksygenazy (COX) w prostaglandynę H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) jest pierwszym krokiem w łańcuchu syntezy prostaglandyn i tromboksanów. Powstająca z PGH<sub>2</sub> prostaglandyna I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, prostacyklina) jest istotnym związkiem naczyniorozszerzającym, który jest w stanie kompensować niską biodostępność NO [Kawabe *i wsp.*, 2010]. Z kolei powstający z PGH<sub>2</sub> tromboksan (TXA<sub>2</sub>), działając na mięśniówkę naczyń, powoduje ich obkurczenie [Burdan *i wsp.*, 2006]. Przemiany AA przez COX są nasilone w procesach uszkodzenia śródbłonka, kiedy aktywacji ulega izoforma COX-2, zależna od stanu zapalnego [Félétou *i wsp.*, 2011].

### ***Endotelina***

Endotelina (ET) jest peptydem pochodzenia śródbłonkowego, który działa na mięśniówkę naczynia kurcząco. Z trzech znanych izoform endoteliny (ET-1, ET-2 i ET-3) śródbłonek produkuje prawie wyłącznie ET-1. Cząsteczka ta wycinana jest z propeptydu, tzw. dużej ET-1, przez enzym konwertujący endotelinę, lecz reakcja ta może być również przeprowadzana przez chymazę [Davenport *i wsp.*, 2016]. Do uwalniania ET-1 dochodzi w sposób ciągły, co zapewnia stałe podstawowe napięcie mięśniówki naczyń. Dodatkowe uwalnianie ET-1 może zostać wywołane przez czynniki chemiczne i fizyczne [Russell i Davenport, 1999]. Czynniki chemiczne aktywujące wydzielanie ET-1 to m. in: niedotlenienie, czynniki wzrostu, cytokiny, insulina oraz niektóre substancje wazoaktywne (angiotensyna II, bradykinina, noradrenalina, wazopresyna). Z drugiej strony hamowanie wydzielania ET-1 może być wywołane przez niektóre czynniki naczyniorozszerzające: NO, PGI, przedsionkowy peptyd natriuretyczny, czy też EDH. Wśród czynników fizycznych najważniejszym jest SS, które w warunkach fizjologicznych stymuluje ekspresję ET-1, lecz przy znacznym wzroście SS ekspresja ET-1 ulega obniżeniu [Ishibazawa *i wsp.*, 2011].

Działanie ET-1 na śródbłonek i mięśniówkę naczyń daje przeciwne efekty. W komórkach śródbłonka zlokalizowane są receptory ET<sub>B1</sub>, których pobudzenie powoduje wydzielanie przez śródbłonek NO i PGI<sub>2</sub>, co prowadzi do relaksacji mięśniówki gładkiej i rozszerzenia naczyń. Z kolei na powierzchni mięśni gładkich znajdują się receptory ET<sub>A</sub> i ET<sub>B2</sub>, których aktywacja zwiększa stężenie jonów Ca<sup>2+</sup> w cytozolu, co prowadzi do

obkurczenia mięśniówki i zwężenia naczyń. Stężenie ET-1 w osoczu osób zdrowych jest niewielkie, przez co ET-1 niesiona z osoczem nie jest w stanie wywierać działania naczyniokurczącego. Jednak stężenie ET-1 w osoczu rośnie w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych [Barton i Yanagisawa, 2019].

## **1.2. Nerka jako narząd utrzymujący homeostazę sodową**

Nerka jest parzystym narządem położonym zaotrzewnowo na tylnej ścianie jamy brzusznej. Jej czynność jest fundamentalna dla utrzymania stałego składu i objętości płynów ustrojowych. Z jednej strony formowanie moczu, które zachodzi w nerce na podstawie odfiltrowanego osocza, pozwala na usuwanie z ustroju substancji nadmiarowych z jednoczesnym oszczędzaniem tych, które występują w ustroju w wartościach optymalnych. Z drugiej strony wydzielanie przez nerkę do krwiobiegu substancji czynnych pozwala na regulację różnych aspektów gospodarki wodno-elektrolitowej. Czynność wydalnicza i wydzielnicza nerek sprawia, że narząd ten odgrywa kluczową rolę w długoterminowej regulacji ciśnienia krwi tętniczej [Guyton, 1991, Cowley, 1992].

Główną substancją utrzymującą w ustroju właściwą siłę osmotyczną płynów ustrojowych (a więc decydującą o ich objętości) są jony sodu ( $\text{Na}^+$ ). Jony te odpowiadają za 95% siły osmotycznej płynów zewnątrzkomórkowych, a więc także osocza. Jony sodu, obok wody, stanowią jeden z głównych składników moczu. Intensywność procesów wydalania wody i sodu z moczem lub ich oszczędzania (retencji) są szczególnie ważne dla gospodarki wodno-elektrolitowej, a także utrzymania właściwego ciśnienia tętniczego krwi.

### **1.2.1. Formowanie moczu oraz diureza i natriureza**

Proces formowania moczu zachodzi w jednostce funkcjonalnej nerki zwanej nefronem. Każda z nerek człowieka posiada około miliona nefronów. W pierwszej części nefronu – kłębuszku – dochodzi do filtracji krwi, w wyniku której jedna piąta wody osocza zostaje przesunięta z naczyń włosowatych do przestrzeni torebki otaczającej te naczynia. Płyn powstały w wyniku filtracji przesuwany jest do kanalika nefronu (stąd nazywany jest płynem kanalikowym), w którym zachodzą procesy formowania moczu w wyniku odbierania od płynu kanalikowego różnych substancji (reabsorpcji) i dodawania innych (sekrecji). Kanalik nefronu dzielony jest na trzy części: kanalik bliższy, pętlę nefronu i kanalik dalszy. Po opuszczeniu kanalika dalszego płyn kanalikowy, formowany przez sąsiadujące ze sobą nefrony, uchodzi do wspólnego dla nich kanalika zbiorczego, gdzie ulega ostatecznemu

zagęszczeniu. Tak ukształtowany płyn wypływa do miedniczki nerkowej, stając się moczem ostatecznym.

W całym procesie formowania moczu objętość przefiltrowanego osocza jest zredukowana w kanaliku nefronu i kanaliku zbiorczym łącznie o ok. 99,5%. Główną drogą redukcji objętości jest wchłanianie zwrotne wody, które wywoływane jest uprzednią reabsorpcją sodu. Zjawisko reabsorpcji wody i sodu jest więc ze sobą ściśle związane. Podobnie tempo wydalania wody (diureza) i tempo wydalania sodu (natriureza) ulegają zmianom w tych samych kierunkach. Blokowanie transportu sodu prowadzi więc do wzrostu diurezy i stosowane jest w leczeniu nadciśnienia celem ograniczenia objętości osocza; grupa leków o takim działaniu nazywana jest diuretykami. Z drugiej strony dobową natriureza używana jest jako złoty standard do określania ładunku sodu przyjmowanego z pokarmem [O'Donnell *i wsp.*, 2011].

### 1.2.2. Diureza i natriureza z nadciśnienia

Jednym z kluczowych mechanizmów pochodzenia nerkowego odpowiedzialnych za utrzymanie właściwego ciśnienia krwi tętniczej jest diureza i natriureza z nadciśnienia. W wyniku podwyższenia ciśnienia tętniczego krwi w nerce dochodzi do zwiększenia tempa wydalania wody i sodu z moczem. Co więcej, przyczyna wzrostu ciśnienia tętniczego nie jest istotna – nie musi wynikać ze wzrostu stężenia sodu w osoczu ( $P_{Na}$ , ang. *plasma sodium*). W efekcie takiego działania nerki objętość osocza jest zredukowana, a prawidłowe ciśnienie krwi przywracane. Prawidłowo działający mechanizm diurezy i natriurezy z nadciśnienia uruchamiany jest przez nawet niewielkie zwiększenie wartości ciśnienia tętniczego. Cechuje go także wysoka amplituda zmiany: minimalny wzrost ciśnienia tętniczego pociąga za sobą kilkunastokrotne zwiększenie diurezy i natriurezy. Podłoże tego mechanizmu nie jest w pełni poznane, jednak uznaje się go za jeden z najszybciej uruchamianych mechanizmów regulujących wartości ciśnienia krwi tętniczej [Guyton *i wsp.*, 1972]. Jedną z przyczyn sodowrażliwości może być wrodzone lub nabyte upośledzenie mechanizmu diurezy i natriurezy z nadciśnienia [Baez i Velasquez, 1995].

Upośledzenie diurezy i natriurezy z nadciśnienia może wynikać z ubytku liczby nefronów – stopniowego, w wyniku starzenia się lub nagłego, w wyniku usunięcia nerki (nefrektomia jednostronna, UNX, ang. *unilateral nephrectomy*). Ubytek nefronów prowadzi do kompensacyjnego rozrostu (hipertrofii) pozostałych nefronów, co ma działanie korzystne tylko w krótkiej perspektywie. Początkowo hipertrofia nefronów zwiększa ich średnie tempo filtracji krwi, jednak utrzymujące się podwyższone ciśnienie perfuzyjne kłębuszków prowadzi



do ich uszkodzenia, w wyniku czego tempo filtracji jest progresywnie obniżane [Bloom *i wsp.*, 1984]. W hipertrofii nefronów związanej z ubytkiem liczby nefronów mechanizm natriurezy z nadciśnienia uruchamiany jest przy osiągnięciu przez krew wyższych ciśnień niż w przypadku organizmu bez ubytku nefronów [Fong *i wsp.*, 2014]. Dochodzi więc do uszkodzenia jednego z ważnych mechanizmów regulujących ciśnienie krwi tętniczej, w efekcie czego ciśnienie to może osiągać wyższe wartości. Niektóre badania wskazują, że sama nefrektomia jednostronna nie prowadzi do zmian w ciśnieniu krwi tętniczej; dawcy nerek po pięciu latach od nefrektomii mają ciśnienie krwi tętniczej porównywalne z osobami bez nefrektomii [Price *i wsp.*, 2021]. Inne z kolei dowodzą, że osoby z usuniętą jedną nerką (z różnych przyczyn) mają większą skłonność do rozwoju nadciśnienia niż osoby z obiema nerkami [Anjum *i wsp.*, 2016], stąd też ograniczenie sodu w diecie jest jednym z pierwszych zaleceń dla pacjentów po jednostronnej nefrektomii [Tantisattamo *i wsp.*, 2019]. Dlatego też w jednym z modeli doświadczalnych nadciśnienia sodo-zależnego szczurom po nefrektomii jednostronnej podaje się dietę wysokosodową [Jung *i wsp.*, 2009, Bądryńska *i wsp.*, 2019], co skutkuje wzrostem wartości ciśnienia krwi tętniczej po dwóch tygodniach [Bądryńska i Sadowski, 2012]. U szczurów w tym modelu obserwuje się różnego rodzaju zmiany w układzie sercowo-naczyniowym, m. in. wynikające z nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu [Peleti *i wsp.*, 2017].

### **1.2.3. Aparat przykłębuszkowy i jego znaczenie dla homeostazy sodowej**

Pętla nefronu jest strukturą, w której kanalik nefronu, do tej pory w swoim przebiegu oddalający się od kłębuszka, zawraca i ponownie zbliża się do kłębuszka. W wyniku ponownego zbliżenia się przestrzennie kłębuszka i kanalika tego samego nefronu powstaje aparat przykłębuszkowy, kluczowy dla ogólnoustrojowego zarządzania gospodarką sodową.

Swoistym punktem kontroli składu formowanego moczu jest punkt graniczny między pętlą nefronu i kanalikiem dalszym, gdzie dochodzi do detekcji ilości jonów sodu i chloru w płynie kanalikowym przez komórki ściany kanalika tworzące tzw. plamkę gęstą. Plamka gęsta położona jest w bezpośrednim sąsiedztwie tętniczki doprowadzającej krew do kłębuszka, dzięki czemu detekcja poziomu wymienionych jonów szybko może być przełożona na poziom filtracji krwi w kłębuszku. Wzrost stężenia jonów sodu w płynie kanalikowym prowadzi do wydzielania z komórek plamki gęstej adenozy, która obkurczając tętniczkę doprowadzającą prowadzi do obniżenia tempa filtracji w kłębuszku, co normalizuje poziom sodu w płynie kanalikowym. Z kolei obniżenie stężenia jonów sodu w płynie kanalikowym prowadzi do wydzielania prostaglandyny E<sub>2</sub>, która rozszerzając tętniczkę doprowadzającą

prowadzi do zwiększenia tempa filtracji w kłębuszku, co normalizuje poziom sodu w płynie kanalikowym. Zjawisko to nazywane jest kanalikowo-kłębuszkowym sprzężeniem zwrotnym.

Wyżej opisany proces jest zjawiskiem lokalnym, w którym jeden kanalik nefronu wpływa na przepływ krwi w jednym kłębuszku. Jednak plamka gęsta, będąca detektorem sodu w płynie kanalikowym, wpływa na tętniczkę doprowadzającą nie tylko regulując jej światło, lecz także regulując jej procesy wewnątrzwydzielnicze. Część komórek ściany tętniczki doprowadzającej to tzw. komórki ziarniste – wyspecjalizowane komórki wydzielnicze, które w odpowiedzi na zarejestrowany przez plamkę gęstą niski poziom sodu w płynie kanalikowym zaczynają wydzielać reninę – enzym osoczowy, będący pierwszym elementem układu renina-angiotensyna (RAS, ang. *Renin-Angiotensin System*), kluczowego dla utrzymania właściwego poziomu jonów sodowych w płynach ustrojowych. Aparat przykłębuszkowy odpowiada więc za regulację poziomu filtracji nerkowej oraz aktywności RAS w zależności od ilości sodu w płynie kanalikowym.

### 1.3. Układy renina-angiotensyna

Szczególnym układem substancji czynnych odpowiedzialnych za regulację ciśnienia tętniczego krwi jest układ renina-angiotensyna (RAS, ang. *Renin-Angiotensin System*). Głównymi elementami tego układu enzymatyczno-hormonalnego jest renina i angiotensyna II (Ang II). Elementy tego układu mogą działać w osoczu lub w tkankach, stąd też wyróżnia się RAS osoczowy i RAS tkankowy (Ryc. 1).

W osoczowym RAS renina, uwolniona przez nerki do osocza, przekształca powstający w wątrobie peptyd angiotensynogen w angiotensynę I (Ang I), która następnie pod wpływem osoczowego enzymu konwertującego ACE (ang. *Angiotensin-Converting Enzyme*) przekształcana jest w angiotensynę II (Ang II) – formę angiotensyny o największej aktywności biologicznej. Ang II reguluje ciśnienie krwi wielorako: obkurcza naczynia krwionośne, zwiększa resorpcję sodu w kanalikach nerkowych, zwiększa wydzielanie aldosteronu z kory nadnerczy (który także prowadzi do zwiększenia resorpcji sodu w kanalikach nerkowych), zwiększa apetyt sodowy (chęć spożywania produktów słonych). W efekcie kumulowania sodu w organizmie dochodzi także do kumulowania wody, a przez to zwiększenia objętości krwi w układzie naczyniowym, co wraz z obkurczeniem naczyń prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi tętniczej. W tym działaniu Ang II pośredniczy receptor AT1 (ang. *Angiotensin II Type 1 Receptor*).

Wraz z postępem badań stwierdzono, że elementy układu RAS występują także lokalnie – w niektórych tkankach (ścianie naczyń krwionośnych, tkance tłuszczowej) i narządach (sercu,

nerkach, nadnerczach, mózgu, trzustce, wątrobie) [Nehme *i wsp.*, 2019]. Co więcej, Ang II może powstawać przy udziale proteaz innych niż ACE, na przykład chymazy. Tkankowy RAS może działać niezależnie od osocznego, jednak oba układy wchodzą we wzajemne interakcje, a ich efekty trudno jest od siebie odróżnić [Weinberg *i wsp.*, 2000].

Przedstawiona powyżej ścieżka przekształceń angiotensynogenu w Ang I, a następnie w Ang II i w produkty jej rozpadu, nazywana jest klasyczną ścieżką układu RAS. Obok niej występuje ścieżka alternatywna, w której dochodzi do powstawania dodatkowych peptydów angiotensynowych, przede wszystkim Ang(1-7). W tej ścieżce, przez oddziaływanie Ang II i Ang III z receptorem AT2 oraz Ang(1-7) z receptorem AT7, uzyskiwany jest efekt przeciwny do efektu oddziaływania Ang II na receptor AT1 [Chappell, 2012].

Leki blokujące komponenty układu RAS są stosowane w terapii nadciśnienia tętniczego od wielu lat. Należą do nich inhibitory ACE („-prile”, np. enalapril) i antagoniści receptorów AT1 („-sartany”, np. losartan). Jednak ze względu na możliwość przekształcania Ang I w Ang II w tkankach, niezależnie od ACE, u części chorych leczonych inhibitorami ACE obserwuje się tzw. „ucieczkę” spod stosowanego leczenia, polegającą na produkcji Ang II mimo zablokowania ACE [Athyros *i wsp.*, 2007].

### 1.3.1 Renina

Renina jest enzymem proteolitycznym produkowanym przez komórki ziarniste, obecne w aparacie przykłębuszkowym każdego kłębuszka nerkowego. Umieszczenie komórek ziarnistych między tętniczką doprowadzającą a kanalikiem dalszym pozwala na regulowanie tempa wydzielania reniny zarówno przez zmiany w układzie krążenia, jak i przez zmiany w składzie formowanego moczu. Zmiana wielkości przepływu przez tętniczkę doprowadzającą wpływa na stopień rozciągnięcia komórek ziarnistych; rosnący przepływ hamuje więc wydzielanie reniny, zaś obniżenie przepływu zwiększa jej wydzielanie. Z kolei komórki kanalika dalszego znajdujące się w sąsiedztwie komórek ziarnistych tworzą tzw. plamkę gęstą – skupisko komórek nabłonkowych działających jako detektory sodu w płynie kanalikowym. Obniżenie zawartości Na<sup>+</sup> w płynie kanalikowym jest czynnikiem aktywującym uwalnianie reniny. Dodatkowymi czynnikami modulującymi uwalnianie reniny są: pobudzenie współczulne (NA zwiększa tempo uwalniania reniny) oraz sprzężenie zwrotne ujemne z Ang II obecną w osoczu. Renina może powstawać także w tkankowym RAS – jej ekspresję wykazano w komórkach tucznych [Silver *i wsp.*, 2004]. W 2007 roku w Stanach Zjednoczonych dopuszczono do użytku pierwszy doustny inhibitor reniny, aliskiren [Wal *i wsp.*, 2011].

### 1.3.2. Angiotensynogen

Angiotensynogen (AGT) jest prekursorem wszystkich peptydów angiotensynowych. Powstaje on przede wszystkim w komórkach wątroby, ale również w adipocytach, sercu, śródbłonku naczyń krwionośnych, mózgu, nadnerczach i nerkach [Yiannikouris *i wsp.*, 2012]. Za aktywację ekspresji AGT odpowiadają hormony steroidowe: estradiol i glukokortykosteroidy [Deschepper, 1994]. W wyniku trawienia przez reninę z N-końca AGT odłączany jest decapeptyd angiotensyna I – Ang(1-10), który służy jako substrat do powstania innych aktywnych peptydów angiotensynowych [Carey i Siragy, 2003]. W wyniku nieopisanego procesu enzymatycznego z cząsteczki AGT może powstawać także Ang(1-12). Głównym pozawątrobowym źródłem AGT jest tkanka tłuszczowa [Yiannikouris *i wsp.*, 2012]. U osób otyłych z nadciśnieniem tętniczym obserwuje się podwyższoną ekspresję AGT w adipocytach [Yasue *i wsp.*, 2010], a co za tym idzie podwyższony poziom krążącego AGT [Gur *i wsp.*, 2013]. Choć wysokie spożycie soli hamuje układ RAS, ekspresja AGT w trzewnej tkance tłuszczowej u szczurów na diecie wysokosodowej paradoksalnie rośnie [Demura *i wsp.*, 2015].

### 1.3.3. Angiotensyna II

Angiotensyna I, powstała w wyniku działania reniny na angiotensynogen, nie wykazuje istotnego działania biologicznego [Ahmad *i wsp.*, 2016]. Z kolei angiotensyna II – Ang(1-8) – wykazuje najsilniejszą aktywność biologiczną wśród wszystkich peptydów angiotensynowych. Powstaje zarówno z Ang I, jak i Ang(1-12) przy udziale ACE lub innych proteaz (w tym chymazy) [Nehme *i wsp.*, 2019]. Większość znanych efektów Ang II osiągane jest przez wiązanie tej substancji z receptorem AT1, choć jej powinowactwo do receptorów AT1 i AT2 jest porównywalne [Matavelli i Siragy, 2015]. Uważa się, że receptor AT2 wywiera przeciwstawne działanie w stosunku do receptora AT1, jednak w wielu przypadkach w działaniu Ang II przez receptor AT2 zaangażowana jest także aktywacja receptora AT1 [Porrello *i wsp.*, 2011].

### 1.3.4. Receptory dla angiotensyny II

Ang II wywiera efekt biologiczny poprzez wiązanie się z receptorami sprzężonymi z białkiem G (GPCR, ang. *G Protein-Coupled Receptor*): AT1 i AT2.

**Receptor AT1.** Efekty działania Ang II na układ krążenia i pracę nerek wywierane są przede wszystkim przez działanie tej substancji na receptor AT1 [Dinh *i wsp.*, 2001]. Receptor ten jest obecny w dużych ilościach w większości naczyń krwionośnych (gdzie wywołuje ich skurcz) [Karnik *i wsp.*, 2015], a także w nerce (stymuluje retencję sodu i wody), mózgu

(stymuluje uwalnianie wazopresyny, pragnienie i apetyt sodowy, a także ogólne pobudzenie współczulne), wątrobie (aktywuje glikogenolizę) i korze nadnerczy (aktywuje wydzielanie aldosteronu) [Thomas i Mendelsohn, 2003]. Chroniczna aktywacja receptorów AT1 powoduje wiele procesów patologicznych: przerost i przebudowę układu sercowo-naczyniowego [Lips *i wsp.*, 2003], zapalenie naczyń i miażdżycę [Daugherty *i wsp.*, 2004], dysfunkcję śródbłonna poprzez upośledzenie rozszerzenia naczyń spowodowaną inaktywacją NO i wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) [Nickenig i Harrison, 2002], czy zmniejszenie wrażliwości na insulinę [Patiag *i wsp.*, 2000].

**Receptor AT2.** Ekspresja receptora AT2 jest najwyższa po urodzeniu, po czym ulega systematycznemu obniżaniu. U zdrowego dorosłego człowieka niską ekspresję receptora AT2 stwierdzono w układzie krążenia, nadnerczach, nerce, mózgu, mięśniówce macicy i skórze. Żadna reszta Ang II nie jest niezbędna dla zgodności wiązania, dzięki temu receptor ten może wiązać analogi i metabolity Ang II [Miura i Karnik, 1999]. Niski fizjologiczny poziom ekspresji receptora AT2 oraz brak specyficznych ligandów powoduje, że badanie jego roli w stanie równowagi czynnościowej jest utrudnione. Receptory AT1 i AT2 w większości tkanek współwystępują, a ich działanie jest przeciwstawne. Pobudzenie receptora AT2 prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych, hamowania wzrostu komórek i indukowania apoptozy, a także hamowania aktywacji kinaz ERK, MAPK co balansuje przeciwne efekty pobudzenia receptora AT1, wywołującego skurcz naczyń krwionośnych i pobudzenie procesów mitogennych w ich ścianie [Stoll *i wsp.*, 1995, Berk, 2003, Steckelings *i wsp.*, 2005, Miura *i wsp.*, 2010]. Wiele tkanek posiada zdolność zwiększania ekspresji AT2 podczas przebudowy, co sugeruje, że receptor ten może brać udział w procesach patologicznych toczących się w układzie sercowo-naczyniowym [Karnik *i wsp.*, 2015]. Jeżeli patologii układu krążenia towarzyszy stan zapalny i przebudowa tkanki, obserwuje się zwiększenie zagęszczenia receptora AT2. Zagęszczenie to występuje w przebiegu zawału mięśnia sercowego, miażdżycy tętnic, niedokrwieniu mózgu, nadciśnieniu, a także w układzie naczyniowym cewnikowanym balonem [Booz i Baker, 1996, Lemarie i Schiffrin, 2010]. AT2 może pełnić istotną funkcję proangiogenną w mięśniu sercowym po przebytych zawale [Wharton *i wsp.*, 1998].

### **1.3.5. Enzymy biorące udział w powstawaniu peptydów angiotensynowych**

#### ***Enzym konwertujący angiotensynę typu 1 (ACE1)***

Enzym konwertujący angiotensynę typu 1 (ACE1, konwertaza angiotensyny 1) jest dikarboksypeptydazą, odłączającą dwa aminokwasy od C-końca peptydów angiotensynowych [Corvol *i wsp.*, 1995]. Jako ektoenzym (enzym zakotwiczony na zewnętrznej powierzchni

błony komórkowej) występuje na komórkach śródbłonna w całym układzie krążenia [Ching *i wsp.*, 1983], lecz jest szczególnie liczny w kapilarach płuc [Metzger *i wsp.*, 2011]. Pewna frakcja cząsteczek ACE1 ulega odłączeniu od błony komórkowej, przez co krąży w osoczu [Beldent *i wsp.*, 1993]. ACE1 katalizuje reakcję przekształcania peptydów angiotensynowych: z Ang(1-12) powstaje Ang(1-10) (inaczej Ang II), z Ang(1-9) powstaje Ang(1-7), a z Ang(1-7) powstaje Ang(1-5) [Bekassy *i wsp.*, 2022]. Jest również elementem układu kinina-kallikreina, w którym degraduje naczyniorozszerzającą bradykininę oraz inne peptydy wazoaktywne [Imig, 2004].

**Inhibitory konwertazy angiotensyny I (ACEi, „-prile”)** to jedna z grup leków szeroko stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego. Ze względu na biologię ACE, zastosowanie ACEi ma podwójnie korzystne działanie: hamuje powstawanie naczyniokurczącej Ang II, zarazem chroniąc przed degradacją naczyniorozszerzającą bradykininę. Zwiększenie dostępności Ang I, jakie towarzyszy stosowaniu ACEi, powoduje nasilenie przekształcania jej w Ang(1-7) o działaniu przeciwnym do Ang II. Stąd też ACEi działają nie tylko hipotensyjnie, lecz także antymitotycznie. Ograniczenie degradacji bradykininy, które ma miejsce przy stosowaniu ACEi, powoduje suchy kaszel – jedno z najczęściej obserwowanych działań niepożądanych tej grupy leków. Uniemożliwia ono długotrwałe leczenie inhibitorami ACE u niektórych chorych, przede wszystkim tych po sześćdziesiątym roku życia [Iwaniak, 2011]. Dodatkowo u osób stosujących ACEi często odnotowuje się znaczną ilość Ang II dostępną w krążeniu mimo zastosowania inhibitorów [Hollenberg *i wsp.*, 1998]. Może to być częściowo tłumaczone faktem, że ACEi zostały zaprojektowane jako inhibitory enzymu osoczowego; różne rodzaje ACEi mają odmienne zdolności do blokowania lub nie enzymu ACE1 obecnego w różnych narządach [Hirsch *i wsp.*, 1992, Shah i Arora, 2005].

### ***Enzym konwertujący angiotensynę typu 2 (ACE2)***

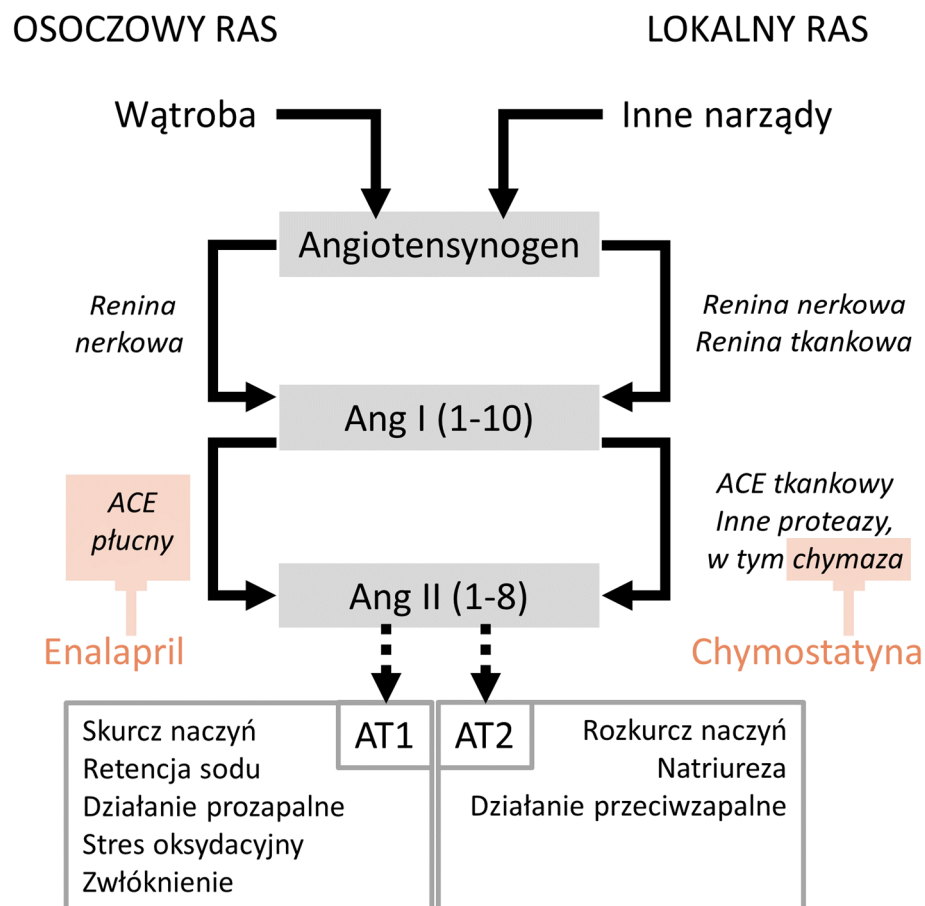
Enzym konwertujący angiotensynę typu 2 (ACE2, konwertaza angiotensyny 2), podobnie jak ACE1, jest monokarboksypeptydazą, występującą w formie związanej z błoną komórkową oraz rozpuszczoną w osoczu, a jej ekspresja obserwowana jest przede wszystkim w śródbłonku. Jednak w odróżnieniu od ACE1 ekspresja ta jest silnie ograniczona do serca, nerki oraz jąder, co sugeruje, że ACE2 odgrywa ważną rolę w działaniu lokalnego RAS tych narządów [Donoghue *i wsp.*, 2000]. ACE2 obniża poziom Ang II poprzez konwersję zarówno Ang I do Ang(1-9), jak i Ang II do Ang(1-7) [Santos *i wsp.*, 2018]. Peptyd Ang(1-7) wywiera w układzie krążenia działanie przeciwne do Ang II, stymulując wydzielanie NO,

prostaglandyny E2 (PGE2) i bradykininy [Ferrario *i wsp.*, 1997]. Przypuszcza się, że w stanie równowagi czynnościowej wpływ ACE2 na układ sercowo-naczyniowy jest niewielki, jednak jego znaczenie rośnie w stanach patologicznych [Oudit *i wsp.*, 2003, Soler *i wsp.*, 2013]. W związku z małym znaczeniem konwertazy ACE2, ilekroć w dalszej części tekstu niniejszej rozprawy użyty jest termin „konwertaza angiotensyny” i skrót „ACE” należy odnosić to do ACE1.

Zastosowanie inhibitorów ACE w leczeniu nadciśnienia powoduje obniżenie poziomu osoczowej Ang II, co wiąże się ze zwiększeniem poziomu Ang I. Większa dostępność Ang I może z kolei prowadzić do aktywacji ścieżek formowania Ang II niezależnych od aktywności ACE1 [Givertz, 2001]. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym aktywność alternatywnych ścieżek powstawania Ang II mogą być stany patologiczne, a więc i samo nadciśnienie. Wśród proteaz, które zdolne są przekształcać Ang I do Ang II wymienić można chymazę [Reilly *i wsp.*, 1982, Okunishi *i wsp.*, 1987, Okamura *i wsp.*, 1990] oraz obecną u gryzoni elastazę 2A, której aktywność, podobnie jak aktywność chymazy, znosi inhibitor chymostatyna [McDonald *i wsp.*, 2001, Richard *i wsp.*, 2001, Santos *i wsp.*, 2003]. Udział tych enzymów w syntezie Ang II w stanie równowagi czynnościowej jest znacznie mniejszy niż ACE1, jednak może się istotnie zwiększać w stanach patologicznych: nadciśnieniu tętniczym, chorobie wieńcowej i miażdżycy [McPherson *i wsp.*, 2004, Miyake-Ogawa *i wsp.*, 2005, Morikawa *i wsp.*, 2005].

Ekspresję chymazy stwierdzono w komórkach tucznych, komórkach śródbłonna oraz komórkach śródmiąższowych wielu narządów, w tym serca i nerek. W sercu człowieka chymaza jest syntetyzowana w komórkach śródbłonkowych i mezenchymalnych, a następnie wydzielana do płynu śródmiąższowego, gdzie odpowiada za syntezę 80% ilości Ang II obecnej w sercu [Petrie *i wsp.*, 2001]. Tak więc lokalnie w mięśniu sercowym czy ścianie naczyń krwionośnych człowieka zaledwie ok. 20% ilości Ang II wynika z czynności ACE1 [McPherson *i wsp.*, 2004]. Z drugiej strony za poziom Ang II w osoczu odpowiada prawie wyłącznie ACE1 [Lorenz, 2010, Park *i wsp.*, 2010], gdyż chymaza, po przejściu do krwiobiegu, jest natychmiastowo unieczynniana przez licznie obecne we krwi inhibitory proteaz serynowych [Urata *i wsp.*, 1993, Miyazaki i Takai, 2000, Miyazaki i Takai, 2001]. Chymaza jest więc wrażliwa na endogenne inhibitory proteaz serynowych i egzogenne inhibitory chymostatynę, nie jest jednak wrażliwa na inhibitory ACE [Urata *i wsp.*, 1990a, Urata *i wsp.*, 1990b]. U szczurów obecność chymazy potwierdzono w ścianie naczyń krwionośnych [Leite *i wsp.*, 1997] oraz sercu i innych narządach [Muller *i wsp.*, 1998]. Dlatego też w regulacji funkcji układu sercowo-naczyniowego ważną rolę odgrywa zarówno systemowa Ang II, jak również Ang II powstała w wyniku aktywności lokalnego RAS.

W stanach patologicznych chymaza odgrywa znaczącą rolę w procesie przebudowy i usztywnienia ściany naczyń krwionośnych. Przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej odbywa się poprzez aktywowanie przez chymazę metaloproteinazy 9 (MMP9) i transformującego czynnika wzrostu- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) [Harrison-Bernard *i wsp.*, 2013] oraz bezpośrednią degradację fibronektyny i kolagenu IV [Urata, 2000]. Równolegle syntetyzowana przez chymazę Ang II działa mitogennie na komórki mięśniówki gładkiej [Guo *i wsp.*, 2001]. W procesie tym chymaza wykazuje dwudziestokrotnie wyższą aktywność katalityczną w stosunku do Ang I niż inne tkankowe enzymy tworzące Ang II [Wei *i wsp.*, 2002]. W efekcie ściana naczyń ulega pogrubieniu, ale odłożone włókna macierzy zewnątrzkomórkowej zmniejszają jej elastyczność.



**Ryc. 1.** Schemat działania układu renina-angiotensyna (RAS). Po lewej stronie zaznaczono działanie osoczkowego RAS, po prawej – lokalnego (tkankowego) RAS. Nazwy enzymów zapisano kursywą. Egzogenne inhibitory oznaczono na pomarańczowo. Wiązanie do receptora oznaczono przerywaną linią. Efekty pobudzenia receptorów wymieniono w szarych ramkach. Na podstawie: [Haulica *i wsp.*, 2005, Chappell, 2012, Nehme *i wsp.*, 2019].



## **1.4. Wpływ diety wysokosodowej na układy zaangażowane w regulację ciśnienia krwi**

### **1.4.1. Zmiany w układzie renina-angiotensyna**

W efekcie działania diety wysokosodowej zmienia się aktywność i dostępność poszczególnych składników układu renina-angiotensyna. Przy wzroście  $P_{Na}$  obserwuje się obniżenie ekspresji reniny, któremu towarzyszy wzrost ekspresji ACE oraz receptorów AT1 [Samuel *i wsp.*, 2012]. Pacjenci sodowrażliwi reagują na wzrost spożycia sodu większymi wartościami MABP i mniejszą redukcją aktywności osoczowej reniny niż pacjenci sodooporni [Poch *i wsp.*, 2001]. Obniżona wrażliwość nerkowego mechanizmu regulującego uwalnianie reniny może więc być jedną z przyczyn sodowrażliwości. Z kolei ACE, którego ekspresja w diecie HS rośnie, zdolny jest do przekształcania naczyniorozszerzającej bradykininy w nieaktywną pochodną [Carey i Siragy, 2003]. W efekcie sygnał rozszerzający naczynia ulega osłabieniu.

### **1.4.2. Zmiany w układzie współczulnym**

Dieta HS u zwierząt prowadzi do zwiększenia ogólnej aktywności współczulnej. Jednym z najważniejszych obszarów ośrodkowych odpowiedzialnych za współczulną kontrolę napięcia naczyń krwionośnych jest dogłowy brzusno-boczny obszar rdzenia przedłużonego (RVLM, ang. *rostral ventrolateral medulla*). Jego wrażliwość na pobudzenie przez Ang II rośnie w diecie wysokosodowej, co przekłada się na wzrost ciśnienia tętniczego krwi [Adams *i wsp.*, 2008]. Ang II oddziałująca na RVLM może być syntetyzowana lokalnie [Grobe *i wsp.*, 2008] lub pochodzić z krążenia ogólnego, jako że Ang II jest w stanie przekraczać barierę krew-mózg [Rose i Audus, 1998]. W efekcie wzrostu aktywności współczulnej pod wpływem HS napięcie neurogenne naczyń krwionośnych rośnie, ale na ogół nie prowadzi to do wzrostu ciśnienia tętniczego u zdrowych zwierząt bez sodowrażliwości.

### **1.4.3. Zmiany strukturalne i czynnościowe w naczyniach krwionośnych**

Dieta HS prowadzi do wzrostu oporu obwodowego poprzez nasilenie ekspresji receptorów AT1 dla Ang II [Aroor *i wsp.*, 2013] oraz nasilenie produkcji ROS [Montezano i Touyz, 2014]. Nasiloną produkcję ROS podczas diety wysokosodowej stwierdzono w małych naczyniach mięśni prądkowanych, kory nerki i mózgu u szczurów niepredysponowanych do rozwoju nadciśnienia tętniczego [Weir i Fink, 2005]. Z badań doświadczalnych wynika także, że długotrwale stosowana dieta HS prowadzi do zwiększenia masy mięśni gładkich

ściany naczyń oporowych, co sprzyja rozwojowi nadciśnienia tętniczego. Przyczyną pogrubienia błony środkowej jest mitogenny wpływ angiotensyny II na komórki mięśniówki, nasilony u zwierząt na diecie HS dzięki zwiększonej ekspresji receptorów AT1. Zarówno Ang II, jak i ROS zwiększają tempo aktywacji transformującego czynnika wzrostu TGF- $\beta$ 1 (ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*) [Gibbons *i wsp.*, 1992, Tantisattamo *i wsp.*, 2019], cytokiny sprzyjającej kumulacji macierzy zewnątrzkomórkowej [Gu *i wsp.*, 1998]. Mięśniówka naczyń przyrasta więc na grubość (za sprawą proliferacji komórek i rozrostu macierzy zewnątrzkomórkowej), lecz ze względu na kumulację włókien macierzy zewnątrzkomórkowej elastyczność warstwy mięśniowej ulega zmniejszeniu.

Uszkodzenie naczyń, jakie pojawia się w efekcie wysokiej podaży sodu, dotyczy również śródbłonna. U zwierząt na diecie HS obserwuje się uszkodzenie warstwy glikokaliksu, która w warunkach prawidłowych chroni śródbłonek jako bariera selektywna, ograniczająca m. in. oddziaływanie sodu i innych czynników obecnych w osoczu na komórki śródbłonna [Bkaily *i wsp.*, 2021]. Uszkodzony glikokaliks ułatwia przemieszczanie dużych ilości sodu do wnętrza komórek śródbłonna [Oberleithner *i wsp.*, 2011], co zaburza potencjał błonowy i doprowadza do upośledzenia odpowiedzi tych komórek na czynniki zewnętrzne. Co więcej, uszkodzony glikokaliks zwiększa prawdopodobieństwo oddziaływania białek osocza i komórek układu odpornościowego z komórkami śródbłonna, co z kolei zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju w nich stanu zapalnego [Vinaiphath *i wsp.*, 2023]. Rzeczywiście, diecie HS towarzyszy chroniczny stan zapalny o niskim natężeniu w śródbłonku [Rosón *i wsp.*, 2006, Moriguchi *i wsp.*, 2011]. Uszkodzenie glikokaliksu prowadzi do dysfunkcji śródbłonna objawiającej się zmniejszeniem wydzielania NO. Dodatkowo, dieta HS prowadzi do obniżenia aktywności eNOS w śródbłonku. W badaniach na hodowlach komórek śródbłonna *in vitro* wykazano, że nawet nieznaczny wzrost  $P_{Na}$ , bez przekraczania jego zakresu prawidłowego, prowadzi do istotnego obniżenia aktywności eNOS [Martens i Edwards, 2011].

Oprócz dysfunkcji śródbłonna u zwierząt utrzymywanych na diecie wysokosodowej opisane są zaburzenia odpowiedzi na substancje naczynioaktywne, zarówno rozszerzające jak i kurczące w naczyniach obwodowych i w naczyniach krążenia mózgowego [Liu *i wsp.*, 1997, Frisbee i Lombard, 1998, Weber *i wsp.*, 1999, Weber i Lombard, 2000, Sofola *i wsp.*, 2002, Sylvester *i wsp.*, 2002].

Mechanizm niekorzystnego działania diety wysokosodowej na regulację napięcia ścian naczyń krwionośnych nie został w pełni poznany. Badania wpływu nadmiernej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na regulację oporu naczyń krwionośnych są fragmentaryczne, a wnioski dotyczące tego zagadnienia są często wyprowadzane

na podstawie wyników uzyskanych z badań na hodowlach komórek wchodzących w skład ściany naczyń krwionośnych. Część wyników pochodzi z badań na szczurach sodowrażliwych, takich jak Dahl czy DOCA, które na diecie wysokosodowej rozwijają nadciśnienie [Kobori *i wsp.*, 2003]. Nie wiadomo, w jakim stopniu zmiany powstające w naczyniach oporowych w przebiegu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego są uwarunkowane zwiększoną podażą sodu w diecie, a w jakim samym nadciśnieniem. Nie wiadomo również czy, i w jakim stopniu, naczyniowy układ renina-angiotensyna bierze udział w powstawaniu lub utrzymaniu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. Zbadanie tego ostatniego zagadnienia wydaje się szczególnie istotne z punktu widzenia pewnych problemów związanych z leczeniem nadciśnienia tętniczego za pomocą inhibitorów ACE. Długotrwałe leczenie za pomocą leków z tej grupy traci skuteczność u około 15% pacjentów. Zjawisko to nosi nazwę „ucieczki angiotensyny” (ang. *angiotensin escape*) i charakteryzuje się postępującym zwiększaniem osoczowego stężenia Ang II mimo kontynuacji leczenia [Hollenberg *i wsp.*, 1998]. W związku z tym, ze wszech miar zasadne wydaje się poszukiwanie leków hamujących powstawanie angiotensyny II w sposób niezależny od inhibitorów ACE.

Osobnym, także bardzo ważnym, zagadnieniem jest wpływ nadmiernego spożycia sodu – istotnego czynnika ryzyka udaru mózgu – na regulację napięcia tętnicy środkowej mózgu. Jest to naczynie krwionośne, którego niedrożność jest najczęstszą przyczyną udaru niedokrwinnego, a zaburzenia regulacji mogą prowadzić do deficytów poznawczych [Kubota *i wsp.*, 2022]. Wpływ diety wysokosodowej i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na mechanizmy regulacji napięcia tej tętnicy nie był systematycznie badany.

W badaniach pilotażowych do niniejszego projektu zauważono, że poziom jonów sodu w osoczu u zwierząt na diecie wysokosodowej pozostaje w zakresie normy fizjologicznej przez cały czas trwania doświadczenia, tj. 28 dni. Wobec tego pojawiło się pytanie: jeżeli nie sól to co? Na podstawie piśmiennictwa ustalono, że pośrednikiem w działaniu sodu przyjmowanego drogą pokarmową może być toksyna powstająca w efekcie pracy bakterii jelitowych – tlenek trimetyloaminy TMAO. Wykazano, że u szczurów na diecie wysokosodowej stężenie tej toksyny w osoczu krwi znacznie wzrasta [Bielińska *i wsp.*, 2018]. Dlatego też zdecydowano się na oznaczenie stężenia TMAO w osoczu zwierząt na diecie wysokosodowej oraz standardowej w ramach doświadczeń opisywanych w niniejszej rozprawie.

## 2. Hipotezy badawcze

W oparciu o przedstawione we Wstępie informacje o niekorzystnym wpływie nadmiernej podaży sodu w diecie na naczynia krwionośne sformułowano następujące hipotezy:

1. Długotrwale stosowana dieta wysokosodowa wywołuje zmiany czynnościowe:
  - w obwodowych naczyniach krwionośnych typu oporowego, mające istotny wpływ na rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego;
  - w dużych, oporowych naczyniach krwionośnych mózgu, prowadząc do zaburzenia śródbłonkozależnej regulacji krążenia mózgowego.
2. Długotrwale stosowana dieta wysokosodowa wpływa niekorzystnie na mikrobiotę jelitową, prowadząc do nadmiernej produkcji trimetyloaminy i TMAO.
3. Rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego jest związany zarówno z pobudzeniem osoczkowego, jak i lokalnego układu renina-angiotensyna.
4. Inhibitory chymazy są skuteczniejsze w leczeniu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego niż inhibitory osoczkowego enzymu konwertującego angiotensynę.

Hipotezy te weryfikowano realizując następujące cele szczegółowe projektu:

1. Określenie wpływu wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na odpowiedzi **tętnicy zaopatrującej mięsień smukły** (GMA, obwodowe naczynie oporowe) oraz **tętnicy środkowej mózgu** (MCA, naczynie oporowe krążenia mózgowego) na **substancje naczyniozężające** (agonistę receptora AT1 i endotelinę-1) oraz **substancje naczyniorozszerzające** zależne od NO (acetylocholinę i ATP).
2. Określenie udziału tlenu azotu w kształtowaniu podstawowego napięcia ściany GMA i MCA przy użyciu **inhibitora syntazy tlenu azotu** (estru metyloвого nitro-L-argininy, L-NAME).
3. Określenie wpływu wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na stan glikokaliksu śródbłonka naczyń krwionośnych, niezbędnego do pobudzenia wydzielania NO w odpowiedzi na naprężenia ścinające. Dla realizacji tego zadania, w osoczu krwi badanych zwierząt oznaczano stężenie syndekanu-1 (wskaźnik uszkodzenia glikokaliksu), stężenie azotynów (metabolity NO świadczące o podstawowej aktywności wydzielniczej śródbłonka) i ADMA (endogenny inhibitor syntazy NO).

4. Porównanie efektywności hipotensyjnego i naczyniowego wpływu blokerów osoczowego (enalapril, inhibitor ACE) i tkankowego (chymostatyna, inhibitor chymazy) układu RAS u szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym.

Aby realizować cele szczegółowe zaplanowano serie badań na szczurach Sprague-Dawley (stado bez genetycznych predyspozycji do rozwijania nadciśnienia tętniczego), które przez okres 28 dni utrzymywane były na diecie standardowej lub wysokosodowej. U części zwierząt usunięto nerkę, co wywołało utrudnienie w utrzymaniu bilansu sodowego. Zwierzęta na diecie wysokosodowej z usuniętą nerką rozwijały sodo-zależne nadciśnienie tętnicze, stając się odpowiednim organizmem modelowym do przetestowania sformułowanych powyżej hipotez.

### 3. Materiały i metody

Badania były finansowane z programu MMRC-KNOW/KNOW 05: „Udział zmian naczyniowych w rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego”. Procedury doświadczalne zostały zaaprobowane przez IV i II Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na Zwierzętach Doświadczalnych w Warszawie (numery uchwał: 05/2014, WAW2/076/2018, WAW2/075/2018).

#### 3.1. Zwierzęta

Doświadczenia prowadzono na szczurach samcach stada Sprague-Dawley (SD; n = 140) o wyjściowej masie ciała około 200 g, pochodzących ze zwierzętarni IMDiK PAN. Doświadczenie rozpoczynało się po tygodniu aklimatyzacji do nowego pomieszczenia, w którym zwierzęta przebywały przez następne 28 dni prowadzenia doświadczenia. Szczury były utrzymywane w klatkach bytowych w parach w systemie oświetlenia dzień : noc 12:12, z wolnym dostępem do pokarmu i wody. Podczas podawania substancji czynnych w wodzie do picia zwierzęta były utrzymywane w klatkach pojedynczo. Pokarm stanowiła pasza standardowa (Labofeed B – standard; 0,25% Na, w/w; Wytwórnia Pasz „Morawski”, Kcynia, Polska; dalej w skrócie NS) lub wysokosodowa (Labofeed B – wysokosodowa; 4% Na, w/w; Wytwórnia Pasz „Morawski”, Kcynia, Polska; dalej w skrócie HS).

Sodo-zależne nadciśnienie tętnicze wywoływano u zwierząt na diecie HS, którym zredukowano liczbę nefronów przez jednostronne usunięcie nerki (nefrektomię, UNX). Połączenie tych dwóch czynników – wysokiej podaży sodu w diecie i obniżonej zdolności regulowania gospodarki sodowej przez nerki – wywołuje rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego w ciągu dwóch tygodni [Bączyńska i Sadowski, 2012, Bączyńska *i wsp.*, 2019]. W kolejnych grupach zwierzęta z rozwiniętym sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym poddano leczeniu farmakologicznemu. Łącznie zwierzęta podzielono na sześć grup doświadczalnych, które dalej będą określane skrótowo jako:

1. SHAM-NS – szczury SD z pozorowaną nefrektomią (ang. *sham*) na diecie NS (grupa kontrolna 1), trwającej 28 dni (n = 21);
2. SHAM-HS – szczury SD z pozorowaną nefrektomią (ang. *sham*) na diecie HS, trwającej 28 dni (n = 24);
3. UNX-NS – szczury SD z jednostronną nefrektomią (ang. *unilateral nephrectomy*) na diecie NS (grupa kontrolna 2), trwającej 28 dni (n = 23);

4. UNX-HS – szczury SD z jednostronną nefrektomią (ang. *unilateral nephrectomy*) na diecie HS, trwającej 28 dni (n = 24);
5. UNX-HS+Enal – szczury SD z jednostronną nefrektomią (ang. *unilateral nephrectomy*) na diecie HS, trwającej 28 dni, które od 14 dnia diety otrzymywały w wodzie do picia enalapril (Enal) w jednej z czterech dawek: 5 (n = 7), 10 (n = 6), 20 (n = 7), 40 (n = 6) mg/kg m.c. (łącznie n = 26);
6. UNX-HS+Chym – szczury SD z jednostronną nefrektomią (ang. *unilateral nephrectomy*) na diecie HS, trwającej 28 dni, które od 14 dnia diety otrzymywały w wodzie do picia chymostatynę (Chym) w jednej z czterech dawek: 1 (n = 6), 2 (n = 6), 4 (n = 6), 6 (n = 4) mg/kg m.c. (łącznie n = 22).

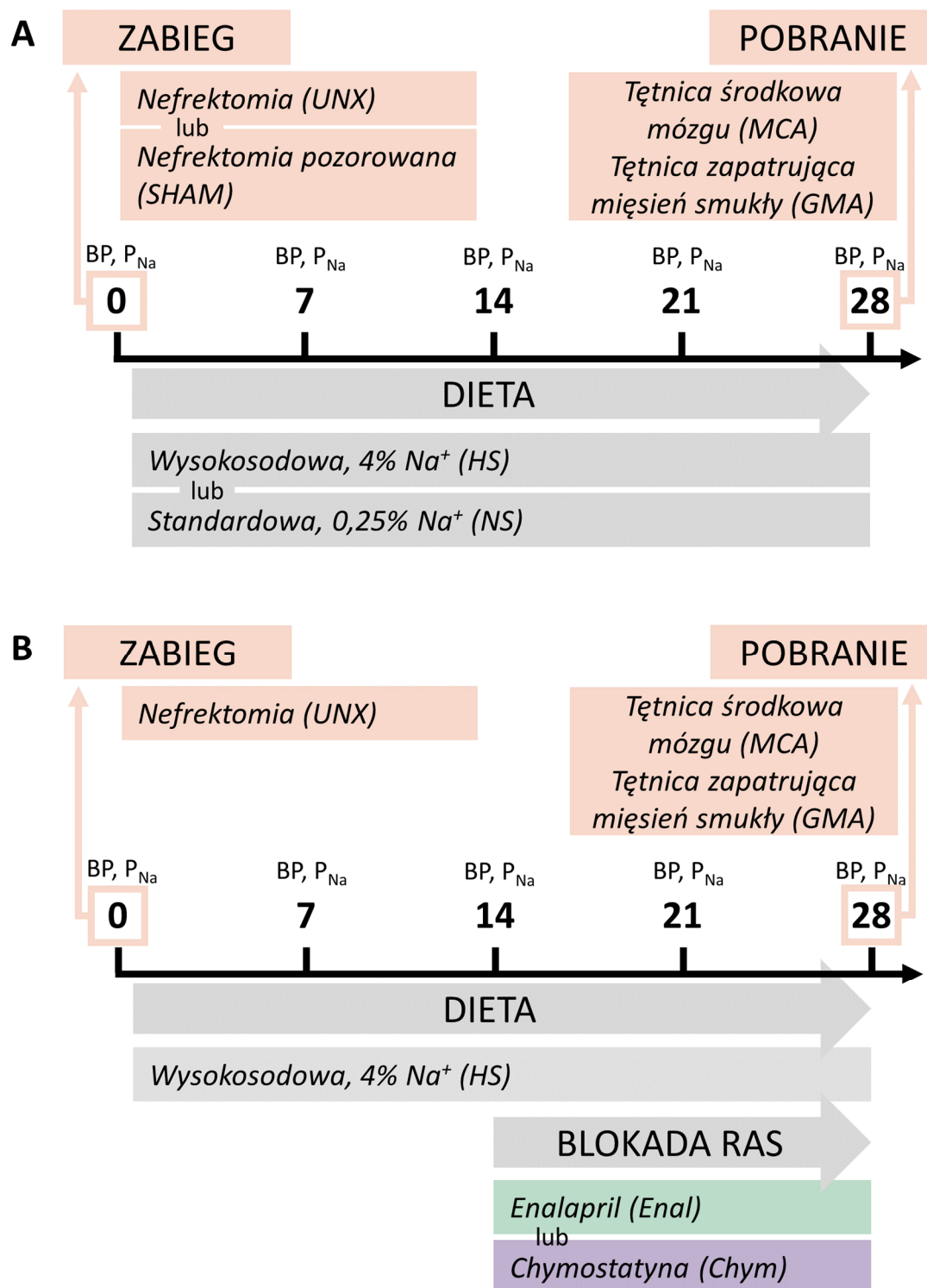
## 3.2. Przebieg doświadczenia

### 3.2.1. Monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi i stężenia jonów sodu w osoczu

**Przyzwyczajanie do czynności pomiarowych.** W tygodniu poprzedzającym rozpoczęcie procedury doświadczalnej zwierzęta przyzwyczajano do nieinwazyjnych pomiarów ciśnienia krwi tętniczej za pomocą mankietów okluzyjnych, zakładanych na ogon (system IITC Life Sciences Blood Pressure, Woodland Hills, CA, USA). Pomiar taki wymagał chwilowego unieruchomienia szczura w rurce pomiarowej, co stanowiło czynnik stresorodny, a przyzwyczajanie zwierząt do tych warunków miało na celu ograniczenie stresu związanego z pomiarem.

**Dzień „0”.** W dniu, w którym rozpoczynano doświadczenie chroniczne, wykonywano pomiar ciśnienia krwi tętniczej, po którym następowało pobranie krwi z żyły ogonowej celem określenia stężenia jonów sodu w osoczu ( $P_{Na}$ ). Wartości ciśnienia oraz  $P_{Na}$  uznano za wartości wyjściowe (na wykresach opisywane są jako dzień „0”). W kolejnym kroku zwierzęta poddawano nefrektomii lub nefrektomii pozorowanej. Następnie szczurom w grupach „-HS” zamieniano paszę standardową na paszę wysokosodową. Szczury w grupach „-NS” otrzymywały nadal wyjściową paszę standardową (Ryc. 2).

**Punkty pomiarowe.** Szczury spożywały paszę o zróżnicowanej zawartości sodu (NS lub HS) przez 28 dni. Podczas trwania diety raz w tygodniu (dni „7”, „14”, „21” i „28”) monitorowano ciśnienie krwi tętniczej, a następnie pobierano próbkę krwi, podobnie jak w dniu „0” (Ryc. 2).



**Ryc. 2.** Schemat przebiegu doświadczenia. A. Wywołanie sodozależnego nadciśnienia tętniczego (szczury z nefrektomią na diecie wysokosodowej – UNX-HS – oraz odpowiednie grupy kontrolne). B. Podawanie inhibitorów układu renina-angiotensyna (RAS) dla szczurów z sodozależnym nadciśnieniem tętniczym.



### **3.2.2. Zabieg jednostronnej nefrektomii lub nefrektomii pozorowanej**

Zabiegi chirurgiczne wykonywano w warunkach sterylnych w znieczuleniu ogólnym (ketamina 50 mg/kg, ksylazyna 7,5 mg/kg, i.p.; Vetoquinol Biowet, Gorzów Wielkopolski, Polska). Po uprzedniej miejscowej dezynfekcji i ogoleniu skóry wykonywano cięcie lędźwiowe, a następnie delikatnie uwalniano nerkę z otaczających tkanek i tłuszczu. Szypułę nerkową podwiązywano, a nerkę usuwano (krok ten pomijano w operacji pozorowanej). Następnie zakładano szwy (oddzielne na powłoki mięśniowe, a oddzielne na skórę) i podawano Metacam (0,2 mg/kg, s.c.; Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Niemcy) – środek łagodzący ból pooperacyjny. Zwierzęta przenoszono do indywidualnych klatek bytowych; w grupach „-HS” zmieniano paszę na wysokosodową. Następnego dnia kontrolowano stan szwów i w razie potrzeby poprawiano je, a następnie ponownie łączono zwierzęta w pary. Zabieg nefrektomii/porozowanej nefrektomii wykonywano losowo – raz prawostronnie, a raz lewostronnie.

### **3.2.3. Pomiary w klatkach metabolicznych**

U szczurów z grup SHAM-NS, SHAM-HS, UNX-NS i UNX-HS (n = 3 dla każdej z grup) wykonano pomiary w klatkach metabolicznych, pozwalające na określenie dobowego spożycia wody, diurezy (tempa wydalania moczu/wody) i natriurezy (tempa wydalania sodu). Szczury umieszczano na 24 godziny w indywidualnych klatkach metabolicznych (Tecniplast Gazzada, Buguggiate, Włochy) raz w tygodniu; pierwszy pobyt w klatkach metabolicznych rozpoczął się dołą przed dniem „0”. Każdy dobowy pobyt w klatkach metabolicznych kończył się pomiarem ciśnienia tętniczego krwi i pobraniem próbki krwi według czynności opisywanych wyżej. Pomiar spożycia wody i diurezy odbywał się za pomocą wagi, pozwalającej określić ubytek wody z butelki oraz ilość moczu zebranego w odpowiednim pojemniku. Poziom natriurezy wymagał oznaczenia stężenia sodu w moczu ( $U_{Na}$ , czynność opisana dalej), a iloczyn tej wartości i wielkości diurezy (V) dawał wartość natriurezy ( $U_{Na}V$ ).

### **3.2.4. Podawanie substancji hipotensyjnych**

Szczurom z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym, które rozwinęło się w grupie UNX-HS, podawano inhibitory odmiennych enzymów odpowiedzialnych za powstawanie Ang II:

- Enalapril (Benaraplil 20, Berlin-Chemie AG, Berlin, Niemcy), inhibitor ACE, w jednej z czterech dawek: 5, 10, 20, 40 mg/kg m.c. (UNX-HS+Enal);

- Chymostatyna (Chymostatin, Sigma, nr kat. C7268, Saint Louis, MO, USA), inhibitor chymazy, w jednej z czterech dawek: 1, 2, 4, 6 mg/kg m.c. (UNX-HS+Chym).

Inhibitory podawane były w wodzie do picia, począwszy od dnia „14” doświadczenia, przy czym pomiary ciśnienia krwi i pobranie próbki krwi tego dnia odbywały się przed rozpoczęciem podawania inhibitorów. Podczas podawania tych substancji zwierzęta przebywały w klatkach indywidualnie. Roztwór inhibitorów był przygotowywany codziennie i podawany zwierzętom w butelkach z ciemnego tworzywa celem ograniczenia rozkładania się inhibitorów. Dobowa dawka inhibitorów była rozpuszczana w ilości wody nieznacznie mniejszej niż przeciętne dobowe spożycie (określone dzięki badaniom w klatkach metabolicznych), co powodowało przyjęcie całej podanej dawki przez zwierzę. W nielicznych przypadkach po wypiciu leku zwierzę otrzymywało na pozostałą część doby wodę bez inhibitora.

### 3.2.5. Porównanie skuteczności substancji hipotensyjnych

Skuteczność hipotensyjną oceniano przez porównanie IC<sub>50</sub> (ang. *half-maximal inhibitory concentration*) dla obu substancji [Sebaugh, 2011]. Wartości IC<sub>50</sub> obliczono przy pomocy programu GraphPad Prism (wersja 5, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Wskaźnik ten używany jest najczęściej do określania aktywności substancji cytotoksycznych. W naszym przypadku posłużył on do określenia stężenia enalaprilu i chymostatyny wywołującego obniżenie ciśnienia rozkurczowego w grupach UNX-HS-Enal i UNX-HS-Chym o 50% w stosunku do ciśnienia rozkurczowego DBP w grupie kontrolnej UNX-HS, którą to wartość przyjęto za 100%. Do analizy wybrano ciśnienie rozkurczowe, ponieważ jego wielkość koreluje lepiej, niż wielkość ciśnienia skurczowego SBP, ze stanem napięcia naczyń i TPR.

## 3. 3. Badania czynnościowe *ex vivo*

### 3.3.1. Pobranie naczyń krwionośnych i krwi do dalszych analiz

Zwierzę znieczulano mieszaniną O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O (30%/70%) zawierającą 5% izofluranu. Po sprawdzeniu, że zwierzę nie cofa łapy w odpowiedzi na ucisk, wykonywano dekapitację za pomocą gilotyny.

Mieszaną krew wypływającą z naczyń tułowia pobierano w sposób zależny od przeznaczenia próbki. Próbkę krwi przeznaczoną do oznaczania Ang II pobierano do próbki zawierającej koktajl inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, Saint Louis, MO, USA), odwirowywano (3000 g, 10 min) i zamrażano w ciekłym azocie.

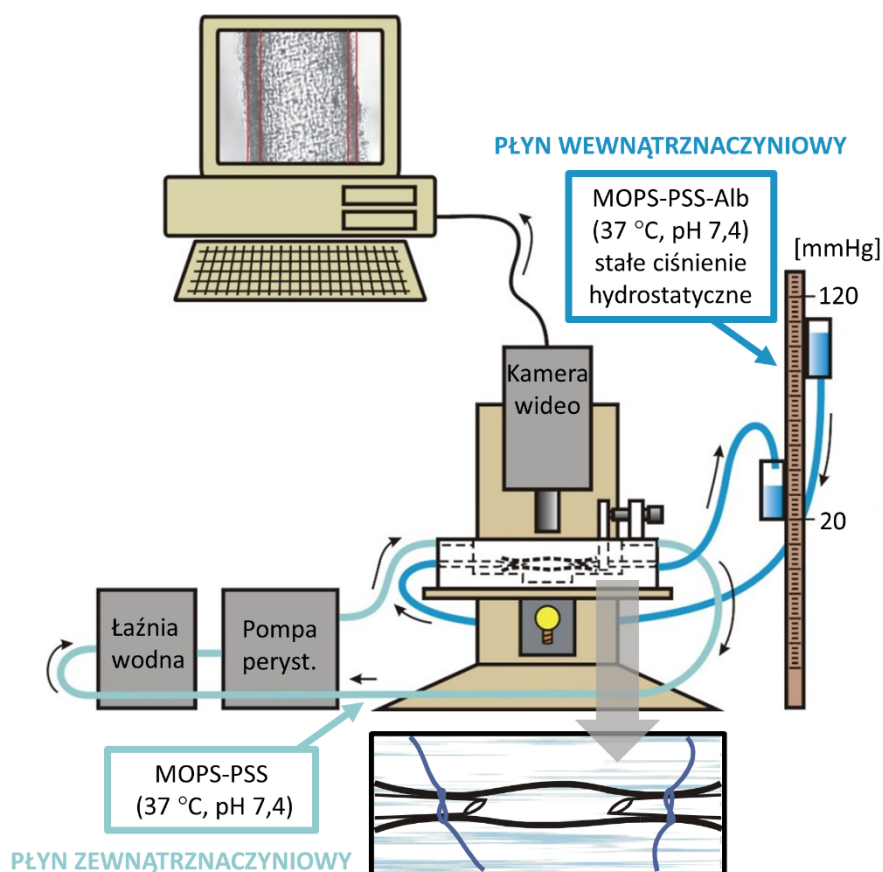
Pozostałe próbki krwi pobierano do heparynizowanych probówek, odwirowywano (3000 g, 10 min), chroniono przed ekspozycją na światło (zabieg konieczny dla późniejszego oznaczenia metabolitów NO) i zamrażano w suchym lodzie. Wszystkie próbki przechowywano w temperaturze -80 °C.

Mózg wyjmowano w czasie krótszym niż 3 minuty od dekapitacji i umieszczano w jałowym roztworze 0,9% NaCl o temperaturze 4 °C. Obie tętnice MCA izolowano z mózgu począwszy od kręgu Willisa, a następnie delikatnie oczyszczano z tkanek przylegających. W dalszym kroku pobierano odpowiednie wycinki mięśnia smukłego z obu kończyn tylnych szczura (rozpoczynano naprzemiennie od lewej lub prawej) i umieszczano w roztworze 0,9% NaCl o temperaturze 4 °C. Z każdej kończyny izolowano tętnicę GMA. Wyizolowane naczynia umieszczano w indywidualnych komorach arteriografu wypełnionych roztworem soli fizjologicznej buforowanej kwasem 3-[N-morfolino]propanosulfonowym z dodatkiem 1% dializowanej albuminy wołowej (MOPS-PSS-Alb), w którym prowadzono badania czynnościowe. Podczas jednego doświadczenia badano reaktywność jednej tętnicy MCA (naprzemiennie z lewej lub prawej półkuli) oraz jednej tętnicy GMA (naprzemiennie z lewej lub prawej kończyny).

### **3.3.2. Przygotowanie naczyń do badań**

Naczynie przeniesione do komory arteriografu kaniulowano za pomocą szklanej kapilary i mocowano za pomocą nici nylonowej 10-0. Światło naczynia delikatnie przepłukiwano MOPS-PSS-Alb zgodnie z fizjologicznym kierunkiem przepływu krwi celem usunięcia krwi z naczynia. Następnie wolny koniec naczynia mocowano na drugiej szklanej kapilarze, a komorę arteriografu przenoszono na stolik odwróconego mikroskopu świetlnego (CKX41, Olympus, Center Valley, PA, USA). Naczynie było perfundowane MOPS-PSS-Alb w tempie 100 µl/min pod stałym ciśnieniem hydrostatycznym wynoszącym 80 mmHg w przypadku naczyń pobranych ze szczurów normotensyjnych lub maksymalnie 120 mmHg w przypadku naczyń pobranych ze szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym UNX-HS oraz UNX-HS otrzymujących substancje o działaniu hipotensyjnym. Podczas doświadczenia przepływ wewnątrznacyniowy był utrzymany w MCA, ale nie w GMA [Csato *i wsp.*, 2014]. Płyn na zewnątrz naczynia (MOPS-PSS), o temperaturze 37 °C i pH 7,4 wymieniano w tempie 20 ml/min przy użyciu pompy perystaltycznej (typ PP2B-15, ZALIMP lub Masterflex, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Temperatura płynu zewnątrz- i wewnątrznacyniowego utrzymywana była na stałym poziomie 37 °C. Naczynie obserwowano przy pomocy toru wizyjnego złożonego z kamery i monitora telewizyjnego.

Średnicę naczynia mierzono manualnie bezpośrednio na ekranie monitora. Faza stabilizacyjna naczynia (między kaniulacją a rozpoczęciem doświadczenia) wynosiła 60 min. Podczas całego doświadczenia roztworem wewnątrznacyniowym pozostawał MOPS-PSS-Alb, a zewnątrznacyniowym – MOPS-PSS (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Schemat aparatury do badań czynnościowych *ex vivo*. MOPS-PSS – roztwór soli fizjologicznej buforowanej kwasem 3-[N-morfolino]propanosulfonowym. MOPS-PSS-Alb – roztwór soli fizjologicznej buforowanej kwasem 3-[N-morfolino]propanosulfonowym z dodatkiem 1% dializowanej albuminy wołowej.

### 3.3.3. Potwierdzenie żywotności wyizolowanego naczynia

Badania czynnościowe przeprowadzano wyłącznie na naczyniach, które spełniły dwa kryteria żywotności. Pierwszym z nich było nabranie napięcia miogennego podczas fazy stabilizacyjnej; wyrazem tego napięcia jest zmniejszenie średnicy naczynia w stosunku do średnicy naczynia nieuciśnieniowego (bezpośrednio po kaniulacji) średnio o 35-40%. Drugim kryterium żywotności była odpowiedź na zwiększenie stężenia jonów potasu w przestrzeni

zewntrznacyniowej (roztwór 20 mM KCl w roztworze MOPS-PSS, podawany przez co najmniej 15 min). Prawidłowe naczynie krwionośne odpowiadało na KCl rozszerzeniem przynajmniej o 20%. Jeżeli naczynie nie spełniło tych kryteriów, uznawane było za niereaktywne, co skutkowało wykluczeniem go z doświadczenia. Po potwierdzeniu żywotności płyn zewntrznacyniowy byl wymieniany na czysty MOPS-PSS. Po kolejnych 15 min stabilizacji w nowych warunkach, mierzono ponownie średnicę naczynia (pomiar ten uznawano za wyjściową średnicę naczynia w doświadczeniu) i rozpoczynano badanie.

### 3.3.4. Badanie reaktywności GMA i MCA

W pierwszej kolejności badano naczynia szczurów z grup nieotrzymujących substancji hipotensyjnych (SHAM-NS, SHAM-HS, UNX-NS, UNX-HS). Na tętnicach GMA i MCA, spełniających kryteria żywotności, sprawdzano odpowiedzi na podanie:

- substancji naczyniokurczących: agonisty receptora AT1 ( $AT1_{agon}$ ; GMA, n = 20, MCA, n = 21) i endoteliny-1 (ET-1; GMA, n = 21, MCA n = 25);
- substancji o zależnym od rodbonka działaniu naczyniorozszerzającym: ACh w przypadku GMA (n = 24) i ATP w przypadku MCA (n = 24);
- inhibitora syntazy tlenu azotu – estru metylowego nitro-L-argininy (L-NAME), w celu zbadania udziału NO w utrzymaniu napięcia podstawowego badanych naczyń (GMA, n = 22; MCA, n = 23).

Sposób podawania substancji przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Substancje naczynioaktywne stosowane podczas badań czynnościowych *ex vivo*, wraz z drogą podania, dawkami i czasem podawania (powolnej infuzji kończącej się pomiarem średnicy naczynia).  $AT1R_{agon}$  – agonista receptora typu 1 dla angiotensyny II, ET-1 – endotelina-1, ACh – acetylocholina, ATP – adenozy-5'-trifosforan, L-NAME – ester metylowy nitro-L-argininy.

Substancja	Droga	Dawki	Czas podawania
$AT1R_{agon}$	zewntrznacyniowo	$5 \times 10^{-10}$ M, $10^{-9}$ M, $5 \times 10^{-9}$ M, $10^{-8}$ M	5 min
ET-1	zewntrznacyniowo	$10^{-10}$ M, $5 \times 10^{-10}$ M, $10^{-9}$ M, $5 \times 10^{-9}$ M, $10^{-8}$ M	15 min
ACh	zewntrznacyniowo	$10^{-9}$ M, $10^{-8}$ M, $5 \times 10^{-8}$ M, $10^{-7}$ M, $5 \times 10^{-7}$ M	15 min
ATP	wewntrznacyniowo	$10^{-8}$ M, $5 \times 10^{-8}$ M, $10^{-7}$ M, $5 \times 10^{-7}$ M, $10^{-6}$ M	15 min
L-NAME	zewntrznacyniowo	$10^{-5}$ M	30 min

Substancje podawane zewnątrznaczyniowo były rozpuszczone w MOPS-PSS, a ATP – w MOPS-PSS-Alb. Naczynie otrzymywało wyłącznie jedną substancję (AT1R<sub>agon</sub>, ET-1, ACh lub ATP) we wszystkich zaplanowanych dawkach, podawanych w kolejności rosnącej. Dodatkowo, po zakończeniu tego doświadczenia, naczynia, na których badano reaktywność na AT1R<sub>agon</sub>, zostały wykorzystane do określenia odpowiedzi na L-NAME. Przed rozpoczęciem tej części badania, komorę arteriografu dokładnie płukano, a płyn zewnątrznaczyniowy wymieniano na czysty MOPS-PSS. Po 15 min stabilizacji mierzono średnicę naczynia (średnica wyjściowa), a następnie podawano L-NAME w infuzji.

Na podstawie powyższych badań reaktywności można było określić, które z naczyń w grupie z nadciśnieniem sodo-zależnym UNX-HS charakteryzują się upośledzeniem funkcji. Wybrane w ten sposób naczynia i testy czynnościowe posłużyły do oceny skuteczności enalapriu i chymostatyny w grupach UNX-HS+Enal i UNX-HS+Chym.

Ostatecznie, w tych dwóch grupach określono odpowiedź:

- GMA na podanie AT1R<sub>agon</sub> (n = 30),
- MCA na podanie ATP (n = 35),
- GMA (n = 30) i MCA (n = 34) na podanie L-NAME,

przy czym każdorazowo zachowano warunki podawania opisane w Tabeli 1.

Te doświadczenia przeprowadzano wg. następującego schematu: po zakończeniu badania reaktywności na AT1R<sub>agon</sub> lub ATP naczynia zbyły wykorzystane do określenia odpowiedzi na L-NAME. W przypadku naczyń, które przeszły test reaktywności na AT1R<sub>agon</sub>, postępowano w sposób opisany wyżej. W przypadku naczyń, które przeszły test reaktywności na ATP, płyn wewnątrznaczyniowy wymieniano na czysty MOPS-PSS-Alb. Po 30 min stabilizacji mierzono średnicę naczynia (średnica wyjściowa), a następnie podawano L-NAME w infuzji.

### **3.4. Analiza próbek osocza i moczu**

#### **3.4.1. Pomiary stężenia jonów sodu w osoczu i moczu, zbieranych w doświadczeniu chronicznym**

Krew pobraną z żyły ogonowej w dniach „0”, „7”, „14”, „21” i „28” wirowano (3000 g, 10 min), a osocze zbierano i przechowywano w temperaturze -80 °C. Mocz zebrany w kłatkach metabolicznych wirowano (800 g, 5 min) celem usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń, a następnie przechowywano w -20 °C. Pomiar stężenia jonów sodu wykonywano przy użyciu fotometru płomieniowego (model PFP7, Jenway, Essex, UK), po czym odczytywano z krzywej

standardowej wykreślonej na podstawie pomiarów roztworów standardowych o znanym stężeniu sodu.

### **3.4.2. Analiza osocza zebranego w chwili uśpienia terminalnego**

Zamrożone uprzednio próbki osocza przechowywano w temperaturze  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aż do dnia analizy.

#### ***Określenie stężenia Ang II w osoczu***

Stężenie Ang II w osoczu oznaczano za pomocą testu ELISA (Cat. EK-002-12, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA). Przed jego wykonaniem osocze oczyszczano na kolumnach ekstrakcyjnych (Bakerbond spe, Octadecyl, C18, J.T. Baker Inc., Philipsburg, NJ, USA) wykorzystując technikę SPE. Ekstrakcja na kolumnach SPE polega na przepuszczeniu ciekłej próbki przez złożę sorbentu (w tym przypadku: złożę krzemionkowe) i adsorpcji oznaczonych związków na złożu. Osocze i bufor ekstrakcyjny A (nr kat. RK-BA-1, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) rozcieńczano w proporcji 1:1 i wirowano (16 128 g, 20 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant zachowywano, a eluent odrzucano. Kolumny aktywowano buforem ekstrakcyjnym B (nr kat. RK-BB-1), a następnie trzykrotnie przemywano buforem A. Na aktywowane kolumny nakładano supernatant, a następnie dwukrotnie przemywano buforem A. Ostatnim etapem było wymycie Ang II ze złoża poprzez dodanie na kolumny buforu B; eluent zbierano w probówce. Następnie odparowywano do sucha azotem technicznym (6.5 M3, Nord Gaz s.c., Warszawa, Polska) i zamrażano w  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania testu ELISA. Oznaczenie wykonano w Zakładzie Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

#### ***Określenie stężenia metabolitów NO w osoczu***

Stężenie azotynów w osoczu oznaczano za pomocą analizatora tlenu azotu NOA 280 (Sievers Instruments, Boulder, CO, USA). Metoda pomiaru polega na redukcji NO za pomocą ozonu i wytworzeniu sygnału chemiluminescencji. Próbki osocza o objętości  $100\text{ }\mu\text{l}$  wprowadzono do zbiornika zawierającego jodek potasu w kwasie octowym. Roztwór ten redukuje azotyny do NO. Analizator wytwarza ozon ( $\text{O}_3$ ), który reagując z NO tworzy dwutlenek azotu ( $\text{NO}_2$ ) i tlen ( $\text{O}_2$ ). Cząsteczki  $\text{NO}_2$  powstają w stanie wzbudzonym elektrycznie ( $\text{NO}_2^*$ ), a ich elektrony, powracając do stanu pierwotnego uwalniają nadmiar energii w postaci fotonu ( $h\nu$ ). Sygnał chemiluminescencyjny analizatora NO był następnie przeliczany na stężenie za pomocą krzywej kalibracji otrzymanej ze standardowych roztworów azotynów.

Oznaczenie wykonano w Zakładzie Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

#### ***Określenie stężenia TMA, TMAO i ADMA w osoczu***

Stężenie trimetyloaminy (TMA), tlenu trimetyloaminy (TMAO) i symetrycznej dimetyloargininy (ADMA) w osoczu oceniano za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Waters Acquity Ultra Performance, Milford, CT, USA) sprzężonego z potrójnym kwadropolowym spektrometrem masowym (Waters TQ-S, Milford, CT, USA) w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego [Ufnal *i wsp.*, 2014].

#### ***Określenie stężenia syndekanu-1 w osoczu***

Pomiary stężenia syndekanu-1 (wskaźnika stanu glikokaliksu) w osoczu zostały wykonane za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA według instrukcji producenta (nr kat. E-EL-R0996, Elabscience, Houston, TX, USA) w Zakładzie Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

### **3.5. Analiza statystyczna**

W analizie statystycznej posłużono się programem GraphPad Prism (wersja 5, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Do porównań międzygrupowych zmiennych mierzonych w czasie stosowano test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i analizę *post hoc* testem wielokrotnych porównań Tukeya, chyba że zaznaczono inaczej. Wartości dla indywidualnych punktów w czasie porównywano za pomocą testu t Studenta. W tekście, tabelach i na rycinach jako miarę rozrzutu danych podawano średnią arytmetyczną oraz błąd standardowy średniej (SEM, ang. Standard Error of the Mean). Za istotną statystycznie różnicę przyjmowano poziom istotności  $p \leq 0,05$ . Na rycinach zaznaczano trzy stopnie istotności:  $p < 0,05$  (jeden znak, np. \*),  $p < 0,01$  (dwa znaki, np. \*\*),  $p < 0,001$  (trzy znaki, np. \*\*\*).

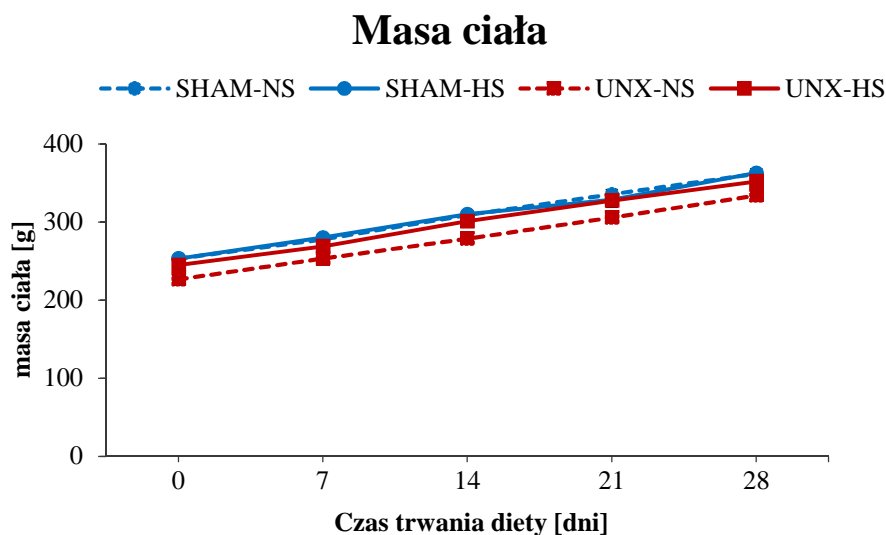


## 4. Wyniki

### 4.1. Wpływ 28-dniowej diety wysokosodowej na wybrane parametry fizjologiczne w badanych grupach zwierząt

#### 4.1.1. Masa ciała zwierząt

W chwili rozpoczęcia doświadczenia (dzień „0”) masa ciała zwierząt w grupach SHAM-NS, SHAM-HS, UNX-NS i UNX-HS była zbliżona. Przez cztery tygodnie doświadczenia szczury we wszystkich grupach doświadczalnych przybierały na wadze podobnie (Ryc. 4). Przyrost masy ciała przez czas trwania doświadczenia w poszczególnych grupach był do siebie zbliżony (SHAM-NS,  $108,8 \pm 5,6$  g; SHAM-HS,  $109,5 \pm 4,0$  g; UNX-NS,  $107,3 \pm 3,3$  g; UNX-HS,  $107,2 \pm 4,8$  g).



**Ryc. 4.** Przyrost masy ciała w czasie trwania doświadczenia u zwierząt na diecie standardowej (NS) lub wysokosodowej (HS), poddanych nefrektomii (UNX) lub nefrektomii pozorowanej (SHAM). Krzywe przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Liczebność grup: SHAM-NS,  $n = 18$ ; SHAM-HS,  $n = 21$ ; UNX-NS,  $n = 20$ ; UNX-HS,  $n = 21$ .

#### 4.1.2. Zmiany ciśnienia tętniczego krwi i stężenia sodu w osoczu

W chwili rozpoczęcia doświadczenia (dzień „0”) grupy SHAM-NS, SHAM-HS, UNX-NS i UNX-HS cechowały się porównywalnymi wartościami ciśnienia skurczowego (SBP), rozkurczowego (DBP) i średniego (MABP; Tab. 2, Tab. S1). W grupach SHAM-NS, SHAM-HS i UNX-NS nie obserwowano wzrostu wartości ciśnienia tętniczego w kolejnych dniach

doświadczenia. W przeciwieństwie do nich, w grupie UNX-HS obserwowano istotny wzrost ciśnienia począwszy od dnia „7” ( $p < 0,001$  zarówno dla SBP, DBP jak i MABP; Tab. 2). Począwszy od dnia „7” wartości ciśnień SBP, DBP i MABP w grupie UNX-HS były istotnie wyższe niż w pozostałych grupach ( $p < 0,0001$  dla każdego z punktów pomiarowych, vs SHAM-NS, SHAM-HS i UNX-NS). Wartości ciśnień SBP, DBP i MABP w grupach SHAM-NS, SHAM-HS i UNX-NS pozostawały zbliżone do siebie przez cały czas trwania doświadczenia (Tab. S1).

Stężenie jonów sodu w osoczu, porównywalne dla czterech omawianych grup, pozostawało na stałym poziomie przez 28 dni trwania doświadczenia, nie przekraczając wartości fizjologicznych (Tab. 2).

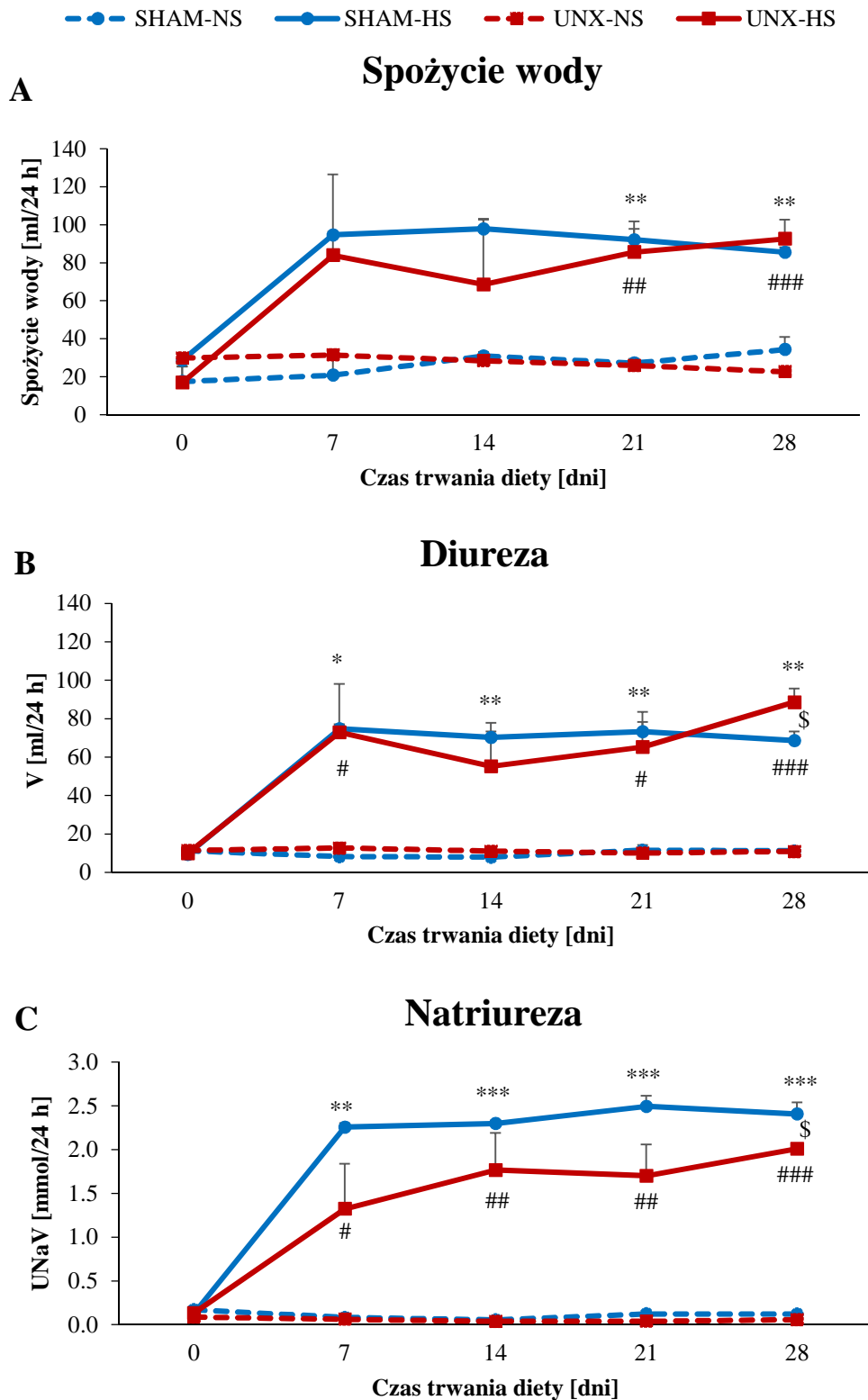
**Tabela 2.** Ciśnienie tętnicze i stężenie jonów sodu w osoczu w grupach SHAM-NS, SHAM-HS, UNX-NS, UNX-HS. SBP – ciśnienie skurczowe, DBP – ciśnienie rozkurczowe, MABP – ciśnienie średnie,  $P_{Na}$  – stężenie jonów sodu w osoczu. Wartości przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM; \*\*\* vs dzień „0”,  $p < 0,001$ .

SHAM-NS						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	18	125,0 $\pm$ 1,3	128,0 $\pm$ 1,7	127,1 $\pm$ 1,8	126,1 $\pm$ 1,8	125,8 $\pm$ 1,3
DBP [mmHg]	18	79,0 $\pm$ 1,5	81,6 $\pm$ 1,0	82,0 $\pm$ 1,7	80,0 $\pm$ 1,3	81,8 $\pm$ 1,2
MABP [mmHg]	18	94,4 $\pm$ 1,2	96,5 $\pm$ 1,1	96,5 $\pm$ 1,6	95,4 $\pm$ 1,0	96,5 $\pm$ 1,0
$P_{Na}$ [mM]	18	137,4 $\pm$ 0,7	137,0 $\pm$ 0,8	136,7 $\pm$ 0,8	137,6 $\pm$ 0,7	137,6 $\pm$ 0,8
SHAM-HS						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	21	126,5 $\pm$ 1,2	127,7 $\pm$ 1,6	129,8 $\pm$ 1,6	129,5 $\pm$ 1,8	129,4 $\pm$ 2,0
DBP [mmHg]	21	81,2 $\pm$ 1,0	82,1 $\pm$ 1,5	83,5 $\pm$ 1,5	82,4 $\pm$ 1,6	82,7 $\pm$ 1,6
MABP [mmHg]	21	96,3 $\pm$ 0,9	97,3 $\pm$ 1,3	98,9 $\pm$ 1,4	98,0 $\pm$ 1,6	98,3 $\pm$ 1,7
$P_{Na}$ [mM]	21	137,1 $\pm$ 0,6	137,6 $\pm$ 0,5	137,4 $\pm$ 0,7	137,9 $\pm$ 0,8	138,4 $\pm$ 0,7
UNX-NS						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	20	125,9 $\pm$ 0,9	126,6 $\pm$ 0,7	127,7 $\pm$ 0,9	127,6 $\pm$ 1,0	127,5 $\pm$ 0,8
DBP [mmHg]	20	79,8 $\pm$ 0,8	80,1 $\pm$ 0,7	80,6 $\pm$ 0,9	79,6 $\pm$ 0,8	81,0 $\pm$ 0,6
MABP [mmHg]	20	95,1 $\pm$ 0,7	95,6 $\pm$ 0,6	96,3 $\pm$ 0,7	95,5 $\pm$ 0,6	96,5 $\pm$ 0,6
$P_{Na}$ [mM]	20	138,3 $\pm$ 0,6	137,5 $\pm$ 0,7	138,1 $\pm$ 0,7	137,8 $\pm$ 0,7	138,4 $\pm$ 0,8
UNX-HS						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	21	124,6 $\pm$ 0,8	140,5 $\pm$ 1,3 ***	151,7 $\pm$ 1,6 ***	163,0 $\pm$ 0,9 ***	165,3 $\pm$ 0,9 ***
DBP [mmHg]	21	80,6 $\pm$ 0,8	88,5 $\pm$ 0,9 ***	93,1 $\pm$ 1,3 ***	96,9 $\pm$ 1,0 ***	99,1 $\pm$ 1,0 ***
MABP [mmHg]	21	95,2 $\pm$ 0,6	105,8 $\pm$ 0,9 ***	112,6 $\pm$ 1,1 ***	119,0 $\pm$ 0,9 ***	121,1 $\pm$ 0,7 ***
$P_{Na}$ [mM]	21	136,6 $\pm$ 0,5	137,5 $\pm$ 0,8	137,8 $\pm$ 0,8	138,8 $\pm$ 0,8	138,1 $\pm$ 0,7

#### **4.1.3. Pomiary dobowe w klatkach metabolicznych: spożycie wody, diureza i natriureza**

Wartości dobowego spożycia wody, diurezy (tempa wydalania moczu) i natriurezy (tempa wydalania sodu z moczem) w czterech badanych grupach w dniu „0” były porównywalne. U zwierząt na diecie wysokosodowej (grupy SHAM-HS i UNX-HS) obserwowano podwyższone wartości tych trzech parametrów względem dnia „0” począwszy od dnia „7”; przez następnie dni pozostawały one stabilne do czasu zakończenia doświadczenia (dzień „28”). U zwierząt na diecie standardowej (SHAM-NS i UNX-NX) spożycie wody, diureza i natriureza były stabilne przez cały czas trwania doświadczenia, nie różniąc się od dnia „0” (Ryc. 5).

Stężenie jonów sodu w osoczu nie zmieniało się w czasie trwania doświadczenia, pozostając na tym samym, fizjologicznym poziomie około 138 mM (Tab. 2).



**Ryc. 5.** Wpływ dwudziestoosmiodniowej diety wysokosodowej i sodozależnego nadciśnienia tętniczego na mierzone dobowo: spożycie wody (A), diurezę (B) i natriurezę (C). Wartości liczbowe przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Pojedynczy symbol (\*, #, \$) oznacza  $p < 0,05$ ; podwójny symbol (\*\*, ##) oznacza  $p < 0,01$ ; potrójny symbol (\*\*\*, ###) oznacza  $p < 0,001$ . \* SHAM-HS vs SHAM-NS; # UNX-HS vs UNX-NS; \$ SHAM-HS vs UNX-HS. Liczebność grup:  $n = 3$ .

## 4.2. Wpływ wysokiej podaży sodu i sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego na reaktywność izolowanych naczyń krwionośnych

### 4.2.1. Odpowiedź na substancje naczyniozwężające

Nefrektomia nie wywarła wpływu na odpowiedź GMA i MCA na podanie  $AT1R_{agon}$ , lub ET-1. Krzywe dawka-odpowiedź były podobne u szczurów SHAM-NS i UNX-NS (Ryc. 6, 7).

Natomiast 28-dniowa dieta wysokosodowa spowodowała zwiększenie wrażliwości GMA na substancje naczyniokurczące (Ryc. 6AB), pozostając w tym aspekcie bez wpływu na MCA (Ryc. 7AB). GMA, pobrana od zwierząt będących na diecie wysokosodowej (SHAM-HS i UNX-HS), odpowiadała silniejszym skurczem na podanie  $AT1R_{agon}$  w porównaniu do grup kontrolnych (odpowiednio SHAM-NS i UNX-NS), począwszy od stężenia progowego  $10^{-9}$  M ( $p < 0,05$ ; Ryc. 6A). Co istotne, krzywe dawka-odpowiedź dla  $AT1R_{agon}$  w grupie szczurów na diecie wysokosodowej bez nadciśnienia (SHAM-HS) i z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym (UNX-HS) nie różniły się przebiegiem (Ryc. 6A).

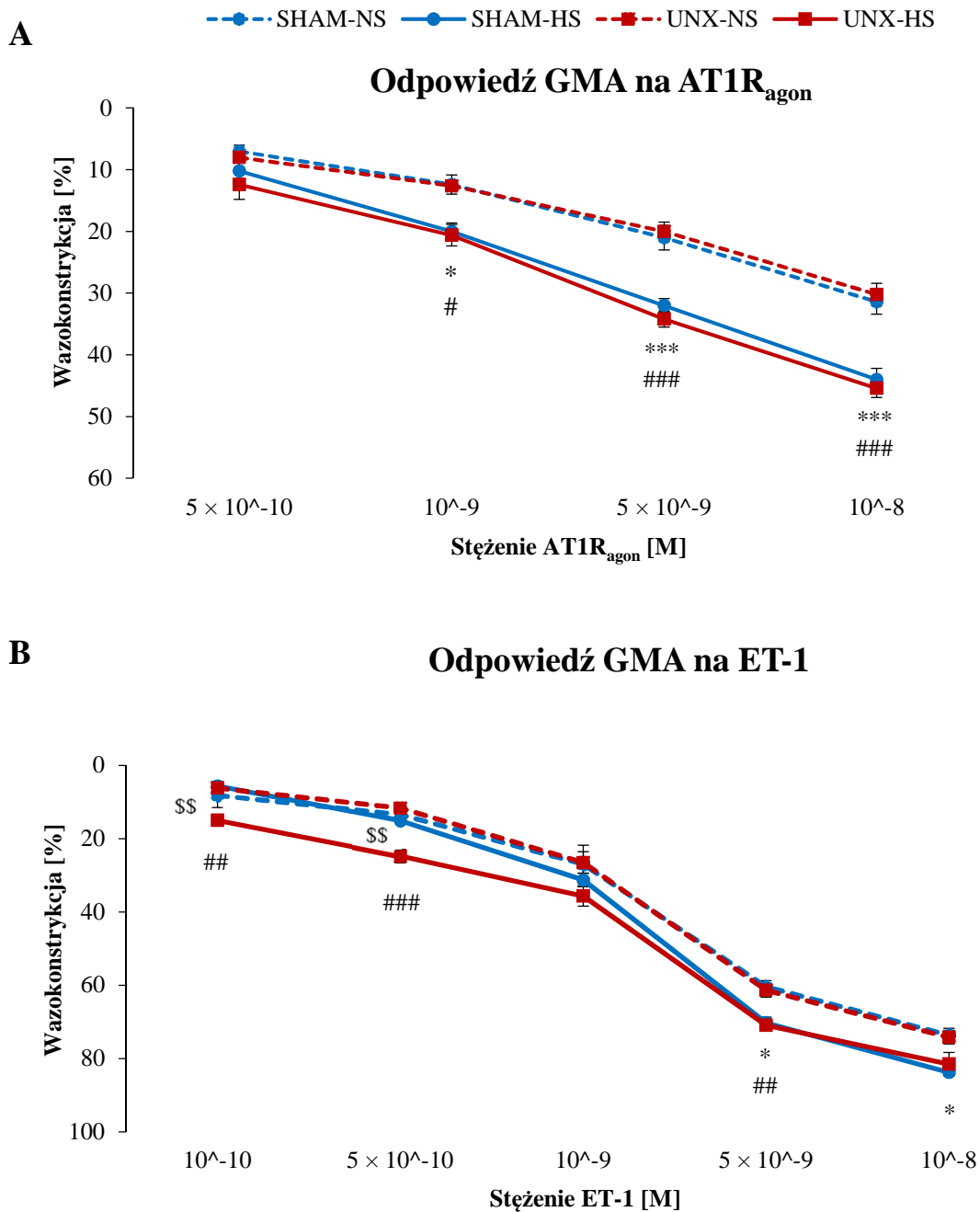
Tak więc, zwiększenie skurczu GMA w odpowiedzi na pobudzenie receptora AT1, obserwowane po 3 tygodniach trwania sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego (Tab. 2) jest spowodowane zwiększoną konsumpcją sodu, a nie niekorzystnym wpływem samego nadciśnienia.

W przypadku odpowiedzi GMA na ET-1, niekorzystny wpływ zwiększonej podaży sodu został wzmocniony w grupie z sodo-zależnym nadciśnieniem (Ryc. 6B). Różnice w odpowiedzi pomiędzy grupą SHAM na diecie standardowej i SHAM na diecie wysokosodowej, świadczące o wpływie diety, pojawiły się po podaniu ET-1 w dawce  $5 \times 10^{-9}$  M. Skurcz GMA w odpowiedzi na tę dawkę był statystycznie istotnie większy w grupie SHAM-HS niż SHAM-NS ( $70,3 \pm 1,6\%$  vs  $60,4 \pm 1,6\%$ ;  $p < 0,05$ ; Ryc. 6B). Podobnie było po zwiększeniu dawki ET-1. Ostatecznie, krzywe dawka-odpowiedź różniły się między sobą w zakresie tych wyższych stężeń, co sugeruje, że dieta wysokosodowa nasila skurcz GMA w odpowiedzi na wyższe dawki ET-1. Natomiast u szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym UNX-HS obserwowano zwiększenie wrażliwości GMA na podanie ET-1 w porównaniu z grupą na diecie wysokosodowej SHAM-HS, ale bez sodo-zależnego nadciśnienia. Różnice w odpowiedzi występowały już po podaniu najmniejszej ze stosowanych dawek ET-1 ( $10^{-10}$  M) i były widoczne przy pięciokrotnym zwiększeniu dawki (Ryc. 6B). Skurcz GMA był silniejszy w grupie UNX-HS niż SHAM-HS ( $15,0 \pm 1,2\%$  vs  $5,6 \pm 1,3\%$  dla dawki  $10^{-10}$  M;  $24,8 \pm 1,8\%$

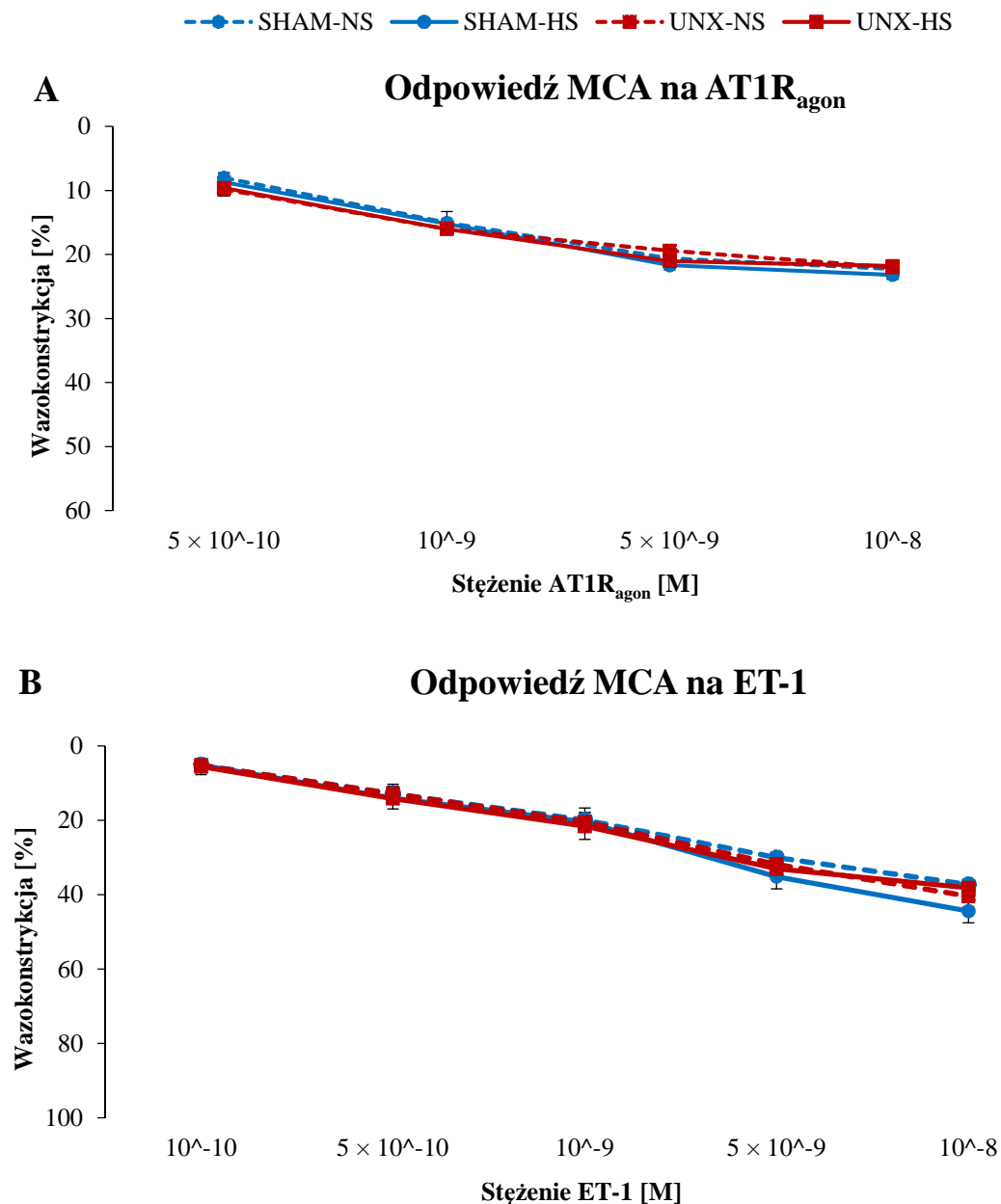
vs  $15,1 \pm 0,9\%$  dla dawki  $5 \times 10^{-9}$  M; w obu przypadkach  $p < 0,01$ ). W zakresie wyższych dawek różnice w skurczu GMA pomiędzy UNX-HS i SHAM-HS zaniknęły.

Ten addytywny efekt diety wysokosodowej i sodo-zależnego nadciśnienia w przypadku ET-1 jest niewidoczny przy porównaniu krzywych dawka-odpowiedź w grupach UNX-HS i UNX-NS. Z tego porównania wynika jedynie, i aż, że sodo-zależne nadciśnienie tętnicze zwiększa skurcz w odpowiedzi na podanie endoteliny-1, podobnie jak to widać w przypadku pobudzenia receptorów AT1 (Ryc. 6A)

Krzywe dawka-odpowiedź dla obu substancji naczyniokurczących (AT1R<sub>agon</sub> i ET-1) w przypadku MCA nie różniły się między grupami (Ryc. 7). Tak więc, ani wysoka podaż sodu, ani trwające trzy tygodnie nadciśnienie tętnicze nie wywarły wpływu na siłę skurczu wywołanego przez te substancje.



**Ryc. 6.** Krzywe dawka-odpowiedź tętnicy GMA dla substancji naczyniokurczących: A. Agonisty receptora AT1 (AT1R<sub>agon</sub>), B. Endoteliny-1 (ET-1). Odpowiedź przedstawiona jest jako zmiana procentowa względem wyjściowej średnicy naczynia. Wartości liczbowe przedstawiają średnią arytmetyczną ± SEM. Pojedynczy symbol (\*, #) oznacza  $p < 0,05$ ; podwójny symbol (##, \$\$) oznacza  $p < 0,01$ ; potrójny symbol (\*\*\*, ###) oznacza  $p < 0,001$ . \* SHAM-HS vs SHAM-NS; # UNX-HS vs UNX-NS; \$ SHAM-HS vs UNX-HS. Liczebność grup (A):  $n = 5$ . Liczebność grup (B): SHAM-NS,  $n = 5$ ; SHAM-HS,  $n = 8$ ; UNX-NS,  $n = 6$ ; UNX-HS,  $n = 8$ .



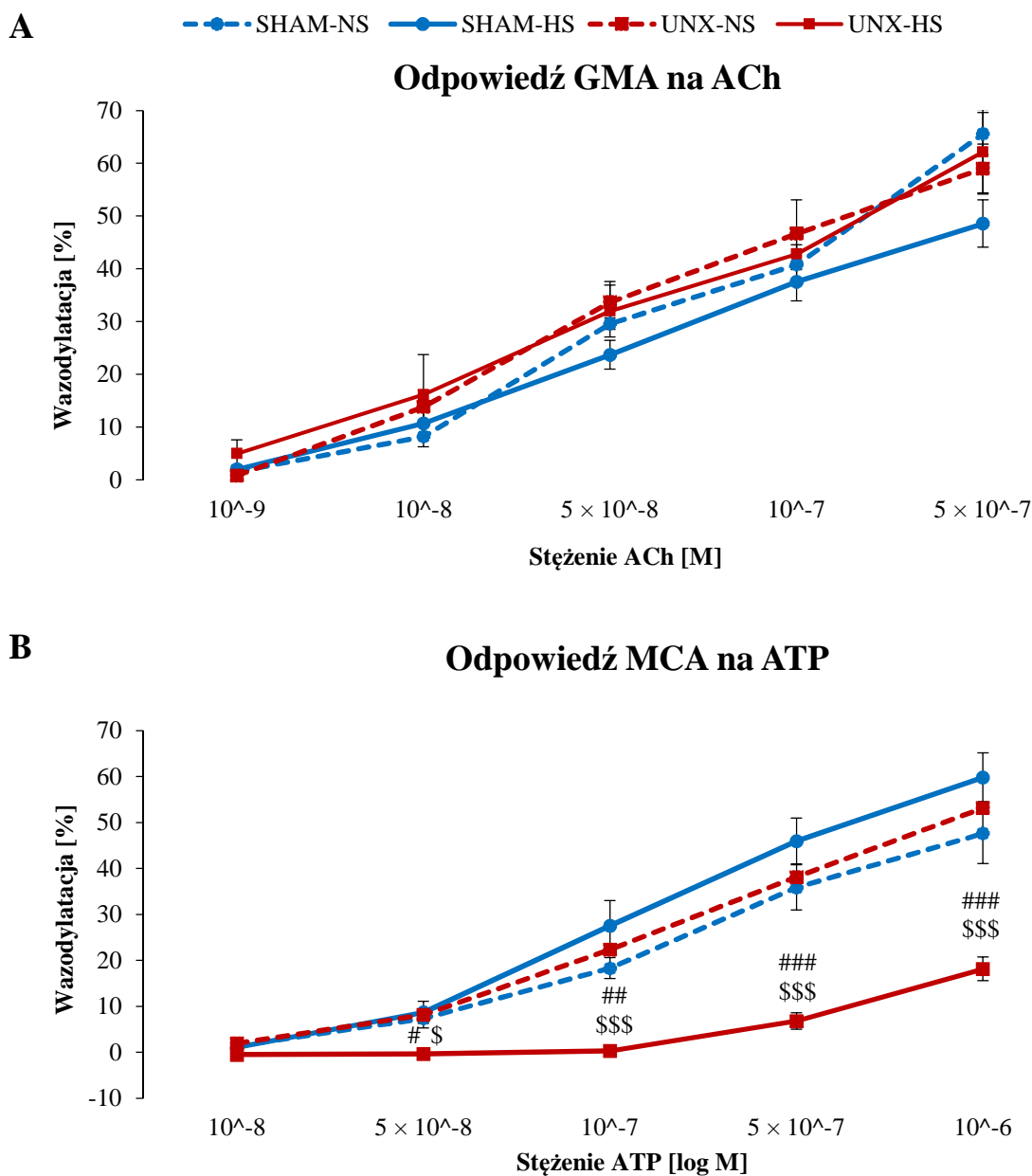
**Ryc. 7.** Krzywe dawka-odpowiedź tętnicy MCA dla substancji naczyniokurczących: A. agonisty receptora AT1 (AT1R<sub>agon</sub>), B. endoteliny-1 (ET-1). Odpowiedź przestawiona jest jako zmiana procentowa względem wyjściowej średnicy naczynia. Wartości przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Liczebność grup (A): SHAM-NS, n = 5; UNX-NS, n = 5; UNX-HS, n = 5; SHAM-HS, n = 6. Liczebność grup (B): SHAM-NS, n = 5; SHAM-HS, n = 8; UNX-NS, n = 5; UNX-HS, n = 7.



#### 4.2.2. Odpowiedź na śródbłonkozależne substancje naczyniorozszerzające

Nefrektomia nie wywarła wpływu na odpowiedź GMA i MCA na podanie śródbłonkozależnych substancji naczyniorozszerzających, tj. ACh w przypadku GMA oraz ATP w przypadku MCA. Krzywe dawka-odpowiedź były podobne u szczurów SHAM-NS i UNX-NS (Ryc. 8AB).

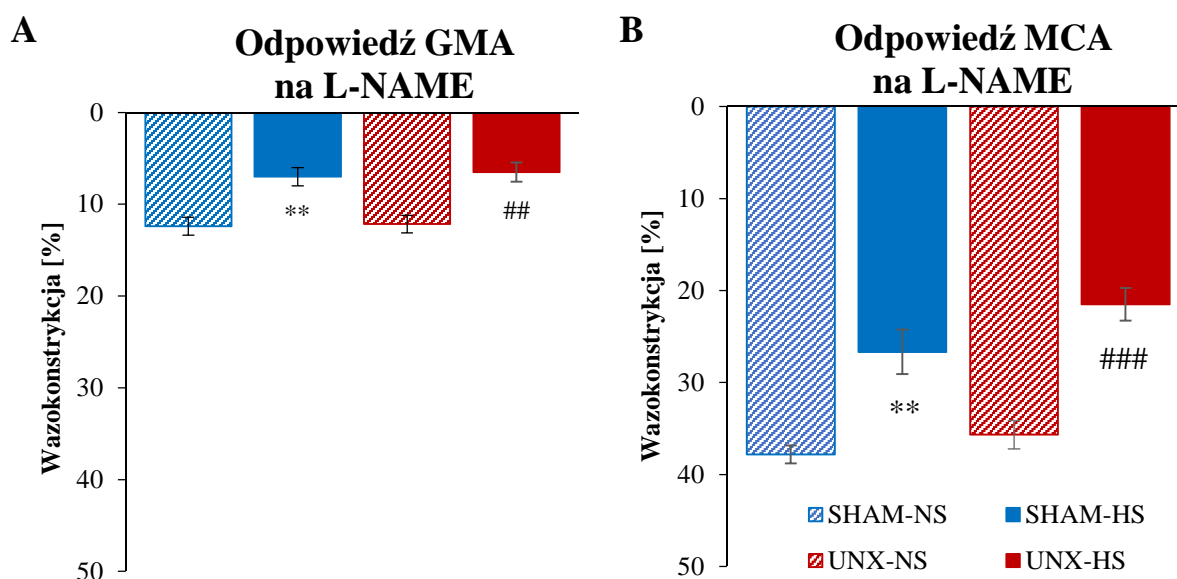
Natomiast u zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym UNX-HS ta odpowiedź była wyraźnie upośledzona jedynie w przypadku MCA. Krzywa zależności dawka-odpowiedź była przesunięta w prawo, dawka progowa ATP była 5-krotnie wyższa ( $10^{-7}$  vs.  $5 \times 10^{-8}$  M) niż w pozostałych grupach, a odpowiedź na podanie najwyższej z badanych dawek ATP ( $10^{-6}$  M) w grupie UNX-HS była ponad dwukrotnie mniejsza niż w grupie kontrolnej UNX-NS ( $18,2 \pm 2,6\%$  vs.  $53,2 \pm 3,6\%$ ;  $p < 0,001$ ; Ryc. 8B).



**Ryc. 8.** Krzywe dawka-odpowiedź izolowanych naczyń tętniczych na podanie substancji naczyniorozszerzających. A. Odpowiedź tętnicy zaopatrującej mięsień smukły (GMA) na podanie acetylocholino (ACh). B. Odpowiedź tętnicy środkowej mózgu (MCA) na podanie ATP. Odpowiedź przedstawiona jest jako zmiana procentowa względem wyjściowej średnicy naczynia. Wartości liczbowe przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Pojedynczy symbol (#, \$) oznacza  $p < 0,05$ ; podwójny symbol (##) oznacza  $p < 0,01$ ; potrójny symbol (###, \$\$\$) oznacza  $p < 0,001$ . # UNX-HS vs UNX-NS; \$ UNX-HS vs SHAM-HS. Liczebność grup (A): SHAM-NS,  $n = 5$ ; SHAM-HS,  $n = 7$ ; UNX-NS,  $n = 6$ ; UNX-HS,  $n = 6$ . Liczebność grup (B): SHAM-NS,  $n = 6$ ; SHAM-HS,  $n = 6$ ; UNX-NS,  $n = 7$ ; UNX-HS,  $n = 5$ .

### 4.2.3. Odpowiedź na zablokowanie syntazy tlenu azotu

Podanie inhibitora syntazy NO, L-NAME ( $10^{-5}$  M) wywołało skurcz wszystkich badanych naczyń, niezależnie od typu naczynia (GMA i MCA), diety (NS i HS), czy masy nerek (UNX i SHAM). Odpowiedź GMA na podanie L-NAME była porównywalna między grupami otrzymującymi paszę standardową (SHAM-NS i UNX-NS); podobnie odpowiedź MCA na L-NAME była porównywalna między tymi grupami. Jednak zablokowanie syntezy NO powodowało istotnie mniejszy skurcz GMA i MCA w grupach na diecie HS. Odpowiedź GMA na L-NAME była niższa zarówno w grupie SHAM-HS (zmniejszenie średnicy naczynia o  $7,0 \pm 1,0\%$ ) vs  $12,4 \pm 1,0\%$  w grupie SHAM-NS;  $p < 0,01$ ), jak i UNX-HS (zmniejszenie średnicy naczynia o  $6,5 \pm 1,1$  vs  $12,2 \pm 0,9\%$  w grupie UNX-NS;  $p < 0,01$ ; Ryc. 9A). Podobnie odpowiedź MCA na L-NAME była niższa zarówno w grupie SHAM-HS (zmniejszenie średnicy naczynia o  $26,7 \pm 2,4$  vs  $37,8 \pm 1,0\%$  w grupie SHAM-NS;  $p < 0,01$ ), jak i UNX-HS (zmniejszenie średnicy naczynia o  $21,5 \pm 1,8$  vs  $35,7 \pm 1,5\%$  w grupie UNX-NS;  $p < 0,001$ ; Ryc. 9B).



**Ryc. 9.** Odpowiedź tętnicy GMA (A) i MCA (B) na podanie inhibitora syntazy tlenu azotu L-NAME. Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Podwójny symbol (\*\*, ##) oznacza  $p < 0,01$ ; potrójny symbol (###) oznacza  $p < 0,001$ . \* vs SHAM-NS; # vs UNX-NS. Liczebność grup:  $n = 5-6$ .

Warto podkreślić, że nefrektomia nie wywiera wpływu na odpowiedź naczyń na podanie L-NAME (podobne zmniejszenie średnicy GMA oraz MCA w grupach SHAM-NS i UNX-NS) oraz, że udział tlenu azotu w kształtowaniu napięcia podstawowego GMA jest statystycznie

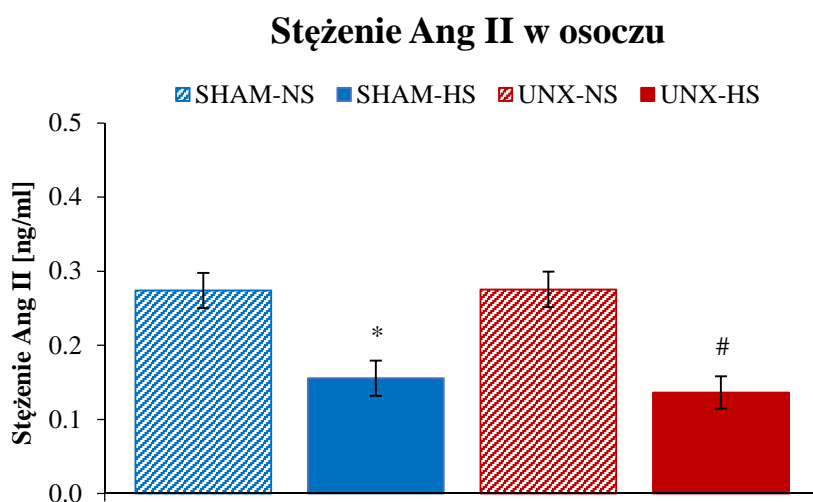
istotnie mniejszy niż w przypadku MCA; podanie L-NAME spowodowało zmniejszenie średnicy GMA w grupie SHAM-NS o  $12,4 \pm 1,0\%$ , natomiast w przypadku MCA obserwowano zmniejszenie średnicy o  $37,8 \pm 1,0\%$  ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Analiza osocza zwierząt z na diecie wysokosodowej i z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym

#### 4.3.1. Pomiar stężenia wybranych substancji czynnych

Nefrektomia nie wpłynęła na poziom Ang II w osoczu u szczurów na diecie standardowej. Po 28 dniach trwania diety wynosił on  $0,27 \pm 0,02$  ng/ml i  $0,28 \pm 0,04$  ng/ml, odpowiednio w grupie SHAM-NS i UNX-NS (Ryc. 10).

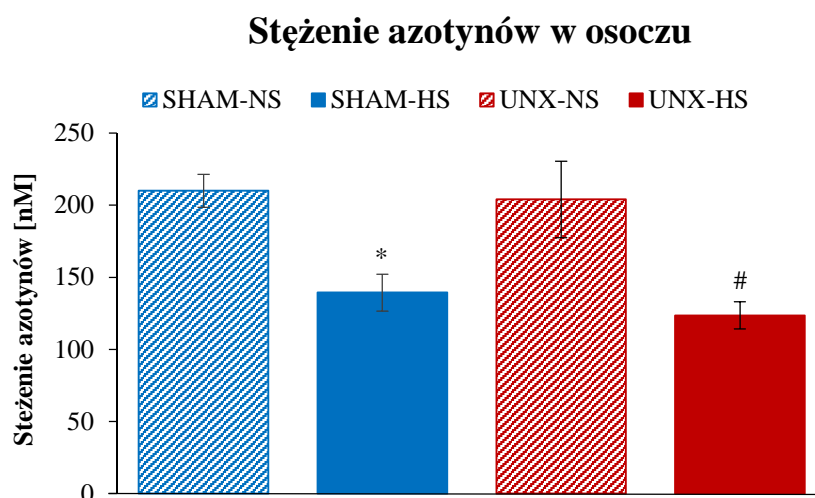
Natomiast stężenie Ang II w osoczu w tym samym momencie trwania doświadczenia, było niższe u szczurów na diecie wysokosodowej niż u szczurów na diecie standardowej, zarówno u zwierząt z nefrektomią ( $0,14 \pm 0,02$  u UNX-HS vs  $0,28 \pm 0,04$  ng/ml u UNX-NS;  $p < 0,05$ ), jak i nefrektomią pozorowaną ( $0,16 \pm 0,02$  u SHAM-HS vs  $0,27 \pm 0,02$  ng/ml u SHAM-NS;  $p < 0,05$ ; Ryc. 10).



**Ryc. 10.** Porównanie stężenia angiotensyny II (Ang II) w osoczu po 28 dniach diety wysokosodowej (HS) lub standardowej (NS) u zwierząt z nefrektomią (UNX) lub nefrektomią pozorowaną (SHAM). Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. \* lub #  $p < 0,05$ . \* vs SHAM-NS; # vs UNX-NS. Liczebność grup: n = 5.

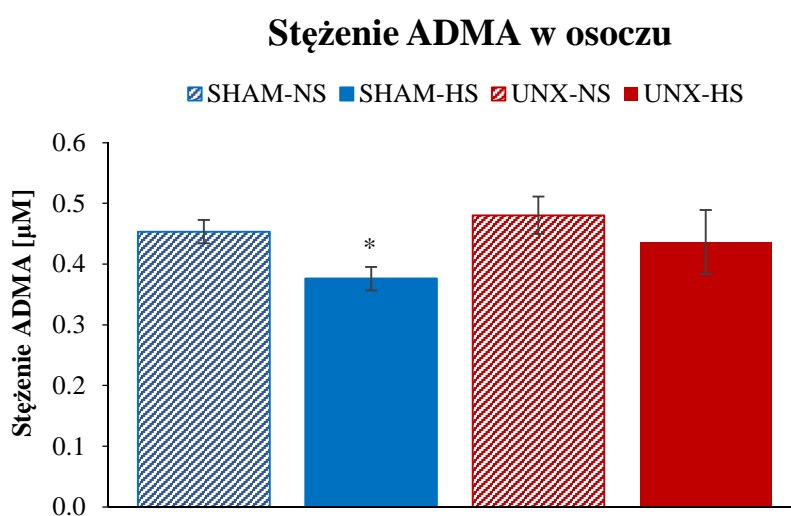
Podobnie, szczury na diecie wysokosodowej cechowały się niższym poziomem stężenia produktów rozkładu NO (azotynów) niż szczury na diecie standardowej, zarówno w przypadku grup z nefrektomią ( $124 \pm 9$  nM w grupie UNX-HS vs  $204 \pm 27$  nM w grupie UNX-NS;  $p < 0,01$ ), jak i nefrektomią pozorowaną ( $139 \pm 13$  nM w grupie UNX-HS vs  $210 \pm 11$  nM w grupie SHAM-HS;  $p < 0,05$ ; Ryc. 11).

Należy podkreślić, że sama nefrektomia, podobnie jak w przypadku Ang II, nie spowodowała zmiany stężenia azotynów w osoczu.



**Ryc. 11.** Porównanie stężenia produktów rozpadu NO (azotynów) w osoczu po 28 dniach diety wysokosodowej (HS) lub standardowej (NS) u zwierząt z nefrektomią (UNX) lub nefrektomią pozorowaną (SHAM). Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Symbole \* i # oznaczają  $p < 0,05$ ; \* vs SHAM-NS; # vs UNX-NS. Liczebność grup:  $n = 7$ .

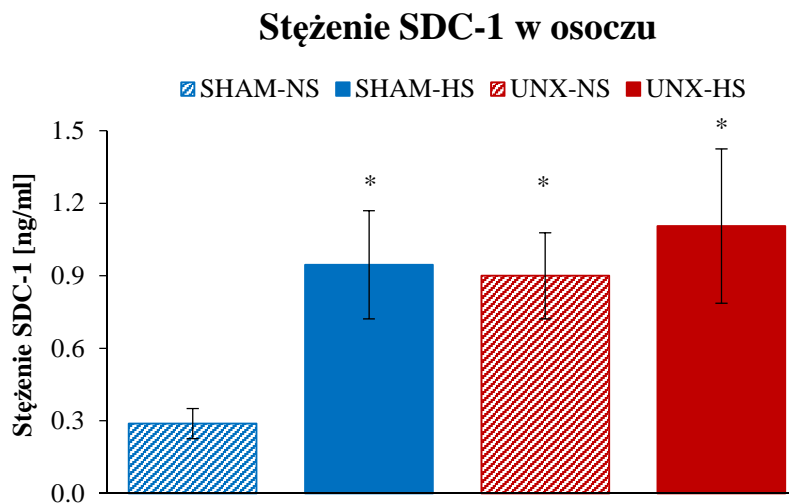
Stężenie endogennego inhibitora syntaz NO (ADMA) w osoczu po 28 dniach diety wysokosodowej było porównywalne w czterech badanych grupach zwierząt w testach wykonanych za pomocą analizy wariancji (Ryc. 12). Natomiast w teście t-Studenta, zastosowanym w celu odpowiedzi na pytanie czy dieta wysokosodowa *per se* wywiera wpływ na poziom ADMA w osoczu uzyskano wynik statystycznie istotny, wskazujący na to, że u zwierząt z pozorowaną nefrektomią 28-dniowa dieta wysokosodowa prowadzi do obniżenia stężenia ADMA w osoczu. W osoczu szczurów grupy SHAM-NS wynosiło ono  $0,45 \pm 0,02 \mu\text{M}$ , a w grupie SHAM-HS  $0,38 \pm 0,02 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ).



**Ryc. 12.** Porównanie stężenia endogennego inhibitora syntaz NO (ADMA) w osoczu po 28 dniach diety wysokosodowej (HS) lub standardowej (NS) u zwierząt z nefrektomią (UNX) lub nefrektomią pozorowaną (SHAM). Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. \* vs SHAM-NS,  $p < 0,05$ . Liczebność grup:  $n = 4$ .

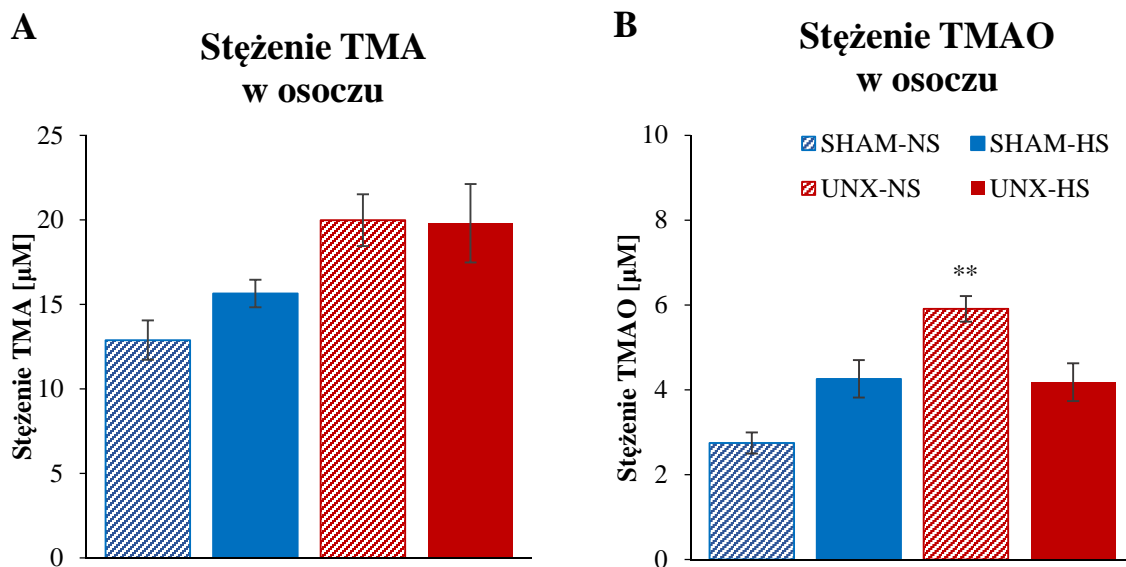
#### 4.3.2. Pomiar stężenia wybranych wskaźników uszkodzenia glikokaliksu i toksycznych metabolitów bakterii jelitowych

Stężenie syndekanu-1, wskaźnika uszkodzenia śródbłonkowej warstwy glikokaliksu, mierzone w osoczu po 28 dniach diety, było statystycznie istotnie wyższe we wszystkich grupach w porównaniu z grupą kontrolną SHAM-NS ( $p < 0,05$ ; Ryc. 13). W grupie szczurów SHAM-HS było ono ponad trzykrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej SHAM-NS ( $0,95 \pm 0,22$  ng/ml vs  $0,29 \pm 0,06$  ng/ml,  $p < 0,05$ ). Uwagę zwraca podobnie duży poziom tego wskaźnika w grupie kontrolnej UNX-NS ( $0,90 \pm 0,18$  ng/ml), sugerujący, że jednostronna nefrektomia przeprowadzona 4 tygodnie wcześniej naruszyła strukturę glikokaliksu.



**Ryc. 13.** Porównanie stężenia wskaźnika uszkodzenia glikokaliksu śródbłonka, syndekanu-1 (SDC-1) w osoczu po 28 dniach diety wysokosodowej (HS) lub standardowej (NS) u zwierząt z nefrektomią (UNX) lub nefrektomią pozorowaną (SHAM). Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Symbol \* oznacza  $p < 0,05$ . \* vs SHAM-NS. Liczebność grup: SHAM-NS, n = 9; SHAM-HS, n = 9; UNX-NS, n = 10; UNX-HS, n = 10.

Stężenie w osoczu trimetyloaminy (TMA), metabolitu bakterii jelitowych, będącej wskaźnikiem upośledzenia bariery jelito-krew, jakie może nastąpić w wyniku wysokiej podaży sodu w diecie, po 28 dniach doświadczenia było porównywalne w czterech badanych grupach, z wyraźną tendencją do wzrostu w grupie szczurów na diecie wysokosodowej z nefrektomią SHAM-HS (Ryc. 14A). Z kolei stężenie tlenu trimetyloaminy (TMAO), pochodnej TMA powstającej w wątrobie, było istotnie wyższe w grupie UNX-NS (grupa kontrolna 2) niż w grupie SHAM-NS (grupa kontrolna 1) oraz w pozostałych dwóch grupach, z tendencją do wzrostu w grupie szczurów na diecie wysokosodowej z nefrektomią pozorowaną SHAM-HS (Ryc. 14B), podobnie jak w przypadku TMA.



**Ryc. 14.** Zmiany stężenia trimetyloaminy (TMA) i tlenu trimetyloaminy (TMAO) w osoczu po 28 dniach diety wysokosodowej (HS) lub standardowej (NS) u zwierząt z nefrektomią (UNX) lub nefrektomią pozorowaną (SHAM). Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. \*\* vs SHAM-NS,  $p < 0,01$ . Liczebność grup:  $n = 4$ .



## 4.4. Odpowiedź zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym na przewlekłe podawanie enalaprilu lub chymostatyny

### 4.4.1. Zmiany masy ciała

Masa ciała zwierząt otrzymujących przez 14 dni enalapril lub chymostatynę pozostawała zbliżona do masy ciała zwierząt kontrolnych UNX-HS (Tab. 3).

**Tabela 3.** Przyrost masy ciała zwierząt poddawanych leczeniu enalaprilem (Enal) lub chymostatyną (Chym) podczas całego czasu trwania diety wysokosodowej (HS, 28 dni) oraz podczas okresu leczenia (dni 14-28).

Grupa	n	Przyrost masy ciała [g]	
		Dni 0-28	Dni 14-28
UNX-NS	20	107,3 ± 3,3	55,2 ± 2,0
UNX-HS	21	107,2 ± 4,8	51,0 ± 4,3
UNX-HS + Enal 5 mg/kg	7	99,9 ± 4,4	50,9 ± 4,6
UNX-HS + Enal 10 mg/kg	6	95,6 ± 8,0	34,1 ± 6,0
UNX-HS + Enal 20 mg/kg	7	100,1 ± 3,7	42,3 ± 3,7
UNX-HS + Chym 1 mg/kg	6	100,5 ± 3,0	40,0 ± 3,4
UNX-HS + Chym 2 mg/kg	6	101,0 ± 6,0	40,8 ± 5,4
UNX-HS + Chym 4 mg/kg	6	107,3 ± 3,3	50,0 ± 3,4

### 4.4.2. Zmiany ciśnienia tętniczego i stężenia sodu w osoczu

#### *Ciśnienie skurczowe (SBP)*

Podawanie enalaprilu w dawkach 5, 10 i 20 mg/kg nie powodowało obniżenia SBP względem dnia „14” (dzień rozpoczęcia leczenia). Przy dawce 5 mg/kg obserwowano dalszy wzrost SBP, a przy dawkach 10 i 20 mg/kg zahamowanie wzrostu (stabilizację wartości SBP). Podawanie enalaprilu w dawce 40 mg/kg przez 14 dni obniżało SBP o średnio  $15,9 \pm 4,0$  mmHg (dzień „28” vs „14”; Tab. 4, 6).

Podawanie chymostatyny w dawce 1 mg/kg nie powodowało obniżenia SBP względem dnia „14”. Po podaniu chymostatyny w dawce 2 mg/kg obserwowano trend spadkowy w SBP. Podawanie chymostatyny w dawkach 4 i 6 mg/kg powodowało istotne obniżenie SBP względem wartości w dniu „14” zarówno w dniu „21” (odpowiednio:  $-9,3 \pm 1,8$  i  $-13,9 \pm 3,6$  mmHg), jak i „28” (odpowiednio:  $-17,9 \pm 1,6$  i  $-17,8 \pm 1,5$  mmHg; Tab. 5, 6).

Ciśnienie skurczowe (SBP) było niższe u szczurów, którym podawano enalapril niż u szczurów UNX-HS w dniu „28” dla najniższej dawki (5 mg/kg), a dla trzech wyższych dawek w dniach „21” i „28”, jednakże nadal pozostawało wyższe niż u szczurów UNX-NS

(Tab. S2). Podobny efekt obserwowano u szczurów, które otrzymywały chymostatyną; SBP było u nich niższe niż u szczurów UNX-HS w dniu „28” dla najniższej dawki (1 mg/kg), a dla trzech wyższych dawek w dniach „21” i „28”, jednakże nadal pozostawało wyższe niż u szczurów UNX-NS (Tab. S2).

**Tabela 4.** Ciśnienie tętnicze krwi i stężenie jonów sodu w osoczu u szczurów otrzymujących enalapril w jednej z czterech dawek: 5, 10, 20 lub 40 mg/kg. Podawanie leku rozpoczynało się w dniu „14” po zakończeniu pomiarów ciśnienia i  $P_{Na}$ . SBP – ciśnienie skurczowe, DBP – ciśnienie rozkurczowe, MABP – ciśnienie średnie,  $P_{Na}$  – stężenie jonów sodu w osoczu, b. d. – brak danych. Wartości przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM; Jeden symbol (\*, #) oznacza  $p < 0,05$ ; dwa symbole (\*\*\*) oznaczają  $p < 0,01$ ; trzy symbole (\*\*\*) oznaczają  $p < 0,001$ , \* vs dzień „0”, # vs dzień „14”.

UNX-HS + Enal 5 mg/kg						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	7	122,3 $\pm$ 1,1	143,6 $\pm$ 1,2***	152,8 $\pm$ 0,5***	159,5 $\pm$ 1,2*** #	161,7 $\pm$ 0,8*** #
DBP [mmHg]	7	79,2 $\pm$ 0,7	86,8 $\pm$ 0,5***	90,8 $\pm$ 0,7***	89,7 $\pm$ 0,8***	87,6 $\pm$ 1,3**
MABP [mmHg]	7	93,6 $\pm$ 0,7	105,7 $\pm$ 0,7***	111,5 $\pm$ 0,4***	113,0 $\pm$ 0,4***	112,3 $\pm$ 0,8***
$P_{Na}$ [mM]	7	138,3 $\pm$ 1,7	137,8 $\pm$ 1,2	138,3 $\pm$ 1,5	138,4 $\pm$ 1,2	138,1 $\pm$ 0,9
UNX-HS + Enal 10 mg/kg						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	6	122,5 $\pm$ 1,3	140,5 $\pm$ 3,1**	152,7 $\pm$ 1,1***	156,1 $\pm$ 1,6***	155,4 $\pm$ 0,9***
DBP [mmHg]	6	80,5 $\pm$ 1,1	87,0 $\pm$ 0,7**	90,3 $\pm$ 1,1**	85,1 $\pm$ 1,2*	75,7 $\pm$ 1,1* #
MABP [mmHg]	6	94,5 $\pm$ 0,9	104,7 $\pm$ 1,0**	111,1 $\pm$ 1,0***	108,8 $\pm$ 1,0***	102,2 $\pm$ 0,9** #
$P_{Na}$ [mM]	6	137,8 $\pm$ 1,4	137,0 $\pm$ 1,0	137,7 $\pm$ 1,1	138,3 $\pm$ 0,9	137,8 $\pm$ 1,4
UNX-HS + Enal 20 mg/kg						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	7	123,9 $\pm$ 1,4	142,5 $\pm$ 1,2***	152,6 $\pm$ 0,8***	153,9 $\pm$ 1,3***	151,6 $\pm$ 1,2***
DBP [mmHg]	7	80,4 $\pm$ 0,7	87,3 $\pm$ 0,6***	91,2 $\pm$ 0,5***	83,9 $\pm$ 0,7*** #	75,3 $\pm$ 0,9*** #
MABP [mmHg]	7	94,9 $\pm$ 0,8	105,7 $\pm$ 0,7***	111,7 $\pm$ 0,4***	107,3 $\pm$ 0,6*** #	100,8 $\pm$ 0,7*** #
$P_{Na}$ [mM]	7	138,4 $\pm$ 1,0	137,9 $\pm$ 1,2	137,9 $\pm$ 1,1	138,0 $\pm$ 1,4	138,1 $\pm$ 1,1
UNX-HS + Enal 40 mg/kg						
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	6	140,8 $\pm$ 1,9	138,3 $\pm$ 7,5	157,0 $\pm$ 3,3**	148,5 $\pm$ 3,1	141,1 $\pm$ 1,9 #
DBP [mmHg]	6	99,8 $\pm$ 2,8	90,8 $\pm$ 3,5	96,6 $\pm$ 2,6	97,0 $\pm$ 3,4	91,3 $\pm$ 1,7*
MABP [mmHg]	6	113,3 $\pm$ 2,1	106,6 $\pm$ 3,0	116,7 $\pm$ 1,6	114,2 $\pm$ 2,7	107,9 $\pm$ 1,7 #
$P_{Na}$ [mM]	6	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.

**Tabela 5.** Ciśnienie tętnicze krwi i stężenie jonów sodu w osoczu u szczurów otrzymujących chymostatynę w jednej z czterech dawek: 1, 2, 4 lub 6 mg/kg. Podawanie chymostatyny rozpoczynało się w dniu „14” po zakończeniu pomiarów ciśnienia i P<sub>Na</sub>. SBP – ciśnienie skurczowe, DBP – ciśnienie rozkurczowe, MABP – ciśnienie średnie, P<sub>Na</sub> – stężenie jonów sodu w osoczu, b. d. – brak danych. Wartości przedstawiają średnią arytmetyczną ± SEM; Jeden symbol (\*, #) oznacza p < 0,05; dwa symbole (\*\*) oznaczają p < 0,01; trzy symbole (\*\*\*) oznaczają p < 0,001, \* vs dzień „0”, # vs dzień „14”.

		UNX-HS + Chym 1 mg/kg				
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	6	122,5 ± 0,7	141,4 ± 0,8***	152,9 ± 0,8***	159,3 ± 1,0*** #	155,4 ± 1,0***
DBP [mmHg]	6	77,8 ± 0,7	86,8 ± 0,5***	91,5 ± 0,5***	92,7 ± 0,8***	85,8 ± 0,5*** #
MABP [mmHg]	6	92,7 ± 0,6	105,0 ± 0,2***	112,0 ± 0,3***	114,9 ± 0,5*** #	109,0 ± 0,5*** #
P <sub>Na</sub> [mM]	6	137,9 ± 0,9	137,7 ± 1,0	138,3 ± 1,1	137,2 ± 0,7	137,4 ± 0,7
		UNX-HS + Chym 2 mg/kg				
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	6	122,5 ± 0,7	138,8 ± 0,7***	150,8 ± 0,9***	144,6 ± 3,6**	135,7 ± 4,5**
DBP [mmHg]	6	78,8 ± 0,8	88,6 ± 0,7***	91,9 ± 0,9***	89,8 ± 2,0**	69,6 ± 1,2** #
MABP [mmHg]	6	93,4 ± 0,6	105,3 ± 0,4***	111,5 ± 0,8***	108,1 ± 2,0**	91,6 ± 1,2 #
P <sub>Na</sub> [mM]	6	137,8 ± 0,6	137,7 ± 0,9	138,7 ± 0,9	137,9 ± 0,9	138,6 ± 1,0
		UNX-HS + Chym 4 mg/kg				
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	6	123,0 ± 0,4	142,1 ± 1,4***	152,1 ± 0,6***	142,8 ± 1,5*** #	134,2 ± 1,5** #
DBP [mmHg]	6	78,0 ± 0,7	88,9 ± 0,7***	92,5 ± 0,9***	85,7 ± 0,6*** #	70,6 ± 0,7** #
MABP [mmHg]	6	93,0 ± 0,5	106,6 ± 0,6***	112,3 ± 0,7***	104,9 ± 0,7*** #	91,6 ± 0,6 #
P <sub>Na</sub> [mM]	6	138,0 ± 1,0	137,8 ± 0,8	138,4 ± 1,0	138,5 ± 1,2	138,6 ± 0,8
		UNX-HS + Chym 6 mg/kg				
	n	0	7	14	21	28
SBP [mmHg]	4	130,2 ± 4,8	137,1 ± 2,6	154,5 ± 2,1**	140,8 ± 5,2 #	136,8 ± 2,1 #
DBP [mmHg]	4	86,5 ± 5,0	89,5 ± 1,3	105,6 ± 1,9*	93,3 ± 4,7 #	93,5 ± 2,3 #
MABP [mmHg]	4	101,2 ± 4,6	105,4 ± 1,1	121,9 ± 1,7*	109,2 ± 4,7 #	107,9 ± 2,0 #
P <sub>Na</sub> [mM]	4	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.

### Ciśnienie rozkurczowe (DBP)

Podawanie enalaprilu w dawkach 5 i 40 mg/kg nie powodowało obniżenia DBP względem dnia „14”. U szczurów przyjmujących dawkę 10 mg/kg obserwowano obniżenie DBP w dniu „28”, a u szczurów przyjmujących dawkę 20 mg/kg – w dniach „21” i „28”. Po czternastu dniach podawania enalaprilu w dawce 10 i 20 mg/kg obserwowano obniżenie DBP odpowiednio o  $14,6 \pm 2,0$  i  $16,0 \pm 1,2$  mmHg (Tab. 4, 6). Podawanie chymostatyny w dawkach 1 i 2 mg/kg powodowało obniżenie DBP w dniu „28”, zaś w dawkach 4 i 6 mg/kg – w dniach „21” i „28” (Tab. 5, 6).

Ciśnienie rozkurczowe (DBP) było niższe u szczurów, które otrzymywały enalapril niż u szczurów UNX-HS w dniach „21” i „28” dla dawek 5, 10 i 20 mg/kg (dla dawki 40 mg/kg tylko w dniu „28”), jednakże nadal pozostawało wyższe niż u szczurów UNX-NS (Tab. S3). Podobny efekt obserwowano u szczurów otrzymujących chymostatynę; DBP było u nich niższe niż u szczurów UNX-HS w dniach „21” i „28” dla wszystkich dawek, w tym dla dawek 1, 2, 4 mg/kg istotnie niższe (Tab. S3).

**Tabela 6.** Zmiana wielkości SBP i DBP u szczurów przyjmujących enalapril lub chymostatynę w czterech różnych dawkach. Porównanie efektu siedmiodniowego (kolumna: Dzień „21” vs „14”) i czternastodniowego (kolumna: Dzień „28” vs „14”) podawania inhibitorów.

Grupa	n	Zmiana SBP [mmHg]		Zmiana DBP [mmHg]	
		Dzień „21” vs „14”	Dzień „28” vs „14”	Dzień „21” vs „14”	Dzień „28” vs „14”
		UNX-HS	21	11,3 ± 2,0	13,5 ± 1,9
UNX-HS + Enal 5 mg/kg	7	6,7 ± 1,3	8,8 ± 1,2	-1,1 ± 1,1	-3,2 ± 1,5
UNX-HS + Enal 10 mg/kg	6	3,4 ± 1,7	2,7 ± 1,7	-5,2 ± 2,2	-14,6 ± 2,0
UNX-HS + Enal 20 mg/kg	7	1,1 ± 1,1	-2,0 ± 1,8	-7,3 ± 0,6	-15,9 ± 1,0
UNX-HS + Enal 40 mg/kg	6	-8,5 ± 5,7	-15,9 ± 4,0	0,4 ± 4,2	-5,3 ± 4,0
UNX-HS + Chym 1 mg/kg	6	6,4 ± 1,0	2,5 ± 1,0	1,1 ± 1,0	-5,7 ± 0,7
UNX-HS + Chym 2 mg/kg	6	-6,1 ± 3,2	-15,1 ± 4,3	-2,0 ± 2,7	-22,2 ± 1,9
UNX-HS + Chym 4 mg/kg	6	-9,3 ± 1,8	-17,9 ± 1,6	-6,7 ± 1,3	-21,8 ± 0,9
UNX-HS + Chym 6 mg/kg	4	-13,7 ± 3,6	-17,8 ± 1,5	-8,2 ± 3,7	-8,1 ± 2,6

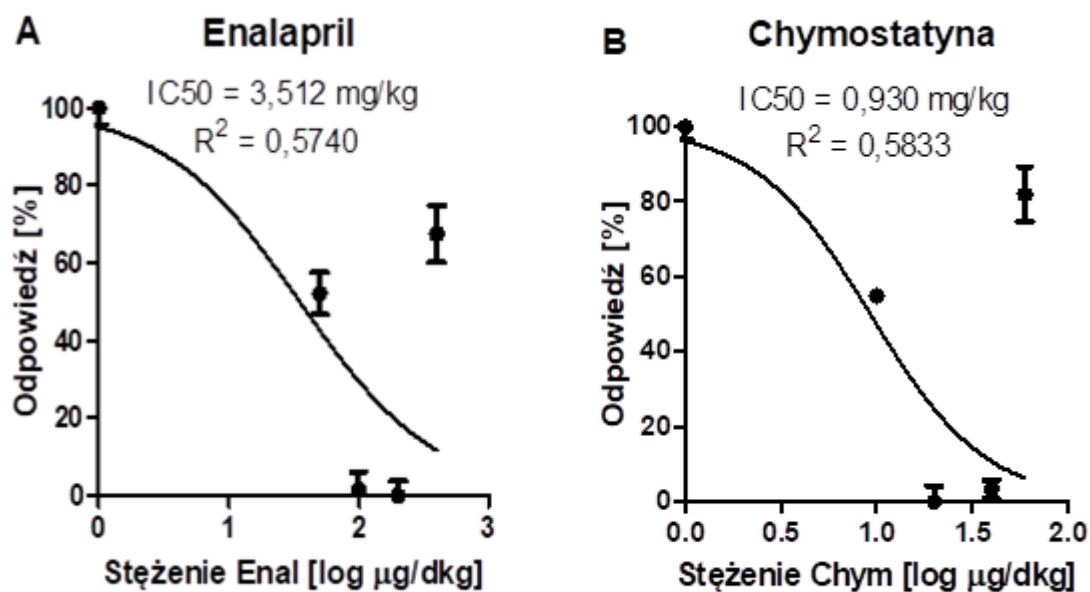
#### *Wpływ na stężenie jonów sodu w osoczu*

Zarówno podawanie enalaprilu, jak i chymostatyny, nie spowodowało zmian w stężeniu jonów sodu w osoczu. Wartość  $P_{Na}$  pozostawała stała przez czas prowadzenia doświadczenia i była porównywalna do wartości obserwowanych w grupie UNX-HS (Tab. 4, 6).

#### **4.4.3. Porównanie hipotensyjnej skuteczności enalaprilu i chymostatyny**

Skuteczność hipotensyjną oceniano przez wyznaczenie IC50 dla każdej substancji przy wykorzystaniu programu GraphPad Prism. Wykresy wygenerowane przez ten program przedstawia Ryc. 15. Ze względu na to, że na osi y przedstawione są logarytmy dziesiętne dawek, a jedna z dawek chymostatyny wynosiła 1,0 mg/kg (tzn. 0 po zlogarytmowaniu) trzeba było dokonać przeliczenia wszystkich dawek na  $\mu\text{g}/\text{dkg}$ . Program wygenerował wartości liczbowe IC50 w  $\mu\text{g}/\text{dkg}$  (Ryc. 15). Te wartości zostały przeliczone znowu, zgodnie z układem SI, na mg/kg.

Ostatecznie wartość IC50 wynosi 3,512 mg/kg dla enalaprilu oraz 0,930 mg/kg dla chymostatyny. To wskazuje na przewagę hipotensyjnej skuteczności chymostatyny nad enalaprilem w użytym modelu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego.

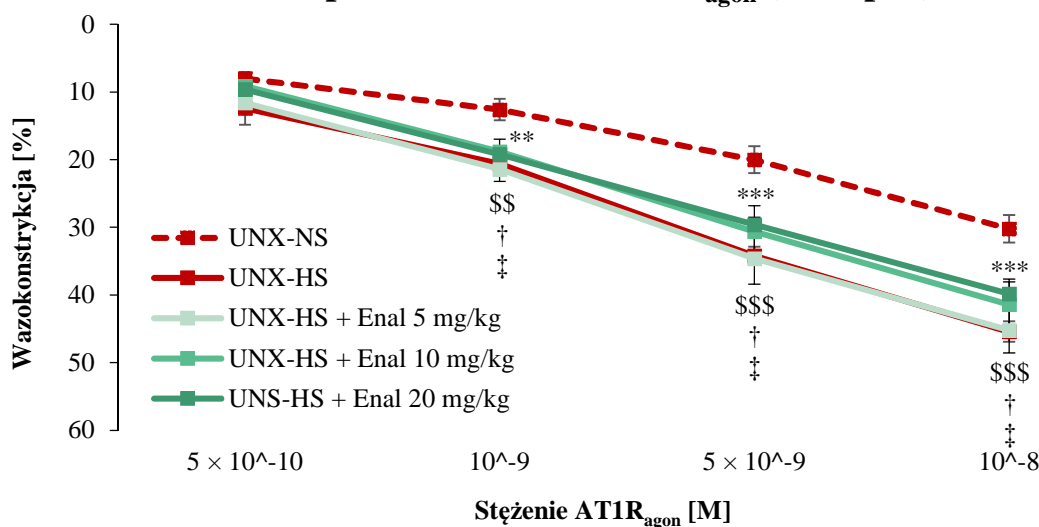
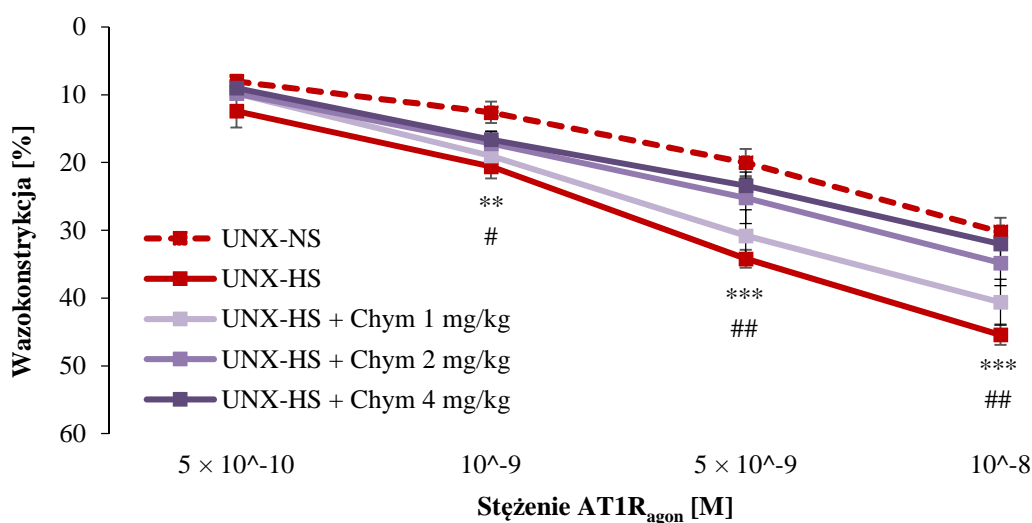


**Ryc. 15.** Krzywe zależności dawka-odpowiedź dla odpowiedzi ciśnienia rozkurczowego (DBP) na podawanie enalaprilu (A) lub chymostatyny (B), wygenerowane przez program GraphPad Prism. Krzywą sporządzono dla wartości DBP z 28 dnia doświadczenia. Liczebność zwierząt: enalapril,  $n = 26$ ; chymostatyna,  $n = 22$ .

#### 4.5. Wpływ enalaprilu i chymostatyny na reaktywność izolowanych naczyń krwionośnych w sodo-zależnym nadciśnieniu tętniczym

##### 4.5.1. Odpowiedź GMA na podanie naczyniokurczącego agonisty receptora AT1

W grupie szczurów UNX-HS otrzymujących enalapril nie zaobserwowano poprawy odpowiedzi na podanie  $AT1R_{agon}$  (Ryc. 16A). Natomiast w grupie UNX-HS otrzymującej chymostatynę odnotowano normalizację odpowiedzi GMA na podanie  $AT1R_{agon}$ . Normalizację tę obserwowano począwszy od dawki 2 mg/kg (Ryc. 16B).

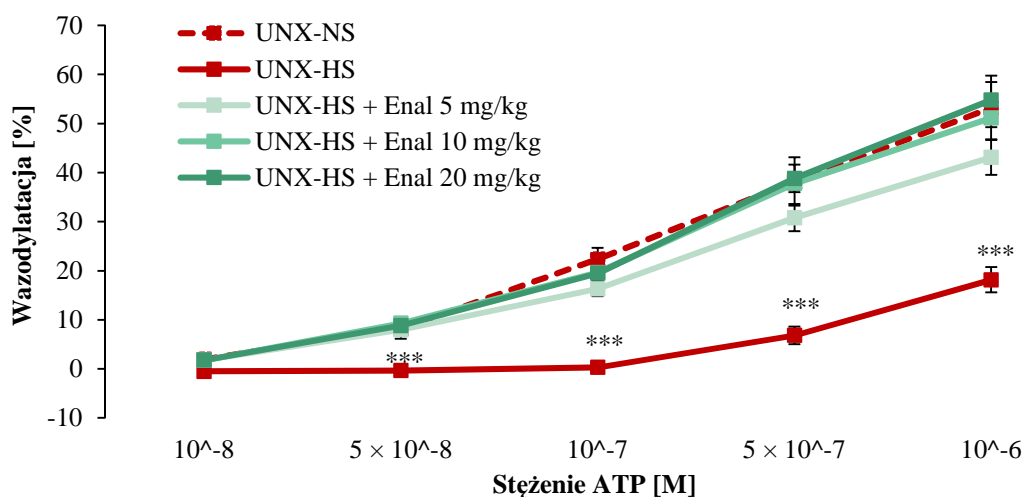
**A****Odpowiedź GMA na AT1R<sub>agon</sub> (enalapril)****B****Odpowiedź GMA na AT1R<sub>agon</sub> (chymostatyna)**

**Ryc. 16.** Odpowiedź GMA na podanie AT1R<sub>agon</sub> u zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym, którym podawano enalapril (A) lub chymostatynę (B) w trzech różnych dawkach. Krzywe przedstawiają średnią arytmetyczną ± SEM. Pojedynczy symbol (#, †, ‡) oznacza p < 0,05; podwójny symbol (\*\*, ##, \$\$\$) oznacza p < 0,01; potrójny symbol (\*\*\*, \$\$\$) oznacza p < 0,001. Wszystkie zaznaczone istotności są porównaniami z UNX-NS: \* UNX-HS; # UNX-HS+Chym 1 mg/kg; \$ UNX-HS+Enal 5 mg/kg; † UNX-HS+Enal 10 mg/kg; ‡ UNX-HS+Enal 20 mg/kg. Liczebność grup: n = 5.

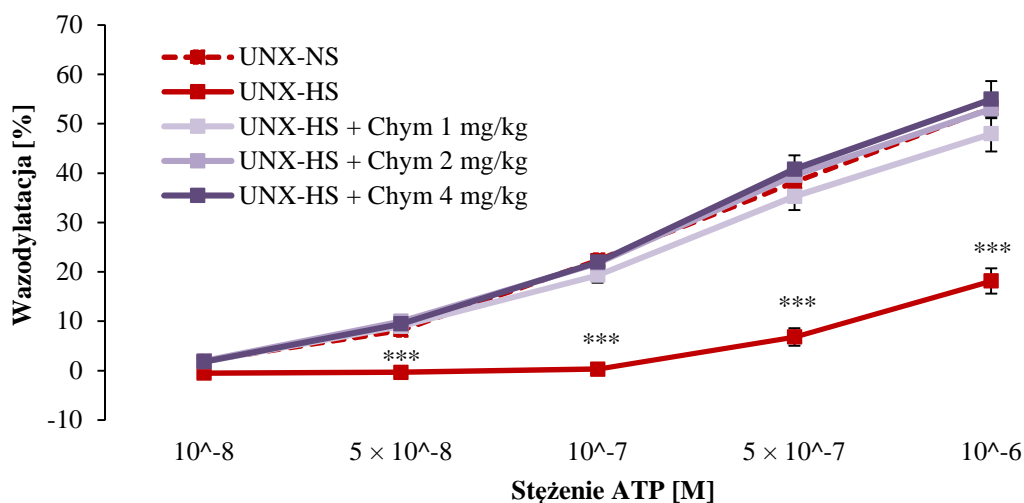
#### 4.5.2. Odpowiedź MCA na podanie śródbłonkozależnego naczyniorozszerzającego ATP

Odpowiedź MCA na podanie ATP została przywrócona zarówno u szczurów UNX-HS otrzymujących enalapril (Ryc. 17A), jak i chymostatynę (Ryc. 17B). Normalizację wykazano dla wszystkich zastosowanych dawek enalaprilu i chymostatyny (Ryc. 17).

##### A Odpowiedź MCA na ATP (enalapril)



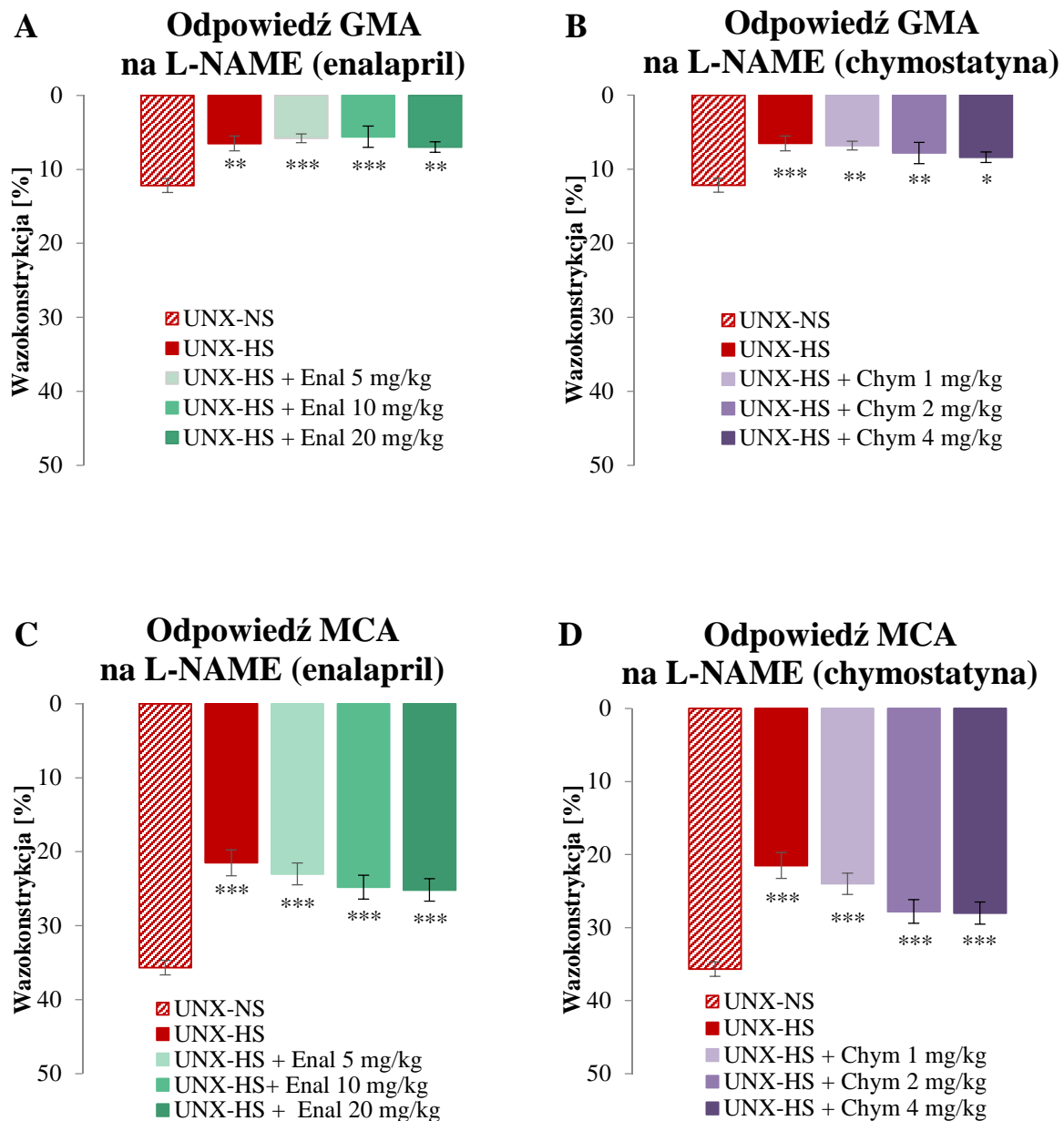
##### B Odpowiedź MCA na ATP (chymostatyna)



**Ryc. 17.** Odpowiedź MCA na podanie ATP u zwierząt z sodozależnym nadciśnieniem tętniczym leczonych enalaprilem (A) lub chymostatyną (B) w trzech różnych dawkach. Krzywe przedstawiają średnią arytmetyczną ± SEM. \*\*\*  $p < 0,001$ , UNX-HS vs UNX-NS. Liczebność grup:  $n = 5-6$ .

#### 4.5.3. Odpowiedź GMA i MCA na zablokowanie syntazy tlenu azotu

Czternastodniowe podawanie enalaprilu lub chymostatyny nie spowodowało poprawy odpowiedzi naczyń na zahamowanie syntezy NO przez L-NAME. Zarówno odpowiedź GMA, jak i MCA pozostawała zmniejszona względem odpowiedzi naczyń pobranych z grupy UNX-NS (Ryc. 18).



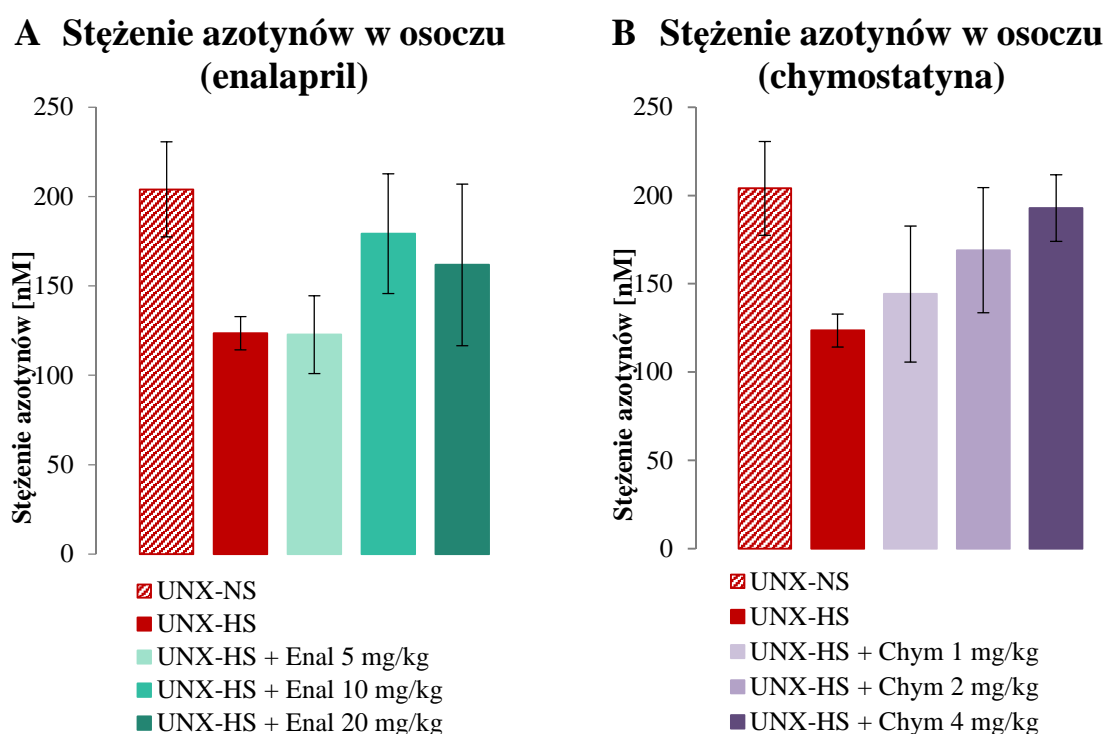
**Ryc. 18.** Odpowiedź tętnic GMA (A,B) i MCA (C,D) na podanie inhibitora syntazy tlenu azotu L-NAME u zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym leczonych enalaprilem (A,C) lub chymostatyną (B,D) podawanych w trzech różnych dawkach. Krzywe przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,0$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , vs UNX-NS. Liczebność grup:  $n = 5-6$ .



## 4.6. Analiza osocza zwierząt z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym otrzymujących enalapril lub chymostatynę

### 4.6.1. Pomiar stężenia metabolitów NO

Pomiar stężenia metabolitów NO w osoczu po 28 dniach diety u zwierząt, którym podawano enalapril lub chymostatynę nie wykazał statystycznie istotnych różnic między grupami (Ryc. 19).



**Ryc. 19.** Porównanie stężenia azotynów w osoczu u zwierząt leczonych enalapilem (A) lub chymostatyną (B). Słupki przedstawiają średnią arytmetyczną  $\pm$  SEM. Liczebność grup: UNX-NS, UNX-HS  $n = 7$ , UNX-HS+Chym 1 mg/kg, UNX-HS+Chym 2 mg/kg, UNX-HS+Chym 4 mg/kg, UNX-HS+Enal 5 mg/kg, UNX-HS+Enal 10 mg/kg, UNX-HS+Enal 20 mg/kg  $n = 5$ .

## 4.7. Supplement

W suplemencie zgromadzono porównania statystyczne opisujące rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego oraz efektywność enalaprilu i chymostatyny w obniżaniu ciśnienia krwi.

**Tabela S1.** Wartości prawdopodobieństwa  $p$  dla porównań ciśnienia tętniczego krwi (SBP, DBP, MABP) dla szczurów na diecie standardowej (NS) lub wysokosodowej (HS) z nefrektomią (UNX) lub nefrektomią pozorowaną (SHAM) w kolejnych dniach trwania doświadczenia chronicznego. Mann-Whitney. Wartości  $p < 0,05$  pogrubiono.

SBP	Dzień doświadczenia				
	0	7	14	21	28
SHAM-NS vs SHAM-HS	0,4977	0,8396	0,5070	0,1621	0,2710
SHAM-NS vs UNX-NS	0,5283	0,8794	0,8001	0,1064	0,1551
SHAM-HS vs UNX-NS	0,8312	0,9126	0,5653	0,9539	0,9126
SHAM-NS vs UNX-HS	0,9944	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
SHAM-HS vs UNX-HS	0,2631	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-NS vs UNX-HS	0,2353	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

DBP	Dzień doświadczenia				
	0	7	14	21	28
SHAM-NS vs SHAM-HS	0,2584	0,8943	0,8070	0,6004	0,7426
SHAM-NS vs UNX-NS	0,9827	0,2476	0,1311	0,5386	0,9481
SHAM-HS vs UNX-NS	0,1227	0,2730	0,0964	0,2969	0,5564
SHAM-NS vs UNX-HS	0,5912	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
SHAM-HS vs UNX-HS	0,4653	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-NS vs UNX-HS	0,7617	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

MABP	Dzień doświadczenia				
	0	7	14	21	28
SHAM-NS vs SHAM-HS	0,1224	0,1224	0,4713	0,4798	0,7639
SHAM-NS vs UNX-NS	0,4131	0,6384	0,3727	0,8002	0,9712
SHAM-HS vs UNX-NS	0,2560	0,5912	0,1874	0,4339	>0,9999
SHAM-NS vs UNX-HS	0,4140	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
SHAM-HS vs UNX-HS	0,2847	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-NS vs UNX-HS	0,6938	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

**Tabela S2.** Wartości prawdopodobieństwa  $p$  dla porównań ciśnienia skurczowego (SBP) szczurów otrzymujących enalapril lub chymostatynę w jednej z czterech dawek z grupami UNX-NS i UNX-HS w kolejnych dniach trwania doświadczenia chronicznego. Mann-Whitney. Wartości  $p < 0,05$  pogrubiono.

SBP (Enalapril) vs UNX-NS	Dzień doświadczenia				
	0	7	14	21	28
UNX-HS + Enal 5 mg/kg	<b>0,0270</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-HS + Enal 10 mg/kg	0,0548	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-HS + Enal 20 mg/kg	0,3473	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-HS + Enal 40 mg/kg	<b>&lt;0,0001</b>	0,1520	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

SBP (Enalapril) vs UNX-HS	Dzień doświadczenia				
	0	7	14	21	28
UNX-HS + Enal 5 mg/kg	0,2897	0,1756	0,9484	0,0979	<b>0,0375</b>
UNX-HS + Enal 10 mg/kg	0,3092	0,9653	0,8761	<b>0,0012</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-HS + Enal 20 mg/kg	0,6310	0,2659	0,9280	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
UNX-HS + Enal 40 mg/kg	<b>&lt;0,0001</b>	0,1281	0,1796	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0001</b>

<b>SBP (Chymostatyna) vs UNX-NS</b>	<b>Dzień doświadczenia</b>				
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
UNX-HS + Chym 1 mg/kg	0,0598	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
UNX-HS + Chym 2 mg/kg	0,0795	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0854
UNX-HS + Chym 4 mg/kg	0,1182	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<b>0,0018</b>
UNX-HS + Chym 6 mg/kg	0,3973	<b>0,0013</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0003</b>

<b>SBP (Chymostatyna) vs UNX-HS</b>	<b>Dzień doświadczenia</b>				
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
UNX-HS + Chym 1 mg/kg	0,3095	0,7431	0,7657	0,0825	<0,0001
UNX-HS + Chym 2 mg/kg	0,2215	0,3518	0,6593	<0,0001	<0,0001
UNX-HS + Chym 4 mg/kg	0,3379	0,467	0,8311	<0,0001	<0,0001
UNX-HS + Chym 6 mg/kg	0,2577	0,2692	0,5809	<b>0,0003</b>	<b>0,0002</b>

**Tabela S3.** Wartości prawdopodobieństwa  $p$  dla porównań ciśnienia rozkurczowego (DBP) szczurów otrzymujących enalapril lub chymostatynę w jednej z czterech dawek z grupami UNX-NS i UNX-HS w kolejnych dniach trwania doświadczenia chronicznego. Mann-Whitney. Wartości  $p < 0,05$  pogrubiono.

<b>DBP (Enalapril) vs UNX-NS</b>	<b>Dzień doświadczenia</b>				
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
UNX-HS + Enal 5 mg/kg	0,5991	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<b>0,0004</b>
UNX-HS + Enal 10 mg/kg	0,5251	<0,0001	<0,0001	<b>0,0027</b>	<b>0,0004</b>
UNX-HS + Enal 20 mg/kg	0,5598	<0,0001	<0,0001	<b>0,0020</b>	<0,0001
UNX-HS + Enal 40 mg/kg	<0,0001	<b>0,0036</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001

<b>DBP (Enalapril) vs UNX-HS</b>	<b>Dzień doświadczenia</b>				
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
UNX-HS + Enal 5 mg/kg	0,3017	0,3135	0,4580	<b>0,0002</b>	<0,0001
UNX-HS + Enal 10 mg/kg	0,9435	0,3987	0,2816	<0,0001	<0,0001
UNX-HS + Enal 20 mg/kg	0,8256	0,5407	0,4731	<0,0001	<0,0001
UNX-HS + Enal 40 mg/kg	<0,0001	0,4490	0,1996	0,8093	<b>0,0006</b>

<b>DBP (Chymostatyna) vs UNX-NS</b>	<b>Dzień doświadczenia</b>				
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
UNX-HS + Chym 1 mg/kg	0,1191	<b>0,0001</b>	<0,0001	<0,0001	<b>0,0001</b>
UNX-HS + Chym 2 mg/kg	0,5829	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
UNX-HS + Chym 4 mg/kg	0,2016	<0,0001	<0,0001	<b>0,0002</b>	<0,0001
UNX-HS + Chym 6 mg/kg	0,1543	<b>0,0004</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0002</b>

<b>DBP (Chymostatyna) vs UNX-HS</b>	<b>Dzień doświadczenia</b>				
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>
UNX-HS + Chym 1 mg/kg	0,0627	0,3391	0,7435	<b>0,0063</b>	<0,0001
UNX-HS + Chym 2 mg/kg	0,3526	0,8536	0,9887	<b>0,0097</b>	<0,0001
UNX-HS + Chym 4 mg/kg	0,1279	0,618	0,8313	<b>0,0002</b>	<0,0001
UNX-HS + Chym 6 mg/kg	0,2379	0,5324	<b>0,0018</b>	0,6832	0,0556

## 5. Podsumowanie wyników

Wyniki badań przeprowadzonych w tym projekcie wykazały, że dwudziesto- ośmiodniowa dieta wysokosodowa (4% Na, w/w), nawet jeżeli nie towarzyszy jej sodo-zależne nadciśnienie tętnicze, wiąże się z wystąpieniem niekorzystnych zmian w reaktywności naczyń decydujących o oporze obwodowym oraz prowadzi do uogólnionej dysfunkcji śródbłonna:

1. U zwierząt z wysoką podażą sodu w diecie obserwowano zwiększenie wrażliwości tętnicy zaopatrującej mięsień smukły (GMA) na substancje naczyniokurczące: agonistę AT1R (Ryc. 6A) oraz na wysokie dawki endoteliny-1 (Ryc. 6B). Odpowiedź GMA na substancję naczyniorozszerzającą zależną od śródbłonna, ACh, była zachowana (Ryc. 8A).
2. Odpowiedź na podanie L-NAME była ograniczona zarówno w przypadku GMA, jak i MCA u zwierząt z wysoką podażą sodu w diecie (Ryc. 9), co wskazuje na uogólnioną dysfunkcję śródbłonna. Wysoka podaż sodu w diecie wiązała się także z obniżonym stężeniem azotynów (Ryc. 11), i ADMA (Ryc. 12) oraz z podwyższonym stężeniem wskaźnika uszkodzenia glikokaliksu śródbłonna SDC-1 (Ryc. 13) w osoczu.

Powyższe obserwacje pochodzą z doświadczeń na zwierzętach na diecie wysokosodowej bez nadciśnienia, tj. szczurów SHAM-HS – pomimo że stężenie jonów sodowych w osoczu tych zwierząt pozostawało w granicach fizjologicznych (Tab. 2).

Jeżeli dieta wysokosodowa prowadziła do rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego (grupa UNX-HS), zaobserwowano kolejne niekorzystne efekty:

3. Zwiększenie wrażliwości GMA także na niskie dawki naczyniokurczącej endoteliny-1 (Ryc. 6B).
4. Zmniejszenie odpowiedzi MCA na śródbłonkozależny, naczyniorozszerzający ATP (Ryc. 8B).

Podawanie szczurom z sodozależnym nadciśnieniem tętniczym przez 14 dni inhibitorów osoczkowego lub tkankowego układu renina-angiotensyna (odpowiednio: enalaprilu i chymostatyny) prowadziło do obniżenia zarówno ciśnienia skurczowego, jak i rozkurczowego. Efekt hipotensyjny zależał od dawki inhibitora i od ciśnienia; na ogół ciśnienie rozkurczowe odpowiadało większym spadkiem niż ciśnienie skurczowe.

5. **Enalapril** podawany w dawce 40 mg/kg powodował obniżenie ciśnienia skurczowego (SBP) średnio o  $-15,9 \pm 4,0$  mmHg (Tab. 4, 6), niższe dawki były nieskuteczne. Nawet przy dawce 40 mg/kg podawanej przez 14 dni wielkość SBP, mimo redukcji, pozostawała wyższa niż u szczurów UNX-NS (Tab. S2).
6. **Chymostatyna** obniżała SBP począwszy od dawki 4 mg/kg (dawki 1 i 2 mg/kg były nieskuteczne). Po zastosowaniu chymostatyny w dawkach 4 i 6 mg/kg, po 14 dniach terapii, odnotowano spadek SBP odpowiednio o  $-17,9 \pm 1,6$  i  $-17,8 \pm 1,5$  mmHg (Tab. 5, 6), ale, mimo redukcji, wielkość SBP pozostawała wyższa niż u szczurów UNX-NS (Tab. S2).
7. Ciśnienie rozkurczowe DBP było bardziej wrażliwe niż ciśnienie SBP na podawanie zarówno enalaprilu, jak i chymostatyny (tzn. obniżenie DBP występowało przy niższych dawkach obu inhibitorów niż obniżenie SBP). Efekt obniżenia DBP osiągnęto po czternastu dniach podawania enalaprilu w dawce 10 mg/kg ( $-14,6 \pm 2,0$  mmHg) i po takim samym czasie podawania chymostatyny w dawce 1 mg/kg ( $-5,7 \pm 0,7$  mmHg; Tab. 4, 5, 6).
8. Dawka IC50 dla odpowiedzi DBP na leczenie hipotensyjne wynosi 3,512 mg/kg dla enalaprilu i 0,930 mg/kg dla chymostatyny (Ryc. 15).

Podawanie enalaprilu lub chymostatyny szczurom z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym prowadziło do korzystnych zmian reaktywności badanych naczyń:

9. **Enalapril** przywrócił odpowiedź MCA na ATP (Ryc. 17A), chociaż nie poprawił odpowiedzi GMA na agonistę receptora AT1 (Ryc. 16A). Efekt widoczny był już przy zastosowaniu najmniejszej badanej dawki, 5 mg/kg.
10. **Chymostatyna** prowadziło do normalizacji obu odpowiedzi: zarówno GMA na substancję naczyniokurczącą (AT1R<sub>agon</sub>; Ryc. 16B), jak i MCA na substancję naczyniorozszerzającą (ATP; Ryc. 17B). Normalizację odpowiedzi GMA na bodziec naczyniokurczący obserwowano począwszy od dawki 2 mg/kg, a odpowiedzi MCA na bodziec naczyniorozszerzający – począwszy od dawki 1 mg/kg.
11. Ani enalapril, ani chymostatyna nie poprawiły odpowiedzi badanych naczyń na podanie L-NAME (Ryc. 18).

Podsumowane w tym rozdziale najważniejsze wyniki wskazują, że podwyższona podaż sodu w diecie prowadzi do dysfunkcji śródbłonna oraz do zmian czynnościowych w obwodowych naczyniach oporowych, które zwiększają nie tylko ryzyko rozwoju nadciśnienia, ale także

ryzyko wystąpienia zaburzeń poznawczych i udaru mózgu. W rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego biorą udział oba układy renina-angiotensyna, osoczowy i tkankowy. Co więcej, blokowanie tkankowego układu renina-angiotensyna wydaje się być bardziej skuteczne w leczeniu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego niż blokowanie osoczowego układu RAS.

## 6. Dyskusja

### 6.1. Model badawczy

Oba naczynia wybrane do tego projektu są naczyniami oporowymi, ale pełnią w układzie krążenia odmienne funkcje. Tętnica zaopatrująca w krew mięsień smukły jest naczyniem mającym wpływ na TPR; zaburzenia funkcji takich naczyń mogą prowadzić do rozwoju nadciśnienia. Z kolei MCA, choć jest naczyniem oporowym o charakterze lokalnym, odgrywa niezwykle ważną rolę; uczestniczy nie tylko w kształtowaniu oporu przepływu w krążeniu mózgowym, ale także w dystrybucji krwi docierającej do mózgu, stosownie do zapotrzebowania aktywnych okolic mózgu. Biorąc pod uwagę fakt, że dieta wysokosodowa stanowi czynnik ryzyka powstania zaburzeń poznawczych i udaru mózgu, wybór tego naczynia do badania naczyniowych konsekwencji diety wysokosodowej jest ze wszelkich miar uzasadniony.

Komentarza wymaga też metodyka badań czynnościowych w arteriografii. Obie tętnice były poddane działaniu stosowanego ciśnienia hydrostatycznego, na którym nabierały napięcia miogenne, ale tętnica mózgowa była perfundowana, a tętnica obwodowa nie. W obu przypadkach zachowane były standardy metodyczne [Csato *i wsp.*, 2014, Aleksandrowicz *i wsp.*, 2017]. GMA nie była perfundowana, ponieważ podczas perfuzji traciła napięcie i trudno było zachować stan równowagi tego naczynia. Alternatywą było dodanie substancji naczyniokurczącej do buforu wypełniającego wannę arteriografu (często w tym celu używane są małe stężenia fenylefryny), ale taki zabieg zakłócałby przebieg doświadczenia i uniemożliwił porównanie obu badanych naczyń.

Należy także podkreślić, że w badaniach reaktywności GMA i MCA na aktywację receptora angiotensyny II wybrano selektywnego agonistę receptora AT1R. Wiadomo, że Ang II posiada także receptor AT2, którego pobudzenie wywołuje efekty przeciwstawne do tych wywołanych pobudzeniem AT1R. Innymi słowy, pobudzenie AT1R prowadzi do skurczu, a pobudzenie AT2R do rozkurczu naczyń [Matrougui *i wsp.*, 1999]. Użycie w badaniach reaktywności naczyń angiotensyny II, która jest agonistą obu tych receptorów, utrudniałoby interpretację wyników.

Ciekawe, że u szczurów SD na diecie wysokosodowej dochodzi do zmniejszenia ilości mRNA i ilości białka receptorów AT2R w naczyniach krezki [Gonzalez *i wsp.*, 2005].

## 6.2. Jony sodu jako niezależny czynnik ryzyka uszkodzenia naczyń

Uzyskane przez nas wyniki pokazują, że dwudziestoosmiodniowa dieta wysokosodowa stanowi niezależny czynnik ryzyka uszkodzenia naczyń. Mimo, że ciśnienie tętnicze w grupie SHAM-HS utrzymywało się na prawidłowym poziomie (Tab. 2), obserwowano dysfunkcję śródbłonna (Ryc.13), potwierdzoną obniżeniem stężenia metabolitów NO w osoczu (Ryc. 11). Dysfunkcja śródbłonna może być sama w sobie podstawą do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Wykazano to nie tylko w badaniach doświadczalnych, ale także u ludzi [Ghiadoni *i wsp.*, 2012, Dinh *i wsp.*, 2014]. Ponadto, GMA, tętnica reprezentująca naczynia decydujące o oporze obwodowym, odpowiadała większym skurczem na substancje naczyniokurczące: agonistę AT1R (Ryc. 6A) oraz na wysokie dawki ET-1 (Ryc. 6B). Podobnych zmian wrażliwości na substancje naczyniokurczące nie obserwowano w tętnicy środkowej mózgu, naczyniu oporowym o znaczeniu lokalnym (MCA, Ryc. 7), ale wykazana dysfunkcja śródbłonna MCA jest też poważnym zaburzeniem funkcji tego naczynia i może być przyczyną deficytów poznawczych i udaru mózgu [Cosentino *i wsp.*, 2001, Martins-Filho *i wsp.*, 2020]. Tak więc, przeprowadzone przez nas badania wskazują, że dieta wysokosodowa jest niezależnym czynnikiem uszkodzenia naczyń krwionośnych.

### 6.2.1. Zwiększenie wrażliwości GMA na związki naczyniokurczące u zwierząt na diecie wysokosodowej

Skurcz GMA u szczurów normotensyjnych na diecie wysokosodowej obserwowany w odpowiedzi na stymulację receptora AT1 dla angiotensyny II był istotnie większy w porównaniu do obserwowanego w grupie na diecie standardowej. Zjawisko zmiany wrażliwości naczyń na Ang II w zależności od podaży sodu w diecie jest opisywane w piśmiennictwie. Skurcz naczyń po podaniu Ang II zmniejsza się na diecie niskosodowej, a rośnie wraz ze wzrostem podaży sodu w diecie [Aguilera i Catt, 1981]. Najprawdopodobniej przyczyną zwiększonej odpowiedzi GMA szczurów SHAM-HS na pobudzenie receptora AT1R w naszych badaniach jest, opisywane w piśmiennictwie, zwiększenie ekspresji tego receptora w naczyniach oporowych. Opisywano to zjawisko zarówno u szczurów stada Wistar jak i szczurów SD utrzymywanych na diecie wysokosodowej [Nickenig *i wsp.*, 1998, Wang i Du, 1998]. W efekcie zwiększonej ekspresji receptora, taka sama dawka Ang II powoduje zwiększone uwalnianie wapnia do cytozolu w komórkach mięśniówki gładkiej w porównaniu z grupą kontrolną, utrzymywaną na diecie standardowej [Nickenig *i wsp.*, 1998]. Najprawdopodobniej takie zmiany w ekspresji AT1R są mechanizmem równoważącym zmiany stężenia Ang II, które obniża się na diecie HS, jak to ma miejsce także w przypadku



doświadczeń omawianych w tej rozprawie (Ryc. 10). Jest to znany mechanizm regulacji receptorów w górę (ang. *receptors upregulation*) [Henriksson i wsp., 2003].

Wzmoczoną odpowiedź na podanie agonisty AT1R i ET-1 obserwowano jedynie w przypadku GMA, lecz nie MCA (Ryc. 6, 7). Prawdopodobnie jest to związane z różną gęstością receptorów dla tych substancji w GMA i MCA. Wiadomo, że dieta wysokosodowa, jak wspomniano wyżej, zwiększa gęstość receptorów AT1R w obwodowych naczyniach oporowych. W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji na temat naczyń krążenia mózgowego w tym aspekcie.

### **6.2.2. Diecie wysokosodowej nie towarzyszy wzrost stężenia sodu w osoczu**

U szczurów z wysoką podażą sodu w diecie nie obserwowano zwiększonego stężenia sodu w osoczu ( $P_{Na}$ ) przez cały czas trwania diety (Tab. 2). Prawdopodobnie było to efektem zachowania mechanizmów diurezy i natriurezy z nadciśnienia i/lub działania peptydów natriuretycznych. W mechanizmach tych duża dawka sodu, przyjęta z pokarmu do krążenia przez wchłanianie jelitowe, powoduje wzrost objętości osocza. Prawidłową odpowiedzią naczyń na to zjawisko jest skurcz, co powoduje chwilowy wzrost ciśnienia tętniczego, który aktywuje kaskadę zjawisk fizycznych, prowadzących do zwiększenia filtracji w nerkach, a przez to zwiększenia tempa wydalania wody (diureza) i sodu (natriureza) z moczem. Dodatkowo zwiększona objętość osocza zwiększa stopień rozciągnięcia przedsionków serca, co prowadzi do uwalniania ANP – przedsionkowego peptydu natriuretycznego, hamującego proces wchłaniania sodu w kanalikach nerkowych, a przez to także zwiększenie diurezy i natriurezy. W efekcie ustrój utrzymuje równowagę płynów przez usunięcie nadmiaru jonów sodowych z moczem. Rzeczywiście, dieta HS powodowała zwiększenie zarówno diurezy, jak i natriurezy (Ryc. 5BC). Jeżeli zwiększone wydalanie sodu wynikało rzeczywiście z mechanizmu natriurezy z nadciśnienia, wymagane jest utrzymanie wrażliwości naczyń oporowych na substancje naczyniokurczące (to zwiększenie oporu naczyniowego wyzwała wzrost natriurezy). Naczynie GMA jest przykładem naczynia oporowego łożyska mięśni szkieletowych, które stanowią do 50% masy ciała, a więc opór ich łożyska jest decydujący dla oporu ogólnego. Można więc postawić pytanie, czy wzrost wrażliwości na substancje naczyniokurczące, obserwowany w naczyniu GMA, nie jest elementem ułatwiającym długotrwałe utrzymanie wysokiej natriurezy. Wzrost wrażliwości naczyń obwodowych na substancje naczyniokurczące byłby w takim przypadku kosztem ponoszonym przez ustrój, dzięki któremu zachowana jest równowaga w składzie jonowym płynów ustrojowych.

### **6.2.3. Obniżenie biodostępności NO u zwierząt na diecie wysokosodowej a odpowiedź tętnic oporowych na śródbłonkozależne substancje naczyniorozszerzające**

U zwierząt z wysoką podażą sodu w diecie (grupy SHAM-HS i UNX-HS) zaobserwowano obniżenie odpowiedzi naczyń, zarówno GMA, jak i MCA, na blokowanie syntezy NO przez L-NAME (Ryc. 9). Na potwierdzenie, że mamy do czynienia z dysfunkcją śródbłonka, w tych samych grupach stężenie metabolitów NO w osoczu było niższe niż u zwierząt na diecie standardowej (Ryc. 11), a stężenie markera uszkodzenia śródbłonka SDC-1 było odpowiednio wyższe (Ryc. 12).

Tlenek azotu wytwarzany jest w śródbłonku naczyń tonicznie, zapewniając stałe hamowanie tonicznego adrenergicznego napięcia neurogennego. Blokowanie śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, eNOS, za pomocą L-NAME umożliwia określenie w jakim stopniu spoczynkowe napięcie naczyń jest zależne od podstawowego wydzielania NO. Ponieważ w obu grupach zwierząt na diecie HS obserwowano obniżoną odpowiedź naczyń na L-NAME (Ryc. 9) wnioskować można, że wyjściowy stan napięcia tych naczyń jest zależny od NO w mniejszym stopniu niż naczyń zwierząt na diecie NS. Wynik ten potwierdza pomiar metabolitów NO w osoczu (NO jest niestabilnym wysoce reaktywnym wolnym rodnikiem, stąd nie jest oznaczany bezpośrednio; Ryc. 11), który wskazuje na obniżoną biodostępność NO na poziomie ogólnoustrojowym. Ponieważ wiele substancji naczyniorozszerzających działa za pośrednictwem tlenu azotu wydzielanego z komórek śródbłonka (ACh, bradykinina, ATP), upośledzenie możliwości wydzielania NO we właściwych ilościach przez komórki śródbłonka jest jednym z najważniejszych przejawów jego dysfunkcji [Querio *i wsp.*, 2023].

Istnieje wiele doniesień potwierdzających obserwację, że sama dieta wysokosodowa współwystępuje z obniżeniem biodostępności NO. Co więcej, to obniżenie jest niezależne od wartości ciśnienia krwi tętniczej [Dishy *i wsp.*, 2003] i może wystąpić nawet przy niewielkim wzroście  $P_{Na}$  [Oberleithner *i wsp.*, 2011]. Obniżenie biodostępności NO uznawane jest za fundamentalny czynnik rozwoju sodowrażliwości [Kopkan *i wsp.*, 2010]. Sugeruje się, że pacjenci sodowrażliwi są bardziej wrażliwi na obniżenie biodostępności NO w wyniku diety wysokosodowej niż pacjenci sodooporni [Dishy *i wsp.*, 2003]. Biodostępność NO zależna jest przede wszystkim od tempa jego syntezy przez eNOS oraz tempa jego zużywania.

Aktywność eNOS powiązana jest ze zdolnością reagowania śródbłonka na naprężenie ścinające, tj. deformację ściany naczynia powstałą w efekcie przepływu krwi. Dieta HS obniża naczyniorozszerzającą odpowiedź na naprężenie ścinające [Matrougui *i wsp.*, 1998]. Mechanizm wykrywania naprężenia ścinającego przez śródbłonek zależny jest od białek

glikokaliksu, przede wszystkim syndekanu-1 (SDC-1), którego cząsteczka jest białkiem przezbłonowym. Jej domena zewnątrzkomórkowa wykrywa różnorakie sygnały, w tym naprężenie ścinające, a następnie przenosi je na domenę wewnątrzkomórkową, przez co komórka może odpowiedzieć na zjawiska zachodzące po drugiej stronie błony [Balistreri, 2022]. Stężenie SDC-1 w osoczu uznawane jest za wskaźnik uszkodzenia warstwy glikokaliksu [Zhang *i wsp.*, 2021], któremu towarzyszy rozwój stanu zapalnego w śródbłonku [Johansson *i wsp.*, 2011]. Podwyższone stężenie SDC-1 w osoczu zwierząt na diecie wysokosodowej w porównaniu z grupą SHAM-NS (Ryc. 13) może sugerować, że obniżenie zależności napięcia spoczynkowego GMA i MCA w diecie wysokosodowej jest wynikiem uszkodzenia odpowiedzi śródbłonka tych naczyń na naprężenie ścinające. Istnieją dowody, że jony sodu mogą być przechowywane w formie nieaktywnej osmotycznie (tj. takiej, która nie powoduje równoczesnego zwiększania objętości wody), jeżeli związane są z powierzchnią organiczną naładowaną ujemnie [Titze i Machnik, 2010]. Taką powierzchnią jest właśnie glikokaliks naczyń krwionośnych [Weinbaum *i wsp.*, 2007]. Sód związany z glikokaliksem przenoszony jest przez kanały sodowe błony szczytowej komórki do jej wnętrza i odpowiada za jej aktywację [Kusche-Vihrog *i wsp.*, 2010]. Dlatego też wydaje się, że glikokaliks pełni rolę bariery dla oddziaływania sodu na ścianę naczynia. Przy grubości warstwy glikokaliksu ok. 400 nm, ekspresja kanałów sodowych jest niska, w efekcie czego komórka chroniona jest przed sodem podwójnie (zarówno przez warstwę glikokaliksu, jak i niską przepuszczalność błony komórkowej dla sodu). Przy zaniku glikokaliksu (obniżenie grubości poniżej 200 nm) ekspresja kanałów sodowych jest wysoka, a sód łatwo penetruje komórki śródbłonka; sytuacja taka obserwowana jest u ludzi na diecie wysokosodowej [Oberleithner *i wsp.*, 2011]. Wiązanie sodu w formie nieaktywnej osmotycznie do glikokaliksu i/lub jego łatwe przechodzenie do komórek śródbłonka mogłoby także, przynajmniej częściowo, tłumaczyć brak zmian stężenia jonów sodu w osoczu u zwierząt na diecie HS (Tab. 2).

Aktywność eNOS zależna jest także od stężenia ADMA, endogennego inhibitora eNOS. Stężenie ADMA w osoczu szczurów SHAM-HS jest istotnie niższe niż w kontrolnej grupie SHAM-NS; można więc przypuszczać, że mamy do czynienia w tym przypadku z formą kompensacji niskiej biodostępności NO. Takiego efektu nie obserwowano u szczurów ze zmniejszoną masą nerek, co jest prawdopodobnie związane z wpływem usunięcia jednej nerki na występujące fizjologicznie możliwości kompensacyjne. Niekorzystne zmiany usunięcia jednej nerki widać zresztą w doświadczeniu z pomiarem osoczowego stężenia TMAO w grupie UNX-NS (Ryc. 14).

Ponieważ NO jest silnie reaktywnym wolnym rodnikiem, tempo jego zużywania jest znacznie podwyższone w sytuacji podwyższonego stężenia innych wolnych rodników – reaktywnych form tlenu (ROS). Podczas diety HS, w wyniku nie do końca poznanych procesów, w naczyniach powstają duże ilości ROS [Boegehold, 2013]. Najwięcej wolnych rodników przedostaje się do ściany naczynia z makrofagów [Cathcart, 2004]. Głównym wolnym rodnikiem w patologii naczyń jest rodnik ponadtlenkowy  $\cdot O^2$ , powstający przede wszystkim w wyniku wzmożonej aktywności oksydazy NADPH [Mueller *i wsp.*, 2005]. Reakcja między rodnikiem ponadtlenkowym i NO prowadzi do zużycia NO (osłabienia sygnału naczyniorozszerzającego), a także powstania nadtlenoazotynu  $ONOO^-$ , który przyczynia się do uszkodzenia komórek [Beckman i Koppenol, 1996], co w efekcie prowadzi do dysfunkcji śródbłonna. Znaczenie ROS w reaktywności naczyń nie było jednak przedmiotem badań niniejszej rozprawy; w świetle jej wyników być może jest to interesujący kierunek badań w przyszłości.

Dysfunkcja śródbłonna/obniżona biodostępność NO nie przekłada się na zmniejszenie reaktywności naczyń na substancje naczyniorozszerzające zależne od śródbłonna – na naczyniorozszerzającą ACh w przypadku GMA (Ryc. 8A) i ATP w przypadku MCA (Ryc. 8B). Należy podkreślić, że obniżona biodostępność NO nie musi iść w parze z zaburzoną odpowiedzią naczyń na substancje zależne od śródbłonna [Tang *i wsp.*, 2006, Jarrett *i wsp.*, 2013]. Nawet jeżeli rozszerzenie naczyń wywołane przez ACh odbywa się za pośrednictwem NO w warunkach fizjologicznych, w sytuacji zaburzeń wytwarzania NO odpowiedź ta może być mediowana przez inne substancje wytwarzane w śródbłonku. Zresztą nie jest pewne, że NO pośredniczy fizjologicznie w tych odpowiedziach; często zdarza się, że w obwodowych naczyniach oporowych to nie NO, a EDHF lub prostaglandyny są odpowiedzialne za naczyniorozszerzający wpływ ACh [Hoepfl *i wsp.*, 2002, Dora *i wsp.*, 2003]. Podobnie, w naczyniach oporowych krążenia mózgowego za wpływ naczyniorozszerzający ATP odpowiadają EDHF lub prostanoidy [Horiuchi *i wsp.*, 2003, Dietrich *i wsp.*, 2009]. Z badań grupy Bryana wynika, że rozszerzenie MCA w odpowiedzi na ATP odbywa się za pośrednictwem śródbłonna i receptorów purynergicznym P2y, w sposób zależny zarówno od NO jak i EDHF [You *i wsp.*, 1999]. Przy czym udział NO i EDHF jest zależny od dawki agonisty P2y. ATP podany w niskich dawkach ( $<10^{-6}$  M) pobudza wydzielanie NO ze śródbłonna, a w dawkach wyższych niż  $10^{-6}$  M wywołuje hiperpolaryzację śródbłonna, która przekazana jest komórkom mięśni gładkich przez połączenia mioendotelialne. W przypadku diskutowanych tu wyników badań własnych podawano ATP w stężeniu do  $10^{-6}$  M, tzn. w zakresie stężeń niskich, które w warunkach fizjologicznych, według podanych powyżej

informacji, powinno wywołać rozszerzenie zależne od NO. Nie można wykluczyć, że w sytuacji zmniejszonej biodostępności NO w odpowiedzi na ATP pośredniczy EDHF.

Najwyraźniej u zwierząt na diecie HS, cechujących się ogólnoustrojowym obniżeniem biodostępności NO, naczyniorozszerzające działanie ACh i ATP odbywa się alternatywnymi ścieżkami.

Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że niektóre z wyników otrzymanych w naszych badaniach odbiegają od tych, które uzyskali inni badacze. Na przykład, Liu [Liu *i wsp.*, 1997] w badaniach na tętnicy GMA w podobnym do naszego układzie, zauważył, że odpowiedź naczyniorozszerzająca na obniżone ciśnienie parcjalne tlenu, acetylocholinę (ACh) i analog prostacykliny iloprost była znacznie zmniejszona u szczurów na diecie HS (zarówno ze zmniejszoną masą nerek, jak i z zachowaną wyjściową masą nerek) w porównaniu ze szczurami na diecie o prawidłowej zawartości sodu. Podobnie, zmniejszoną odpowiedź naczyniorozszerzającą na podanie ACh i iloprostu już po siedmiodniowej diecie HS opisywali Weber i Lombard [Weber i Lombard, 2000]. Jednocześnie do osłabienia odpowiedzi na związki naczyniorozszerzające, chroniczna, tj. co najmniej czterotygodniowa, lecz nie „ostra” (kilkudniowa) dieta HS prowadzi do selektywnego zwiększenia wrażliwości naczyń oporowych na naczyniokurczącą Ang II, ale nie na noradrenalinę [Weber *i wsp.*, 1999]. Przedstawione przykłady dowodzą, że zmiany właściwości naczynioruchowych naczyń oporowych mięśnia smukłego rozwijają się w odpowiedzi na wysoką podaż sodu w diecie, której nie musi towarzyszyć nadciśnienie tętnicze.

Wpływ diety wysokosodowej na naczynia krążenia mózgowego był badany pod kątem zaburzeń autoregulacji oraz regulacji zależnej od śródbłonka i tlenu azotu. Większość doniesień na ten temat pochodzi od grupy Lombarda i została przeprowadzona na szczurach poddanych krótko- lub długotrwałej diecie HS. W tych badaniach potwierdzono dysfunkcję śródbłonka u zwierząt na diecie wysokosodowej oraz zmniejszenie odpowiedzi na podanie analogu prostacykliny – iloprostu oraz ACh [Lombard *i wsp.*, 2003, Durand *i wsp.*, 2010, Matic *i wsp.*, 2018].

Wysokie spożycie sodu, jak już wspomniano, samo w sobie ma szkodliwy wpływ na regulację mózgowych naczyń krwionośnych. Wykazano także, że wpływa na funkcję mózgu, która w dużej mierze zależy od dostarczania z krwią składników odżywczych dopasowanych do jego potrzeb energetycznych [Iadecola i Nedergaard, 2007]. Wyniki opisane w niniejszej rozprawie potwierdzają obserwację, że sama wysoka konsumpcja sodu, której nie

towarzyszy wzrost ciśnienia tętniczego krwi, ma szkodliwy wpływ na regulację napięcia naczyń krwionośnych.

### **6.3. Sodo-zależne nadciśnienie tętnicze jako czynnik zaburzający reaktywność naczyń**

W grupie UNX-HS z jednostronną nefrektomią, które stały się sodo-wrażliwe, i rozwinęły nadciśnienie tętnicze, obserwowano dodatkowe zaburzenia odpowiedzi naczyniowych w stosunku do tych, które wystąpiły w grupie kontrolnej tzn. u szczurów SHAM-HS bez nadciśnienia. Szczury z grupy UNX-HS cechowały się zwiększeniem wrażliwość GMA także na niskie dawki naczyniokurczącej endoteliny-1 (Ryc. 6B) oraz wyraźnym zmniejszeniem odpowiedzi MCA na naczyniorozszerzający ATP (Ryc. 8B).

#### **6.3.1. Zastosowany model sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego okazał się skuteczny**

W omawianych w niniejszej rozprawie doświadczeniach ani jednostronna nefrektomia, ani dieta wysokosodowa, zastosowane niezależnie od siebie, nie były w stanie doprowadzić do zwiększenia ciśnienia krwi tętniczej w ciągu 28 dni obserwacji. Dopiero złożenie tych dwóch czynników powodowało zwiększenie wartości ciśnienia tętniczego krwi w ciągu tygodnia (Tab. 2). Jest to zgodne z założeniami takiego modelowania sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego. Sama dieta HS (4%) prowadzona przez cztery tygodnie u szczurów bez genetycznych predyspozycji do rozwoju nadciśnienia tętniczego (SD) nie prowadzi do zwiększenia wartości BP, lecz jej przedłużenie do sześciu tygodni powoduje podwyższenie wartości ciśnienia krwi tętniczej [Gu *i wsp.*, 2008]. Natomiast połączenie diety HS z jednostronną nefrektomią prowadzi do rozwoju sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego w ciągu dwóch tygodni [Carlstrom *i wsp.*, 2007, Bądryńska i Sadowski, 2012]. Powyższy przykład wskazuje na to, że niekorzystne zmiany spowodowane wysoką podażą sodu w diecie są jedynie przyspieszone przez nefrektomię, gdyż sód sam w sobie jest czynnikiem na tyle silnie wpływającym na układ krążenia, że w odpowiednio długiej perspektywie czasowej spowoduje rozwój nadciśnienia tętniczego.

#### **6.3.2. Stężenie sodu w osoczu szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym pozostało prawidłowe**

Szczury, których ciśnienie krwi tętniczej było podwyższone (UNX-HS), nadal zachowywały prawidłowe stężenie sodu w osoczu (Tab. 2). Jest to możliwe przy założeniu, że jedna nerka radzi sobie wyśmienicie z usuwaniem nadmiaru jonów lub, że sód kumuluje się gdzieś w ustroju. Podczas wysokiej podaży sodu w diecie początkowo dochodzi

do równoważenia wysokiego spożycia sodu przez wysokie tempo jego wydalania. Utrzymuje to jednak nerkę w stanie permanentnej hiperperfuzji, co przyczynia się do jej uszkodzenia. Uszkodzenie nerek uznaje się za pierwszy krok w kierunku rozwoju nadciśnienia tętniczego i innych chorób naczyniowych [Adroque i Madias, 2007]. Wydaje się, że natriureza u zwierząt w grupie UNX-HS była nieznacznie niższa niż w grupie SHAM-HS (Ryc. 5C) – choć nie uzyskano istotności statystycznej w tym porównaniu, wartości średniej natriurezy dla grupy UNX-HS we wszystkich dniach diety były niższe niż w grupie SHAM-HS, co prawdopodobnie wynika z upośledzenia homeostazy sodowej w związku z usunięciem nerki (UNX-HS). Faktyczne zmniejszenie liczby czynnych nefronów o połowę powoduje automatycznie zwiększone obciążenie nefronów pozostałych w ustroju. Dodatkowe obciążenie ustroju wysoką podażą sodu w diecie powoduje z czasem przekraczanie zdolności nerki do utrzymywania homeostazy sodowej. W takiej sytuacji sód kumulowałby się w ustroju: albo w formie osmotycznie czynnej (np. w osoczu), albo w formie nieczynnej osmotycznie (np. związany z anionowymi cząsteczkami pokrywającymi komórki różnych tkanek). Sód nie kumulował się w naczyniach.

### **6.3.3. Sodo-zależne nadciśnienie a wrażliwość naczyń oporowych na substancje naczynioaktywne**

Szczury z grupy UNX-HS cechowały się zwiększeniem wrażliwości GMA także na niskie dawki naczyniokurczącej ET-1 (Ryc. 6B) oraz obniżeniem wrażliwości MCA na naczyniorozszerzający ATP (Ryc. 8B).

Wzmocnienie odpowiedzi GMA na ET-1, obserwowane u szczurów z grupy SHAM-HS przy wyższych dawkach ET-1, u szczurów z grupy UNX-HS widoczne jest także przy niskich dawkach ET-1 (Ryc. 6B). Obserwacja ta może być wynikiem pogłębienia przez nadciśnienie tętnicze zmian, jakie występują w wyniku samej diety HS.

U szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym obserwuje się także obniżenie wrażliwości MCA na naczyniorozszerzający ATP (Ryc. 8B). Podobnego upośledzenia odpowiedzi na śródbłonkozależne czynniki naczyniorozszerzające nie obserwuje się w naczyniach oporowych mięśnia szkieletowego (Ryc. 8A). Działający wewnątrznaczyniowo ATP pochodzi przede wszystkim z komórek śródbłonka i erytrocytów. ATP, działając na błonowe receptory purynergiczne P2y w komórkach śródbłonka, prowadzi do zwiększenia produkcji NO, prostacykliny i czynników hiperpolaryzujących mięśniówkę, co skutkuje rozszerzeniem naczynia [Bodin *i wsp.*, 1991, Liu *i wsp.*, 2004, Alkayed *i wsp.*, 2009]. Wysokie ciśnienie krwi zwiększa tempo uwalniania ATP z erytrocytów, co przyczynia się do wzrostu

stężenia ATP w osoczu ( $P_{ATP}$ , ang. *plasma ATP*). Wysokie wartości  $P_{ATP}$  pociągają za sobą wzmocnienie aktywności komórek układu odpornościowego, przez co przyczyniają się do patologicznych zmian związanych z chorobą nadciśnieniową [Zhao *i wsp.*, 2019]. Być może obniżenie wrażliwości MCA na naczyniorozszerzający ATP jest mechanizmem kompensującym zwiększenie jego stężenia w osoczu w nadciśnieniu. Może być jednak wyrazem pogłębionego uszkodzenia śródbłonka, w którym uszkodzonych jest więcej mechanizmów niż w śródbłonku naczyń zwierząt na diecie HS z prawidłowymi wartościami BP. Dziecie HS towarzyszy obniżenie biodostępności NO (Ryc. 9, 9), a więc osłabienie jednej ze ścieżek, którą ATP jest w stanie wywołać rozszerzenie naczynia. U szczurów z grupy SHAM-HS jednak odpowiedź na ATP jest zachowana, co sugeruje, że mimo ograniczenia biodostępności tlenu azotu ATP jest w stanie wywoływać relaksację mięśniówki gładkiej innymi drogami, jak dyskutowano już wcześniej. U szczurów z grupy UNX-HS odpowiedź na niskie dawki ATP jest wręcz zniesiona, a na wyższe – ograniczona, co sugeruje, że upośledzeniu uległy także ścieżki oddziaływania ATP na mięśniówkę niezależne od NO. Ponieważ dla naczyniorozszerzającego efektu ATP konieczne jest zachowanie prawidłowo funkcjonujących komórek śródbłonka [Duza i Sarelis, 2003], ograniczenie tego efektu jest kolejną przesłanką wskazującą na uszkodzenie funkcji tych komórek.

## 6.4. Potencjalne przyczyny uszkodzenia śródbłonka naczyń

Brak zmian stężenia jonów sodu u zwierząt na diecie wysokosodowej, zarówno w osoczu jak i w tkankach (w skórze, mięśniu smukłym oraz mózgu – obserwacje nie ujęte w wynikach rozprawy), przy jednoczesnym wyraźnym uszkodzeniu podstawowych mechanizmów regulacji naczyń krwionośnych u zwierząt na diecie wysokosodowej spowodował, że postanowiliśmy przejrzeć piśmiennictwo dotyczące wpływu diety wysokosodowej na mikrobiotę jelitową. Przewód pokarmowy jest bowiem niewątpliwie pierwszym miejscem w organizmie, które narażone jest na kontakt z dostarczonym doustnie sodem.

### 6.4.1. Wzrost stężenia TMAO w osoczu zwierząt na diecie wysokosodowej

W piśmiennictwie można znaleźć dane wskazujące, że jednym ze skutków stosowania diety HS jest zwiększenie stężenia TMAO w osoczu [Bielińska *i wsp.*, 2018, Liu *i wsp.*, 2022]. Podwyższone stężenie TMAO uznawane jest za czynnik ryzyka w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [Wang *i wsp.*, 2014] i ma stanowić łącznik między tymi chorobami a dietą bogatą w czerwone mięso [Koeth *i wsp.*, 2013]. Wykazano, że wzrost stężenia TMAO w osoczu



o 5  $\mu\text{mol/l}$  zwiększa ryzyko rozwoju nadciśnienia tętniczego o 9% [Ge *i wsp.*, 2020]. Z kolei obniżenie stężenia TMAO w osoczu koreluje z obniżeniem wartości ciśnienia tętniczego. Przykładowo, zastosowanie probiotyków prowadziło do obniżenia stężenia TMAO w osoczu oraz obniżenia wartości ciśnienia tętniczego [Khalesi *i wsp.*, 2014]. Co więcej, podawanie enalaprilu prowadzi do obniżenia poziomu TMAO w osoczu w nie do końca poznanym mechanizmie (prawdopodobnie przez zwiększenie tempa usuwania TMAO z moczem) [Konop *i wsp.*, 2018]. Stężenie TMAO w osoczu zależne jest od: aktywności flory jelitowej, przepuszczalności bariery jelito-krew, tempa przemian TMA w TMAO w wątrobie oraz tempa wydalania TMA i TMAO z moczem [Ufnal *i wsp.*, 2015]. Wysokie spożycie soli przez szczury prowadzi do znaczącej przebudowy mikrobioty jelitowej [Bielińska *i wsp.*, 2018], jako że poszczególne odmiany bakterii różnią się znacznie tolerancją zasolenia środowiska.

Przedstawione w tej pracy wyniki nie potwierdzają wzrostu stężenia TMAO, ani jego prekursora TMA w osoczu szczurów otrzymujących dietę wysokosodową. Natomiast istotnie wyższy poziom TMAO w osoczu obserwowano u szczurów dwadzieścia osiem dni po zabiegu jednostronnej nefrektomii utrzymywanych na diecie standardowej (UNX-NS), u których poziom TMAO był około dwukrotnie wyższy niż u zwierząt bez nefrektomii (SHAM-NS, Ryc. 14B). Możliwą przyczyną wysokiego stężenia TMAO w osoczu tych szczurów odpowiada, przynajmniej częściowo, zmniejszona zdolność nerek do usuwania tej substancji z moczem. Zwiększoną produkcję toksyn pochodzących od bakterii jelitowych obserwuje się u pacjentów nawet z łagodną dysfunkcją nerek [Zupcic *i wsp.*, 2023]. Tak więc możliwe, że jednostronna nefrektomia, nawet bez diety wysokosodowej, jest w stanie zaburzyć mikroflorę jelitową. Chorobom nerek często towarzyszą zaburzenia motoryki jelit, które prowadzą do zmian w składzie flory jelitowej, a w efekcie do zaparc i aktywacji jelitowego układu odpornościowego [Nishiyama *i wsp.*, 2019]. Zaburzenia jelitowe wycofują się w wyniku antybiotykoterapii. U osób z niewydolnością nerek oraz u zwierząt, których stan modeluje niewydolność nerek obserwuje się przesunięcie mikrobioty jelitowej w stronę rodzin bakterii posiadających wiele enzymów proteolitycznych, odpowiedzialnych za produkcję toksyn [Vaziri *i wsp.*, 2013, Meijers *i wsp.*, 2019]. Rodzi się jednak pytanie, czy taka zmiana mikrobioty może wystąpić u zwierząt po jednostronnej nefrektomii w ciągu czterech tygodni. Jest to interesująca obserwacja, na której można byłoby się skupić w kolejnym projekcie badawczym.

Od pewnego czasu badacze zajmujący się niekorzystnym wpływem diety wysokosodowej na przebieg chorób autoimmunologicznych sugerują, że zasadniczą rolę

w etiologii tych chorób odgrywają procesy zainicjowane pod wpływem jonów sodu w układzie immunologicznym na poziomie przewodu pokarmowego. Wykazano, że zwiększenie stężenia sodu nie tylko pobudza proliferację komórek T, ale również powoduje ich niekorzystną polaryzację [Coimbra *i wsp.*, 1995, Kleinewietfeld *i wsp.*, 2013, Wu *i wsp.*, 2013]. Z badań Kleinewietfelda *i wsp.*, wynika, że wzrost stężenia jonów sodu pobudza różnicowanie mysich i ludzkich limfocytów Th17 i indukuje wysoce patogenny fenotyp, charakteryzujący się zwiększoną ekspersją receptora błonowego IL-23R i produkcją cytokin prozapalnych [Kleinewietfeld *i wsp.*, 2013]. W tych badaniach wykazano także, że zwiększenie poziomu IL-17 u myszy z doświadczalnym autoimmunologicznym zapaleniem mózgu i rdzenia (EAE), otrzymujących przewlekle dietę wysokosodową koreluje z pogorszeniem stanu neurologicznego zwierząt. W licznych badaniach nad przyczynami niekorzystnych efektów wysokiej podaży sodu w diecie wykazano, także u ludzi, udział patogennego fenotypu Th17 [Aggarwal *i wsp.*, 2003, Annunziato *i wsp.*, 2009, Farez *i wsp.*, 2015, Hernandez *i wsp.*, 2015].

Ciekawych wyników wskazujących na udział Th17 w zaburzeniach poznawczych obserwowanych u myszy na diecie wysokosodowej dostarczyły badania Faraco *i wsp.* [Faraco *i wsp.*, 2018]. Wykazano w nich, że podawana przewlekle myszom dieta HS prowadzi do dysfunkcji śródbłonna naczyń krążenia mózgowego na skutek hamowania fosforylacji eNOS pod wpływem IL-17, a także do upośledzenia funkcji poznawczych. Co więcej, pokazano, że delecja genu kodującego IL-17 lub ogólnoustrojowe podawanie przeciwciał neutralizujących IL-17 zapobiega deficytom poznawczym związanym z dietą wysokosodową, natomiast podawanie rekombinowanej IL-17 odtwarza deficyty poznawcze u zwierząt karmionych dietą o standardowej zawartości sodu [Faraco *i wsp.*, 2018]. Istnieją również dowody na to, że sód, oprócz bezpośredniego wpływu na polaryzację komórek T, zmienia niekorzystnie skład mikroflory jelitowej, ograniczając w niej udział korzystnych dla homeostazy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co koreluje z aktywacją komórek Th17 [Wilck *i wsp.*, 2017].

W świetle dyskusji dotyczącej aktywacji toksycznego fenotypu komórek Th17 i IL-17 pod wpływem diety wysokosodowej interesujące byłoby sprawdzenie czy neutralizacja IL-17 u szczurów na diecie wysokosodowej zapobiegłaby dysfunkcji śródbłonna obserwowanej w naszych badaniach.

#### **6.4.2. Podwyższone stężenie syndekanu-1 w osoczu**

U szczurów, otrzymujących dietę wysokosodową SHAM-HS i UNX-HS obserwowano istotnie podwyższone stężenie syndekanu-1 (SDC-1) w osoczu (Ryc. 13).

Badania prowadzone na osoczu ludzkim wykazały, że wzrost stężenia SDC-1, związany z uszkodzeniem śródbłonna, prowadzi z czasem do zaburzeń mikrokrążenia, a w dalszej konsekwencji do niedotlenienia narządu i jego uszkodzenia w wielu stanach patologicznych [Suzuki *i wsp.*, 2022]. Można przypuszczać, że podwyższone stężenie syndekanu-1 (Ryc. 13) u zwierząt poddanych nefrektomii jednostronnej bez diety wysokosodowej (UNX-NS) jest wynikiem łagodnej dysfunkcji nerek, której efektem jest zaburzenie mikroflory jelitowej, która to, uwalniając większe ilości TMA (przekształcanego w wątrobie do TMAO), prowadzi do uruchomienia procesów uszkadzających śródbłonek naczyń. Jest to jednak uszkodzenie na tyle nieznaczne, że nie doprowadza ono do zmniejszenia odpowiedzi naczyń na napięcie ścinające (Ryc. 9) i zmiany reaktywności naczyń oporowych (Ryc. 6-8) w czasie 28 dni od zabiegu nefrektomii.

## **6.5. Porównanie skuteczności terapii hipotensyjnej enalaprilem i chymostatyną**

Zwierzęta normotensyjne odpowiadają na zwiększenie podaży sodu w diecie obniżeniem aktywności ogólnoustrojowego układu renina-angiotensyna [Hodge *i wsp.*, 2002]. Szczury SD, wykorzystane w niniejszym projekcie badawczym, również odpowiedziały na dietę wysokosodową obniżeniem stężenia Ang II w osoczu (Ryc. 10). Jednakże wpływ składników układu renina-angiotensyna na patologiczne procesy towarzyszące sodozależnemu nadciśnieniu tętniczemu wynika przede wszystkim z aktywności lokalnego (tkankowego) RAS, który odpowiada za zwiększenie obwodowego oporu naczyniowego [Rassler, 2010]. Dlatego w dalszym etapie badań zastosowano dwa różne blokery układu renina-angiotensyna: enalapril i chymostatynę.

### **6.5.1. Odpowiedź MCA na podanie śródbłonkozależnego naczyniorozszerzającego ATP ulega normalizacji w efekcie stosowania obu inhibitorów**

Odpowiedź MCA na podanie ATP, obniżona u szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym (Ryc. 8B), ulegała normalizacji w obu grupach szczurów, którym podawano enalapril, lub chymostatynę (Ryc. 17), chociaż żadna z podanych substancji nie polepszyła funkcji śródbłonna w zakresie podstawowego wydzielania NO, jak można sądzić po braku poprawy odpowiedzi na L-NAME.

Biodostępność tlenu azotu może być obniżona na diecie wysokosodowej, jak wspomniano wcześniej, w wyniku zwiększonej produkcji ROS, co jest efektem wzmocnienia ekspresji oksydazy NADPH przez syntetyzowaną lokalnie Ang II [Adler i Huang, 2004]. Reaktywne formy tlenu prowadzą do zmniejszania biodostępności NO przez

przeprowadzanie go w rodnik ONOO<sup>-</sup>. Zablokowanie lokalnie syntetyzowanej Ang II przez chymostatynę prowadziłyby więc do ograniczenia produkcji ROS. To zwiększałyby biodostępność NO, przez co odpowiedź na śródbłonkozależne rozszerzenie naczyń, wywoływane m. in. przez ATP, zostawałoby przywrócone (Ryc. 17B). Wydaje się jednak, że ta ścieżka jest mało prawdopodobna, jako że zależność napięcia wyjściowego naczynia od NO nie została przywrócona, niezależnie od zastosowanej dawki chymostatyny (Ryc. 18D). Podobna sytuacja występuje u szczurów, którym podawano enalapril – choć obserwowana jest normalizacja odpowiedzi MCA na ATP (Ryc. 17A), to wyjściowe napięcie tego naczynia nadal wykazuje obniżoną zależność od biodostępności NO (Ryc. 18C). Innym niż NO mediatorem relaksacji mięśniówki przez ATP są prostaglandyny [Mortensen *i wsp.*, 2009, Crecelius *i wsp.*, 2011]. Być może więc normalizacja odpowiedzi MCA na podanie ATP, zarówno po podawaniu enalaprilu, jak i chymostatyny, zależna jest właśnie od prostaglandyn. Powszechnie wiadomo, że inhibitory ACE, w tym enalapril, działają protekcyjnie na bradykininę, która z kolei zwiększa syntezę prostaglandyn [Brown *i wsp.*, 1996, Rodriguez-Garcia *i wsp.*, 1999]. Bradykinina może być rozkładana zarówno przez ACE, jak i chymazę [Reilly *i wsp.*, 1985], stąd zastosowanie chymostatyny może wywierać podobny efekt do enalaprilu – ograniczając degradację bradykininy prowadzić do zwiększenia tempa syntezy prostaglandyn. Co więcej, u myszy z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym (2% NaCl w wodzie do picia przez 12 tygodni, wartość SBP wzrasta od 6. tygodnia) wykazano, że po dwunastu tygodniach wysokiej konsumpcji NaCl poziom PGE<sub>2</sub> w osoczu jest znacznie wyższy niż u zwierząt kontrolnych [Kubota *i wsp.*, 2022]. Obserwacja ta może z jednej strony świadczyć o prozapalnym działaniu diety HS, lecz być może świadczy także o nasileniu mechanizmu rozszerzania naczyń za pośrednictwem prostaglandyn.

#### **6.5.2. Odpowiedź GMA na podanie agonisty receptora AT1 ulega normalizacji tylko w efekcie podawania chymostatyny**

Odpowiedź GMA na podanie agonisty receptora AT1, nasilona u szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym (Ryc. 6A), została znormalizowana u szczurów leczonych chymostatyną, ale nie enalaprilem (Ryc. 16). Wydaje się więc, że bloker tkankowego RAS ma pewne przewagi, przynajmniej w naczyniach zaopatrujących mięśnie szkieletowe, nad blokerem osoczowego RAS.

Inhibitory ACE („-prile”) prowadzą do zmniejszenia ekspresji receptorów AT1. Wykazano, że dieta wysokosodowa zbliżona warunkami do zastosowanej w badaniach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy (4% Na w paszy, czas diety 5-6 tygodni) zwiększa

ekspresję AT1R w aortach szczurów Sprague-Dawley [Nickenig *i wsp.*, 1998]. Podobnie u szczurów z nadciśnieniem DOCA-salt (sodo-zależne nadciśnienie tętnicze, w którym nefrektomii i podwyższonemu spożyciu soli towarzyszy podawanie steroidu zwiększającego retencję sodu w ustroju) obserwowano zwiększoną ekspresję ACE i AT1R w lewej komorze serca. Pięcioletnie podawanie chinaprilu prowadziło do znacznej redukcji ekspresji tych dwóch białek [Hara *i wsp.*, 2001]. Wysokie spożycie soli (pasza z 3,15% Na<sup>+</sup> przez 4 tygodnie, tj. w warunkach zbliżonych do tych zastosowanych w niniejszej rozprawie) spowodowało wzrost gęstości receptorów AT1 w aorcie oraz wybranych jądrach mózgu, ale zmniejszenie gęstości w nerce. Stosowanie inhibitorów ACE (trandolaprilu i lizynoprilu) przez cały okres ekspozycji na wysoką podaż sodu w diecie skutkowało zmniejszeniem gęstości receptorów AT1 w mózgu do wartości porównywalnych z grupą na paszy standardowej, a w aorcie i nerce do poziomów nieco niższych [Liang i Leenen, 2007]. Przykłady te pokazują, że sodo-zależne nadciśnienie tętnicze powoduje zwiększenie gęstości AT1R w wielu obszarach układu sercowo-naczyniowego, a stosowanie ACEi obniża ekspresję AT1R. Nie opisano jednak zmian w odpowiedzi naczyń oporowych na agonistę AT1R u szczurów leczonych wymienionymi wyżej ACEi. Jeżeli normalizacja gęstości AT1R jest wystarczająca dla normalizacji odpowiedzi naczyniowej na pobudzenie tego receptora, być może czternastodniowy okres podawania enalaprilu jest za krótki, by taką normalizację ekspresji AT1R wywołać. Możliwe też, że różne inhibitory ACE różnią się między sobą (np. przekraczaniem bariery krew-mózg [Głodzik i Santisteban, 2021], czy lipofilnością [Mortensen *i wsp.*, 2008]), a przez to efekty ich działania są różne. Jednakże lizynopril posiada właściwości zbliżone do enalaprilu, stąd efekt stosowania tych blokerów powinien być do siebie zbliżony.

Istotna rola AT1R w nadciśnieniu tętniczym może wynikać nie tylko ze zwiększonej ich ekspresji, ale także z ich zwiększonej aktywacji przez czynniki prozapalne i bodźce mechaniczne. W nadciśnieniu pierwotnym (samoistnym), jak i nadciśnieniu ciążowym, wykazano obecność autoprzeciwciał IgG, aktywujących AT1R (AT1-AA, ang. *AT1 autoantibodies*). Mechanizm aktywacji receptora za pośrednictwem przeciwciał nie jest znany [Dragun *i wsp.*, 2005]. Wykazano, że aktywacja AT1R na powierzchni limfocytów T uruchamia stan zapalny, co może prowadzić do nadciśnienia tętniczego [Silva-Filho *i wsp.*, 2011]. AT1-AA wykryto aż u 95% pacjentek z nadciśnieniem ciążowym, a miano tych przeciwciał pozytywnie korelowało z ciężkością choroby. Pacjenci z nadciśnieniem tętniczym i obecnością AT1-AAs reagują na podawanie kandesartanu większą redukcją ciśnienia krwi niż osoby z nadciśnieniem bez obecności AT1-AAs. Świadczy to o przyczynowej roli AT1-AA w rozwoju niektórych typów nadciśnienia tętniczego [Chan *i wsp.*, 2014]. Wykazano także,

że receptory AT1 są aktywowane przez bodźce mechaniczne (zmianę naprężenia błony komórkowej) w sposób zarówno zależny, jak i niezależny od Ang II. Rozciąganie błony komórkowej powoduje uwolnienie Ang II zmagazynowanej w kardiomiocytach, a przez to aktywację AT1R ligandem. Zaobserwowano jednak, że samo rozciągnięcie błony kardiomiocytu jest w stanie aktywować AT1R bez udziału Ang II. Mechanizm takiej aktywacji AT1R nie został jeszcze poznany. Zjawisko aktywacji AT1R bodźcami mechanicznymi jest uznawane za potencjalną przyczynę hipertrofii mięśnia sercowego, stanowiącej powikłanie nadciśnienia tętniczego [Yasuda *i wsp.*, 2008]. Rodzi się jednak pytanie, na ile te mechanizmy aktywujące AT1R mogą być zachowane w izolowanym naczyniu tętniczym.

Obserwacja, że podawanie chymostatyny prowadzi do normalizacji odpowiedzi GMA na agonistę AT1R (Ryc. 16) sugeruje, że w zmiany w ścianie naczynia zaangażowany jest bardziej lokalny (tkankowy) niż osoczowy RAS. W nefropatii cukrzycowej i nadciśnieniowej u ludzi obserwuje się zwiększenie ekspresji chymazy w komórkach mięśni gładkich naczyń nerki [Huang *i wsp.*, 2003, Cristovam *i wsp.*, 2012]. Być może jest to zjawisko niekorzystne, a jego zablokowanie prowadzi do przywrócenia/utrzymania prawidłowych funkcji tej tkanki.

W warunkach fizjologicznych receptor AT1, po stymulacji przez Ang II, ulega chwilowej internalizacji, koniecznej do ponownego uwrażliwienia AT1R na Ang II. W tym procesie dochodzi do wkłęśnięcia błony komórkowej (powstania kaweoli), podczas którego AT1R oddziałuje z kaweoliną 1, głównym białkiem rusztowania kaweoli. Oddziaływanie to opóźnia ponowne uwrażliwienie AT1R na Ang II. Mechanizm ten zapobiega trwałemu zwężeniu tętnicy oporowej wywołanemu przez Ang II w warunkach prawidłowych [Czikora *i wsp.*, 2015]. W stanach patologicznych ROS mogą rozkładać kaweolinę 1 [Potje *i wsp.*, 2020]. ROS stymulują również aktywność enzymu sheddazy, zdolnego do degradacji składników glikokaliksu, co powoduje, że cząsteczki budujące glikokaliks (w tym syndekan-1) tracą zdolność do pośredniczenia między naprężeniem ścinającym a aktywacją eNOS. W efekcie biodostępność NO obniża się [Potje *i wsp.*, 2020]. U chomików z cukrzycą typu 1, podawane drogą pokarmową inhibitory chymazy TEI-E00548 i TEI-F00806 zmniejszyły poziom ekspresji NOX4 (jednej z oksydaz NADPH), zmniejszając tym samym stres oksydacyjny [Maeda *i wsp.*, 2012]. Być może chymostatyna w sposób podobny do innych blokerów chymazy obniża poziom stresu oksydacyjnego, a taki efekt jest nieosiągalny w przypadku stosowania enalaprilu.

### 6.5.3. Terapia hipotensyjna chymostatyną jest bardziej skuteczna niż enalaprilem

Zarówno terapia enalaprilem, jak i chymostatyną prowadziła do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi (Tab. 6). Jednak tylko terapia chymostatyną, w przeciwieństwie do terapii enalaprilem, wiązała się z normalizacją obu badanych odpowiedzi: zarówno MCA na ATP, jak i GMA na podanie agonisty AT1R.

Ani podawanie enalaprilu, ani podawanie chymostatyny nie spowodowało obniżenia ciśnienia tętniczego krwi do wartości wyjściowych (Tab. 4, 5, S2, S3). Jednakże redukcja wartości SBP była znaczna: o średnio 15,9 mmHg dla enalaprilu i 17,8 mmHg dla chymostatyny (dla najwyższych dawek obu leków; Tab. 6). Większość leków stosowanych w terapii nadciśnienia obniża SBP o ok. 10 mmHg, co prowadzi do zmniejszenia ryzyka wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych o jedną czwartą [Dimmitt *i wsp.*, 2019], stąd takie obniżenie wartości SBP w efekcie podawania enalaprilu i chymostatyny można uznać za sukces terapeutyczny. Stosowanie innych ACEi w zwierzęcych modelach nadciśnienia tętniczego także nie prowadziło do całkowitego zniesienia podwyższonego ciśnienia krwi tętniczej [Liang i Leenen, 2007].

Z danych literaturowych wiadomo, że hipotensyjne działanie enalaprilu jest podobne zarówno na diecie wysokosodowej, jak i niskosodowej [Chrysant *i wsp.*, 2000]. Choć w diecie wysokosodowej ogólnoustrojowy układ renina-angiotensyna jest hamowany przez wysoką podaż sodu w diecie, dodatkowe blokowanie tego układu enalaprilem sumuje się z efektem sodu. Hamując powstawanie Ang II, która działa na kanaliki nerkowe antydiuretycznie, enalapril ma działanie diuretyczne i natriuretyczne [Konop *i wsp.*, 2018]. Stosowanie inhibitorów ACE u szczurów ze spontaniczną utratą nefronów i z podwyższoną podażą sodu w diecie działa protekcyjnie na nerkę [Vegter *i wsp.*, 2012]. Ponieważ ACE rozkłada także bradykininę, stosowanie enalaprilu zwiększa naczyniorozszerzający potencjał bradykininy [Davie *i wsp.*, 1999].

Ani podawanie enalaprilu, ani chymostatyny nie wpłynęło na zwiększenie biodostępności NO (Ryc. 18, 19). Żadna z tych terapii nie poprawiła w istotny sposób odpowiedzi badanych naczyń na L-NAME (Ryc. 18). Podawanie inhibitorów ACE indukuje ekspresję eNOS [Lin *i wsp.*, 1999]. Z kolei podawanie inhibitorów chymazy prowadzi do obniżenia stresu oksydacyjnego [Maeda *i wsp.*, 2012], co powinno przełożyć się na wzrost biodostępności NO. Być może czternastodniowy okres podawania enalaprilu i chymostatyny jest za krótki, by taka poprawa nastąpiła. Jednakże zarówno w stężeniu metabolitów NO, jak i odpowiedzi MCA na L-NAME (Ryc. 18C, D) wraz z rosnącymi dawkami enalaprilu

i chymostatyny widoczny jest trend w kierunku wartości zbliżonych do tych w grupie UNX-NS. Być może zwiększenie liczebności zwierząt w badanych grupach i wydłużenie doświadczenia wykazałoby nieznaczną poprawę w tych wskaźnikach.

Do porównania skuteczności chymostatyny i enalaprilu w obniżaniu ciśnienia tętniczego krwi wykorzystano wskaźnik IC50 (ang. *half maximal inhibitory concentration*). Jest to wysokość dawki leku-inhibitora, przy której osiąga się połowę maksymalnego efektu. Im niższa wartość, tym wyższa skuteczność leku. Dawka IC50 dla odpowiedzi DBP na podawanie blokerów RAS wyniosła 3,512 mg/kg dla enalaprilu oraz 0,930 mg/kg dla chymostatyny (Ryc. 15).

Jedną z przewag chymostatyny nad enalaprilem mogłoby być ochronne działanie względem glikokaliksu. Wykazano, że warstwa glikokaliksu potrafi się regenerować, nawet w czasie około tygodnia. Jednakże nadal nie określono, od czego ten proces zależy oraz czy odtworzony glikokaliks ma zachowaną prawidłową budowę [Milusev *i wsp.*, 2022]. Wiadomo, że jednym z czynników uszkadzających glikokaliks są ROS [Lipowsky i Lescanic, 2013], produkowane w dużych ilościach przez Ang II powstającą w tkance. U chomików z cukrzycą typu 1, podawane drogą pokarmową inhibitory chymazy TEI-E00548 i TEI-F00806 obniżyły poziom ekspresji NOX4 (jednej z oksydaz NADPH), zmniejszając w ten sposób stres oksydacyjny [Maeda *i wsp.*, 2012]. Być może chymostatyna ma tę przewagę nad enalaprilem, że jest w stanie efektywnie blokować lokalną produkcję reaktywnych form tlenu, co działa ochronnie na glikokaliks. Być może czternastodniowa terapia chymostatyną nie jest wystarczająco długa, by doprowadzić do regeneracji glikokaliksu. Wiadomo także, że chymaza prowadzi do zwiększenia przepuszczalności bariery jelito-krew, co odbywa się przez uszkodzenie złączy ścisłych między komórkami [Groschwitz *i wsp.*, 2013]. Być może zastosowanie chymostatyny drogą pokarmową prowadzi do poprawy szczelności tej bariery i pozwala na regenerację glikokaliksu uszkodzonego w wyniku diety HS. Aby to potwierdzić, w przyszłych badaniach należałoby określić wpływ podawania enalaprilu i chymostatyny na stężenie SDC-1 w osoczu i sprawdzić jak w stosowanym przez nas modelu wygląda sprawa aktywacji limfocytów Th17 pod wpływem wysokiej podaży sodu.

Z przeglądu dostępnego piśmiennictwa na temat hipotensyjnego wpływu chymostatyny wynika, że nie zawsze przynosi ona podobnie korzystne efekty. U szczurów SHR w wieku przednadcisnieniowym (6 tyg.) oraz z ustalonym nadciśnieniem tętniczym (16 tyg.) dwutygodniowe dożylnie podawanie chymostatyny nie obniżyło ciśnienia tętniczego krwi [Baranowska *i wsp.*, 2021]. Być może efekt chymostatyny na ciśnienie tętnicze zależy od drogi podawania i typu nadciśnienia tętniczego.



Przewlekłe hamowanie ACE lizynoprilem zwiększało ekspresję i aktywność chymazy w sercu [Wei *i wsp.*, 2010]. Poza tym, podawanie łączne inhibitorów chymazy i ACE daje lepsze efekty niż podawanie wyłącznie inhibitorów ACE, co wykazano na poprawie czynności i struktury serca u gryzoni [Wei *i wsp.*, 2010]. Terapia enalaprilem i terapia chymostatyną nie są więc wzajemnie wykluczające, a mogą działać synergistycznie.

Biorąc pod uwagę dodatkowy efekt podawania chymostatyny, jakiego nie obserwowano w przypadku enalaprilu (normalizacja odpowiedzi na podanie związku naczyniokurczącego) oraz niższą wartość IC50 dla chymostatyny wnioskować można, że chymostatyna jest bardziej skuteczna jako środek hipotensyjny u szczurów z sodo-zależnym nadciśnieniem tętniczym niż enalapril.

Należy jednak pamiętać, że ani chymostatyna, ani enalapril nie przyniosły poprawy funkcji śródbłonna – przynajmniej w zadanych ramach czasowych przeprowadzonych doświadczeń.

## 7. Wnioski

1. Wysoka podaż sodu w diecie wywołuje zmianę fenotypu obwodowych naczyń oporowych na pro-nadciśnieniowy.
2. Dieta wysokosodowa upośledza podstawowe wydzielanie NO ze śródbłonka w związku z uszkodzeniem glikokaliksu.
3. Tętnica środkowa mózgu jest bardziej wrażliwa na uszkodzenie w sodo-zależnym nadciśnieniu tętniczym niż tętnica obwodowa.
4. Dysfunkcja śródbłonka wywołana dietą wysokosodową prowadzi do uruchomienia alternatywnych ścieżek odpowiedzi na naczyniorozszerzające substancje śródbłonkozależne.
5. W rozwój sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego włączone są lokalny i osoczowy układ renina-angiotensyna.
6. Chymostatyna jest skuteczniejsza niż enalapril w obniżaniu ciśnienia krwi i odwracaniu zaburzeń regulacji obwodowych naczyń oporowych wywołanych przewlekłą dietą wysokosodową.

## 8. Piśmiennictwo

- Aalkjaer, C., Nilsson, H. and De Mey, J. G. R. (2021). Sympathetic and Sensory-Motor Nerves in Peripheral Small Arteries. *Physiol Rev*, 101, 495-544. doi: 10.1152/physrev.00007.2020
- Adams, J. M., Mccarthy, J. J. and Stocker, S. D. (2008). Excess dietary salt alters angiotensinergic regulation of neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*, 52, 932-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.118935
- Adler, S. and Huang, H. (2004). Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, F907-13. doi: 10.1152/ajprenal.00060.2004
- Adrogué, H. J. and Madias, N. E. (2007). Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med*, 356, 1966-78. doi: 10.1056/NEJMra064486
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., De Sauvage, F. J. and Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 278, 1910-4. doi: 10.1074/jbc.M207577200
- Aguilera, G. and Catt, K. (1981). Regulation of vascular angiotensin II receptors in the rat during altered sodium intake. *Circ Res*, 49, 751-8. doi: 10.1161/01.res.49.3.751
- Ahmad, S., Varagic, J., Voncannon, J. L., Groban, L., Collawn, J. F., Dell'italia, L. J. and Ferrario, C. M. (2016). Primacy of cardiac chymase over angiotensin converting enzyme as an angiotensin-(1-12) metabolizing enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 478, 559-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.100
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 100, 158-73. doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a
- Aleksandrowicz, M., Dworakowska, B., Dolowy, K. and Kozniewska, E. (2017). Restoration of the response of the middle cerebral artery of the rat to acidosis in hyposmotic hyponatremia by the opener of large-conductance calcium sensitive potassium channels (BK(Ca)). *J Cereb Blood Flow Metab*, 37, 3219-3230. doi: 10.1177/0271678X16685575
- Alkayed, F., Boudaka, A., Shiina, T., Takewaki, T. and Shimizu, Y. (2009). P2X purinoceptors mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in longitudinal smooth muscle of anterior mesenteric artery in young chickens. *Br J Pharmacol*, 158, 888-95. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00356.x
- Alonso-Galicia, M., Hudetz, A. G., Shen, H., Harder, D. R. and Roman, R. J. (1999). Contribution of 20-HETE to vasodilator actions of nitric oxide in the cerebral microcirculation. *Stroke*, 30, 2727-34; discussion 2734. doi: 10.1161/01.str.30.12.2727
- Anjum, S., Muzaale, A. D., Massie, A. B., Bae, S., Luo, X., Grams, M. E., Lentine, K. L., Garg, A. X. and Segev, D. L. (2016). Patterns of End-Stage Renal Disease Caused by Diabetes, Hypertension, and Glomerulonephritis in Live Kidney Donors. *Am J Transplant*, 16, 3540-3547. doi: 10.1111/ajt.13917
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. and Romagnani, S. (2009). Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*, 5, 325-31. doi: 10.1038/nrrheum.2009.80
- Aroor, A. R., Demarco, V. G., Jia, G., Sun, Z., Nistala, R., Meininger, G. A. and Sowers, J. R. (2013). The role of tissue Renin-Angiotensin-aldosterone system in the development of endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 161. doi: 10.3389/fendo.2013.00161
- Athyros, V. G., Mikhailidis, D. P., Kakafika, A. I., Tziomalos, K. and Karagiannis, A. (2007). Angiotensin II reactivation and aldosterone escape phenomena in renin-angiotensin-aldosterone system blockade: is oral renin inhibition the solution? *Expert Opin Pharmacother*, 8, 529-35. doi: 10.1517/14656566.8.5.529
- Baez, A. E. and Velasquez, H. A. (1995). [Focus on risk in adolescent pregnancy]. *Rev Cubana Enferm*, 11, 57-63. doi:
- Balistreri, C. R. (2022). Promising Strategies for Preserving Adult Endothelium Health and Reversing Its Dysfunction: From Liquid Biopsy to New Omics Technologies and Noninvasive Circulating Biomarkers. *Int J Mol Sci*, 23. doi: 10.3390/ijms23147548

- Baranowska, I., Gawrys, O., Roszkowska-Chojecka, M. M., Badzyska, B., Tymecka, D., Olszynski, K. H. and Kompanowska-Jeziarska, E. (2021). Chymase Dependent Pathway of Angiotensin II Generation and Rapeseed Derived Peptides for Antihypertensive Treatment of Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Pharmacol*, 12, 658805. doi: 10.3389/fphar.2021.658805
- Barton, M. and Yanagisawa, M. (2019). Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension*, 74, 1232-1265. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105
- Bądryńska, B., Baranowska, I., Gawryś, O. and Sadowski, J. (2019). Evidence against a crucial role of renal medullary perfusion in blood pressure control of hypertensive rats. *J Physiol*, 597, 211-223. doi: 10.1113/JP276342
- Bądryńska, B. and Sadowski, J. (2012). Experimental selective elevation of renal medullary blood flow in hypertensive rats: evidence against short-term hypotensive effect. *Acta Physiol (Oxf)*, 205, 484-93. doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02435.x
- Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37. doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424
- Bekassy, Z., Lopatko Fagerstrom, I., Bader, M. and Karpman, D. (2022). Crosstalk between the renin-angiotensin, complement and kallikrein-kinin systems in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 22, 411-428. doi: 10.1038/s41577-021-00634-8
- Beldent, V., Michaud, A., Wei, L., Chauvet, M. T. and Corvol, P. (1993). Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J Biol Chem*, 268, 26428-34. doi:
- Berk, B. C. (2003). Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin. *Sci STKE*, 2003, PE16. doi: 10.1126/stke.2003.181.pe16
- Bielińska, K., Radkowski, M., Grochowska, M., Perlejewski, K., Huc, T., Jaworska, K., Motooka, D., Nakamura, S. and Ufnal, M. (2018). High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats. *Nutrition*, 54, 33-39. doi: 10.1016/j.nut.2018.03.004
- Bkaily, G., Simon, Y., Jazzar, A., Najibeddine, H., Normand, A. and Jacques, D. (2021). High Na(+) Salt Diet and Remodeling of Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells. *Biomedicines*, 9. doi: 10.3390/biomedicines9080883
- Bloom, R. A., Pogrund, H. and Libson, E. (1984). Soft-tissue thickness of the wrist. *Clin Radiol*, 35, 321-2. doi: 10.1016/s0009-9260(84)80109-9
- Bode-Boger, S. M., Scalera, F. and Ignarro, L. J. (2007). The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther*, 114, 295-306. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.002
- Bodin, P., Bailey, D. and Burnstock, G. (1991). Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 103, 1203-5. doi: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12324.x
- Boegehold, M. A. (2013). The effect of high salt intake on endothelial function: reduced vascular nitric oxide in the absence of hypertension. *J Vasc Res*, 50, 458-67. doi: 10.1159/000355270
- Booz, G. W. and Baker, K. M. (1996). Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*, 28, 635-40. doi: 10.1161/01.hyp.28.4.635
- Brown, I. J., Tzoulaki, I., Candeias, V. and Elliott, P. (2009). Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol*, 38, 791-813. doi: 10.1093/ije/dyp139
- Brown, N. J., Ryder, D., Gainer, J. V., Morrow, J. D. and Nadeau, J. (1996). Differential effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on the vasodepressor and prostacyclin responses to bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther*, 279, 703-12. doi:
- Burdan, F., Chafas, A. and Szumiło, J. (2006). Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne. *Postepy Hig Med Dosw*, 60, 129-141. doi:
- Carey, R. M. and Siragy, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, 24, 261-71. doi: 10.1210/er.2003-0001
- Carlstrom, M., Sallstrom, J., Skott, O., Larsson, E. and Persson, A. E. (2007). Uninephrectomy in young age or chronic salt loading causes salt-sensitive hypertension in adult rats. *Hypertension*, 49, 1342-50. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.087213

- Cathcart, M. K. (2004). Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 23-8. doi: 10.1161/01.ATV.0000097769.47306.12
- Chan, C. T., Lieu, M., Toh, B. H., Kyaw, T. S., Bobik, A., Sobey, C. G. and Drummond, G. R. (2014). Antibodies in the pathogenesis of hypertension. *Biomed Res Int*, 2014, 504045. doi: 10.1155/2014/504045
- Chappell, M. C. (2012). Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol*, 2, 2733-52. doi: 10.1002/cphy.c120002
- Chaudhry, R., Miao, J. H. and Rehman, A. 2023. Physiology, Cardiovascular. [Updated 2022 Oct 16]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostępne pod adresem: ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493197, ostatni dostęp: 2023-05-22
- Ching, S. F., Hayes, L. W. and Slakey, L. L. (1983). Angiotensin-converting enzyme in cultured endothelial cells. Synthesis, degradation, and transfer to culture medium. *Arteriosclerosis*, 3, 581-8. doi: 10.1161/01.atv.3.6.581
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., Jr., Roccella, E. J., Joint National Committee on Prevention, D. E., Treatment of High Blood Pressure. National Heart, L., Blood, I. and National High Blood Pressure Education Program Coordinating, C. (2003). Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, 42, 1206-52. doi: 10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2
- Chrysant, S. G., Weder, A. B., Mccarron, D. A., Canossa-Terris, M., Cohen, J. D., Gunter, P. A., Hamilton, B. P., Lewin, A. J., Mennella, R. F., Kirkegaard, L. W., Weir, M. R. and Weinberger, M. H. (2000). Effects of isradipine or enalapril on blood pressure in salt-sensitive hypertensives during low and high dietary salt intake. MIST II Trial Investigators. *Am J Hypertens*, 13, 1180-8. doi: 10.1016/s0895-7061(00)01183-3
- Coimbra, R., Junger, W. G., Liu, F. C., Loomis, W. H. and Hoyt, D. B. (1995). Hypertonic/hyperoncotic fluids reverse prostaglandin E2 (PGE2)-induced T-cell suppression. *Shock*, 4, 45-9. doi: 10.1097/00024382-199507000-00007
- Corvol, P., Williams, T. A. and Soubrier, F. (1995). Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol*, 248, 283-305. doi: 10.1016/0076-6879(95)48020-x
- Cosentino, F., Rubattu, S., Savoia, C., Venturelli, V., Pagannone, E. and Volpe, M. (2001). Endothelial dysfunction and stroke. *J Cardiovasc Pharmacol*, 38 Suppl 2, S75-8. doi: 10.1097/00005344-200111002-00018
- Cowley, A. W., Jr. (1992). Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev*, 72, 231-300. doi: 10.1152/physrev.1992.72.1.231
- Creelius, A. R., Kirby, B. S., Richards, J. C., Garcia, L. J., Voyles, W. F., Larson, D. G., Luckasen, G. J. and Dinunno, F. A. (2011). Mechanisms of ATP-mediated vasodilation in humans: modest role for nitric oxide and vasodilating prostaglandins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1302-10. doi: 10.1152/ajpheart.00469.2011
- Cristovam, P. C., Carmona, A. K., Arnoni, C. P., Maquigussa, E., Pereira, L. G. and Boim, M. A. (2012). Role of chymase in diabetic nephropathy. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237, 985-92. doi: 10.1258/ebm.2012.011356
- Csato, V., Peto, A., Koller, A., Edes, I., Toth, A. and Papp, Z. (2014). Hydrogen peroxide elicits constriction of skeletal muscle arterioles by activating the arachidonic acid pathway. *PLoS One*, 9, e103858. doi: 10.1371/journal.pone.0103858
- Cuevas, P., Gutierrez-Diaz, J. A., Reimers, D., Dujovny, M., Diaz, F. G. and Ausman, J. I. (1987). Adrenergic innervation of human middle cerebral artery. Ultrastructural observations. *Surg Neurol*, 27, 113-6. doi: 10.1016/0090-3019(87)90281-3
- Czikora, I., Feher, A., Lucas, R., Fulton, D. J. and Bagi, Z. (2015). Caveolin-1 prevents sustained angiotensin II-induced resistance artery constriction and obesity-induced high blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308, H376-85. doi: 10.1152/ajpheart.00649.2014
- Daugherty, A., Rateri, D. L., Lu, H., Inagami, T. and Cassis, L. A. (2004). Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. *Circulation*, 110, 3849-57. doi: 10.1161/01.CIR.0000150540.54220.C4

- Davenport, A. P., Hyndman, K. A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D. E., Pollock, J. S., Pollock, D. M., Webb, D. J. and Maguire, J. J. (2016). Endothelin. *Pharmacol Rev*, 68, 357-418. doi: 10.1124/pr.115.011833
- Davie, A. P., Dargie, H. J. and McMurray, J. J. (1999). Role of bradykinin in the vasodilator effects of losartan and enalapril in patients with heart failure. *Circulation*, 100, 268-73. doi: 10.1161/01.cir.100.3.268
- Demura, M., Demura, Y., Takeda, Y. and Saijoh, K. (2015). Dynamic regulation of the angiotensinogen gene by DNA methylation, which is influenced by various stimuli experienced in daily life. *Hypertens Res*, 38, 519-27. doi: 10.1038/hr.2015.42
- Deschepper, C. F. (1994). Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int*, 46, 1561-3. doi: 10.1038/ki.1994.446
- Dietrich, H. H., Horiuchi, T., Xiang, C., Hongo, K., Falck, J. R. and Dacey, R. G., Jr. (2009). Mechanism of ATP-induced local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral penetrating arterioles. *J Vasc Res*, 46, 253-64. doi: 10.1159/000167273
- Dimmitt, S. B., Stampfer, H. G., Martin, J. H. and Ferner, R. E. (2019). Efficacy and toxicity of antihypertensive pharmacotherapy relative to effective dose 50. *Br J Clin Pharmacol*, 85, 2218-2227. doi: 10.1111/bcp.14033
- Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I. and Fabiani, M. E. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)*, 100, 481-92. doi: 10.1046/j.1365-2214.2001.01000.x
- Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G. and Chrissobolis, S. (2014). Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int*, 2014, 406960. doi: 10.1155/2014/406960
- Dishy, V., Sofowora, G. G., Imamura, H., Nishimi, Y., Xie, H. G., Wood, A. J. and Stein, C. M. (2003). Nitric oxide production decreases after salt loading but is not related to blood pressure changes or nitric oxide-mediated vascular responses. *J Hypertens*, 21, 153-7. doi: 10.1097/00004872-200301000-00025
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E. and Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87, E1-9. doi: 10.1161/01.res.87.5.e1
- Dora, K. A., Xia, J. and Duling, B. R. (2003). Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H119-26. doi: 10.1152/ajpheart.00643.2002
- Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelha, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schonemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H. H., Luft, F. C. and Wallukat, G. (2005). Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*, 352, 558-69. doi: 10.1056/NEJMoa035717
- Durand, M. J., Raffai, G., Weinberg, B. D. and Lombard, J. H. (2010). Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H1024-33. doi: 10.1152/ajpheart.00328.2010
- Duza, T. and Sarelius, I. H. (2003). Conducted dilations initiated by purines in arterioles are endothelium dependent and require endothelial Ca<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H26-37. doi: 10.1152/ajpheart.00788.2002
- Elliott, P., Marmot, M., Dyer, A., Joossens, J., Kesteloot, H., Stamler, R., Stamler, J. and Rose, G. (1989). The INTERSALT study: main results, conclusions and some implications. *Clin Exp Hypertens A*, 11, 1025-34. doi: 10.3109/10649138909150000
- Faraco, G., Brea, D., Garcia-Bonilla, L., Wang, G., Racchumi, G., Chang, H., Buendia, I., Santisteban, M. M., Segarra, S. G., Koizumi, K., Sugiyama, Y., Murphy, M., Voss, H., Anrather, J. and Iadecola, C. (2018). Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. *Nat Neurosci*, 21, 240-249. doi: 10.1038/s41593-017-0059-z
- Farez, M. F., Fiol, M. P., Gaitan, M. I., Quintana, F. J. and Correale, J. (2015). Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86, 26-31. doi: 10.1136/jnnp-2014-307928

- Féléto, M., Huang, Y. and Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol*, 164, 894-912. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x
- Féléto, M. and Vanhoutte, P. M. (2013). Endothelium-dependent hyperpolarization: no longer an f-word! *J Cardiovasc Pharmacol*, 61, 91-2. doi: 10.1097/FJC.0b013e31828197bc
- Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B. and Diz, D. I. (1997). Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 30, 535-41. doi: 10.1161/01.hyp.30.3.535
- Figuroa, X. F. and Duling, B. R. (2009). Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal*, 11, 251-66. doi: 10.1089/ars.2008.2117
- Folkow, B., Johansson, B. and Oberg, B. (1958). The stimulation threshold of different sympathetic fibre groups as correlated to their functional differentiation. *Acta Physiol Scand*, 44, 146-56. doi: 10.1111/j.1748-1716.1958.tb01616.x
- Fong, D., Denton, K. M., Moritz, K. M., Evans, R. and Singh, R. R. (2014). Compensatory responses to nephron deficiency: adaptive or maladaptive? *Nephrology (Carlton)*, 19, 119-28. doi: 10.1111/nep.12198
- Forstermann, U. and Li, H. (2011). Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol*, 164, 213-23. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01196.x
- Forstermann, U. and Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33, 829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
- Frisbee, J. C. and Lombard, J. H. (1998). Chronic elevations in salt intake and reduced renal mass hypertension compromise mechanisms of arteriolar dilation. *Microvasc Res*, 56, 218-27. doi: 10.1006/mvre.1998.2105
- Garland, C. J. and Dora, K. A. (2017). EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)*, 219, 152-161. doi: 10.1111/apha.12649
- Ge, X., Zheng, L., Zhuang, R., Yu, P., Xu, Z., Liu, G., Xi, X., Zhou, X. and Fan, H. (2020). The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Adv Nutr*, 11, 66-76. doi: 10.1093/advances/nmz064
- Ghiadoni, L., Taddei, S. and Virdis, A. (2012). Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Curr Vasc Pharmacol*, 10, 42-60. doi: 10.2174/157016112798829823
- Gibbons, G. H., Pratt, R. E. and Dzau, V. J. (1992). Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*, 90, 456-61. doi: 10.1172/JCI115881
- Givertz, M. M. (2001). Manipulation of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 104, E14-8. doi: 10.1161/hc3001.094733
- Glodzik, L. and Santisteban, M. M. (2021). Blood-Brain Barrier Crossing Renin-Angiotensin System Drugs: Considerations for Dementia and Cognitive Decline. *Hypertension*, 78, 644-646. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17595
- Gonzalez, M., Lobos, L., Castillo, F., Galleguillos, L., Lopez, N. C. and Michea, L. (2005). High-salt diet inhibits expression of angiotensin type 2 receptor in resistance arteries. *Hypertension*, 45, 853-9. doi: 10.1161/01.HYP.0000161990.98383.ad
- Grasby, D. J., Morris, J. L. and Segal, S. S. (1999). Heterogeneity of vascular innervation in hamster cheek pouch and retractor muscle. *J Vasc Res*, 36, 465-76. doi: 10.1159/000025689
- Grobe, J. L., Xu, D. and Sigmund, C. D. (2008). An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology (Bethesda)*, 23, 187-93. doi: 10.1152/physiol.00002.2008
- Groschwitz, K. R., Wu, D., Osterfeld, H., Ahrens, R. and Hogan, S. P. (2013). Chymase-mediated intestinal epithelial permeability is regulated by a protease-activating receptor/matrix metalloproteinase-2-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304, G479-89. doi: 10.1152/ajpgi.00186.2012
- Gu, J. W., Anand, V., Shek, E. W., Moore, M. C., Brady, A. L., Kelly, W. C. and Adair, T. H. (1998). Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 31, 1083-7. doi: 10.1161/01.hyp.31.5.1083

- Gu, J. W., Bailey, A. P., Tan, W., Shparago, M. and Young, E. (2008). Long-term High Salt Diet Causes Hypertension and Decreases Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Sprague-Dawley Rats. *J Am Soc Hypertens*, 2, 275-85. doi: 10.1016/j.jash.2008.03.001
- Guo, C., Ju, H., Leung, D., Massaelli, H., Shi, M. and Rabinovitch, M. (2001). A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest*, 107, 703-15. doi: 10.1172/JCI9997
- Gur, M., Elbasan, Z., Yildiray Sahin, D., Yildiz Koyunsever, N., Seker, T., Ozaltun, B., Cayli, M. and Kocyigit, A. (2013). DNA damage and oxidative status in newly diagnosed, untreated, dipper and non-dipper hypertensive patients. *Hypertens Res*, 36, 166-71. doi: 10.1038/hr.2012.156
- Guyenet, P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, 7, 335-46. doi: 10.1038/nrn1902
- Guyton, A. C. (1991). Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science*, 252, 1813-6. doi: 10.1126/science.2063193
- Guyton, A. C., Coleman, T. G. and Granger, H. J. (1972). Circulation: overall regulation. *Annu Rev Physiol*, 34, 13-46. doi: 10.1146/annurev.ph.34.030172.000305
- Hara, K., Kobayashi, N., Watanabe, S., Tsubokou, Y. and Matsuoka, H. (2001). Effects of quinapril on expression of eNOS, ACE, and AT1 receptor in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 14, 321-30. doi: 10.1016/s0895-7061(00)01283-8
- Harrison-Bernard, L. M., De Garavilla, L. and Bivona, B. J. (2013). Enhanced vascular chymase-dependent conversion of endothelin in the diabetic kidney. *Ochsner J*, 13, 49-55. doi:
- Haulica, I., Bild, W. and Serban, D. N. (2005). Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 6, 121-31. doi: 10.3317/jraas.2005.018
- Haynes, W. G., Noon, J. P., Walker, B. R. and Webb, D. J. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens*, 11, 1375-80. doi: 10.1097/00004872-199312000-00009
- Hebbel, R. P. and Vercellotti, G. M. (2021). Multiple inducers of endothelial NOS (eNOS) dysfunction in sickle cell disease. *Am J Hematol*, 96, 1505-1517. doi: 10.1002/ajh.26308
- Heidenreich, P. A., Trogdon, J. G., Khavjou, O. A., Butler, J., Dracup, K., Ezekowitz, M. D., Finkelstein, E. A., Hong, Y., Johnston, S. C., Khera, A., Lloyd-Jones, D. M., Nelson, S. A., Nichol, G., Orenstein, D., Wilson, P. W., Woo, Y. J., American Heart Association Advocacy Coordinating, C., Stroke, C., Council on Cardiovascular, R., Intervention, Council on Clinical, C., Council On, E., Prevention, Council On, A., Thrombosis, Vascular, B., Council On, C., Critical, C., Perioperative, Resuscitation, Council on Cardiovascular, N., Council on the Kidney in Cardiovascular, D., Council on Cardiovascular, S., Anesthesia, Interdisciplinary Council on Quality Of, C. and Outcomes, R. (2011). Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*, 123, 933-44. doi: 10.1161/CIR.0b013e31820a55f5
- Hemmens, B. and Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol*, 100, 1-32. doi: 10.1385/1-59259-749-1:1
- Henriksson, M., Stenman, E. and Edvinsson, L. (2003). Intracellular pathways involved in upregulation of vascular endothelin type B receptors in cerebral arteries of the rat. *Stroke*, 34, 1479-83. doi: 10.1161/01.STR.0000072984.79136.79
- Hernandez, A. L., Kitz, A., Wu, C., Lowther, D. E., Rodriguez, D. M., Vudattu, N., Deng, S., Herold, K. C., Kuchroo, V. K., Kleinewietfeld, M. and Hafler, D. A. (2015). Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3+ regulatory T cells. *J Clin Invest*, 125, 4212-22. doi: 10.1172/JCI81151
- Hill, C. E., Phillips, J. K. and Sandow, S. L. (2001). Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med Res Rev*, 21, 1-60. doi: 10.1002/1098-1128(200101)21:1<1::aid-med1>3.0.co;2-6
- Hirsch, A. T., Talsness, C. E., Smith, A. D., Schunkert, H., Ingelfinger, J. R. and Dzau, V. J. (1992). Differential effects of captopril and enalapril on tissue renin-angiotensin systems in experimental heart failure. *Circulation*, 86, 1566-74. doi: 10.1161/01.cir.86.5.1566
- Hodge, G., Ye, V. Z. and Duggan, K. A. (2002). Dysregulation of angiotensin II synthesis is associated with salt sensitivity in the spontaneous hypertensive rat. *Acta Physiol Scand*, 174, 209-15. doi: 10.1046/j.1365-201x.2002.00937.x



- Hoepfl, B., Rodenwaldt, B., Pohl, U. and De Wit, C. (2002). EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H996-H1004. doi: 10.1152/ajpheart.01082.2001
- Hogan, S. P., Koskinen, A., Matthaei, K. I., Young, I. G. and Foster, P. S. (1998). Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, 210-8. doi: 10.1164/ajrccm.157.6.mar-1
- Hollenberg, N. K., Fisher, N. D. and Price, D. A. (1998). Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*, 32, 387-92. doi: 10.1161/01.hyp.32.3.387
- Hoopes, S. L., Garcia, V., Edin, M. L., Schwartzman, M. L. and Zeldin, D. C. (2015). Vascular actions of 20-HETE. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 120, 9-16. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.002
- Horiuchi, T., Dietrich, H. H., Hongo, K. and Dacey, R. G., Jr. (2003). Comparison of P2 receptor subtypes producing dilation in rat intracerebral arterioles. *Stroke*, 34, 1473-8. doi: 10.1161/01.STR.0000071527.10129.65
- Huang, X. R., Chen, W. Y., Truong, L. D. and Lan, H. Y. (2003). Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. *J Am Soc Nephrol*, 14, 1738-47. doi: 10.1097/01.asn.0000071512.93927.4e
- Iadecola, C. and Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, 10, 1369-76. doi: 10.1038/nn2003
- Imig, J. D. (2004). ACE Inhibition and Bradykinin-Mediated Renal Vascular Responses: EDHF Involvement. *Hypertension*, 43, 533-5. doi: 10.1161/01.HYP.0000118054.86193.ce
- Ishibazawa, A., Nagaoka, T., Takahashi, T., Yamamoto, K., Kamiya, A., Ando, J. and Yoshida, A. (2011). Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 8496-504. doi: 10.1167/iovs.11-7686
- Iwaniak, A. (2011). Analiza zależności między strukturą peptydów pochodzących z białek żywności a ich aktywnością inhibitorową wobec enzymu konwertującego angiotensynę. Ocena przydatności metod in silico w badaniach nad białkowymi prekursorami bioaktywnych peptydów *Wydawnictwo UW-M w Olsztynie*, 162. doi:
- Jarrett, C., Lekic, M., Smith, C. L., Pusec, C. M. and Sweazea, K. L. (2013). Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilation in systemic arteries from mourning doves (*Zenaidura macroura*). *J Comp Physiol B*, 183, 959-67. doi: 10.1007/s00360-013-0757-0
- Johansson, P. I., Stensballe, J., Rasmussen, L. S. and Ostrowski, S. R. (2011). A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg*, 254, 194-200. doi: 10.1097/SLA.0b013e318226113d
- Juan, H. and Sametz, W. (1986). Vasoconstriction induced by noradrenaline and angiotensin II is antagonized by eicosapentaenoic acid independent of formation of trienoic eicosanoids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 332, 288-92. doi: 10.1007/BF00504869
- Jung, J. Y., Lee, J. W., Kim, S., Jung, E. S., Jang, H. R., Han, J. S. and Joo, K. W. (2009). Altered regulation of renal sodium transporters in salt-sensitive hypertensive rats induced by uninephrectomy. *Electrolyte Blood Press*, 7, 58-66. doi: 10.5049/EBP.2009.7.2.58
- Karnik, S. S., Unal, H., Kemp, J. R., Tirupula, K. C., Eguchi, S., Vanderheyden, P. M. and Thomas, W. G. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]. *Pharmacol Rev*, 67, 754-819. doi: 10.1124/pr.114.010454
- Kawabe, J., Ushikubi, F. and Hasebe, N. (2010). Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives. *Circ J*, 74, 836-43. doi: 10.1253/circj.cj-10-0195
- Kawano, Y., Matsuoka, H., Nishikimi, T., Takishita, S. and Omae, T. (1997). The role of vasopressin in essential hypertension. Plasma levels and effects of the V1 receptor antagonist OPC-21268 during different dietary sodium intakes. *Am J Hypertens*, 10, 1240-4. doi: 10.1016/s0895-7061(97)00269-0

- Kerr, P. M., Wei, R., Tam, R., Sandow, S. L., Murphy, T. V., Ondrusova, K., Lunn, S. E., Tran, C. H. T., Welsh, D. G. and Plane, F. (2015). Activation of endothelial IKCa channels underlies NO-dependent myoendothelial feedback. *Vascul Pharmacol*, 74, 130-138. doi: 10.1016/j.vph.2015.09.001
- Khalesi, S., Sun, J., Buys, N. and Jayasinghe, R. (2014). Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*, 64, 897-903. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03469
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R. A., Muller, D. N. and Hafler, D. A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496, 518-22. doi: 10.1038/nature11868
- Kloza, M., Baranowska-Kuczko, M., Karpińska, O. and Kozłowska, H. (2019). Rola kanałów potasowych aktywowanych przez jony wapnia o małej i średniej przewodności w zależnej od śródbłonna hiperpolaryzacji naczyń krwionośnych w fizjologii i nadciśnieniu tętniczym. *Postepy Hig Med Dosw*, 73, 1-14. doi: 10.5604/01.3001.0012.8388
- Kobori, H., Nishiyama, A., Abe, Y. and Navar, L. G. (2003). Enhancement of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats on high salt diet. *Hypertension*, 41, 592-7. doi: 10.1161/01.HYP.0000056768.03657.B4
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., Didonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., Tang, W. H., Bushman, F. D., Lusis, A. J. and Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*, 19, 576-85. doi: 10.1038/nm.3145
- Konop, M., Radkowski, M., Grochowska, M., Perlejewski, K., Samborowska, E. and Ufnal, M. (2018). Enalapril decreases rat plasma concentration of TMAO, a gut bacteria-derived cardiovascular marker. *Biomarkers*, 23, 380-385. doi: 10.1080/1354750X.2018.1432689
- Kopkan, L., Hess, A., Huskova, Z., Cervenka, L., Navar, L. G. and Majid, D. S. (2010). High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299, F656-63. doi: 10.1152/ajprenal.00047.2010
- Kozniwska, E., Oseka, M. and Stys, T. (1992). Effects of endothelium-derived nitric oxide on cerebral circulation during normoxia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12, 311-7. doi: 10.1038/jcbfm.1992.43
- Kubota, H., Kunisawa, K., Wulaer, B., Hasegawa, M., Kurahashi, H., Sakata, T., Tezuka, H., Kugita, M., Nagao, S., Nagai, T., Furuyashiki, T., Narumiya, S., Saito, K., Nabeshima, T. and Mouri, A. (2022). High salt induces cognitive impairment via the angiotensin II-AT1 and prostaglandin E2-EP1 systems. *bioRxiv*, 2022.06.06.495007. doi: 10.1101/2022.06.06.495007
- Kusche-Vihrog, K., Callies, C., Fels, J. and Oberleithner, H. (2010). The epithelial sodium channel (ENaC): Mediator of the aldosterone response in the vascular endothelium? *Steroids*, 75, 544-9. doi: 10.1016/j.steroids.2009.09.003
- Lee, R. M., Dickhout, J. G. and Sandow, S. L. (2017). Vascular structural and functional changes: their association with causality in hypertension: models, remodeling and relevance. *Hypertens Res*, 40, 311-323. doi: 10.1038/hr.2016.145
- Lee, R. M., Garfield, R. E., Forrest, J. B. and Daniel, E. E. (1983). Morphometric study of structural changes in the mesenteric blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*, 20, 57-71. doi: 10.1159/000158460
- Leite, R., Estevao, R., Resende, A. C. and Salgado, M. C. (1997). Role of endothelium in angiotensin II formation by the rat aorta and mesenteric arterial bed. *Braz J Med Biol Res*, 30, 649-56. doi: 10.1590/s0100-879x1997000500013
- Lemarie, C. A. and Schiffrin, E. L. (2010). The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 11, 19-31. doi: 10.1177/1470320309347785
- Liang, B. and Leenen, F. H. (2007). Prevention of salt induced hypertension and fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors in Dahl S rats. *Br J Pharmacol*, 152, 903-14. doi: 10.1038/sj.bjp.0707472
- Linz, W., Wohlfart, P., Scholkens, B. A., Malinski, T. and Wiemer, G. (1999). Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res*, 43, 549-61. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00091-7

- Lipowsky, H. H. and Lescanic, A. (2013). The effect of doxycycline on shedding of the glycocalyx due to reactive oxygen species. *Microvasc Res*, 90, 80-5. doi: 10.1016/j.mvr.2013.07.004
- Lips, D. J., Dewindt, L. J., Van Kraaij, D. J. and Doevendans, P. A. (2003). Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J*, 24, 883-96. doi: 10.1016/s0195-668x(02)00829-1
- Liu, C., Mather, S., Huang, Y., Garland, C. J. and Yao, X. (2004). Extracellular ATP facilitates flow-induced vasodilatation in rat small mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H1688-95. doi: 10.1152/ajpheart.00576.2003
- Liu, G., Cheng, J., Zhang, T., Shao, Y., Chen, X., Han, L., Zhou, R. and Wu, B. (2022). Inhibition of Microbiota-dependent Trimethylamine N-Oxide Production Ameliorates High Salt Diet-Induced Sympathetic Excitation and Hypertension in Rats by Attenuating Central Neuroinflammation and Oxidative Stress. *Front Pharmacol*, 13, 856914. doi: 10.3389/fphar.2022.856914
- Liu, Y., Fredricks, K. T., Roman, R. J. and Lombard, J. H. (1997). Response of resistance arteries to reduced PO<sub>2</sub> and vasodilators during hypertension and elevated salt intake. *Am J Physiol*, 273, H869-77. doi: 10.1152/ajpheart.1997.273.2.H869
- Lombard, J. H., Sylvester, F. A., Phillips, S. A. and Frisbee, J. C. (2003). High-salt diet impairs vascular relaxation mechanisms in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H1124-33. doi: 10.1152/ajpheart.00835.2002
- Lorenz, J. N. (2010). Chymase: the other ACE? *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, F35-6. doi: 10.1152/ajprenal.00641.2009
- Maeda, Y., Inoguchi, T., Takei, R., Hendarto, H., Ide, M., Inoue, T., Kobayashi, K., Urata, H., Nishiyama, A. and Takayanagi, R. (2012). Chymase inhibition prevents myocardial fibrosis through the attenuation of NOX4-associated oxidative stress in diabetic hamsters. *J Diabetes Investig*, 3, 354-61. doi: 10.1111/j.2040-1124.2012.00202.x
- Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A. M., Kjeldsen, S. E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R. E., Boudier, H. A., Zanchetti, A., Vahanian, A., Camm, J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellemans, I., Kristensen, S. D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J. L., Erdine, S., Kiowski, W., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Lindholm, L. H., Viigimaa, M., Adamopoulos, S., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Bertomeu, V., Clement, D., Erdine, S., Farsang, C., Gaita, D., Lip, G., Mallion, J. M., Manolis, A. J., Nilsson, P. M., O'Brien, E., Ponikowski, P., Redon, J., Ruschitzka, F., Tamargo, J., Van Zwieten, P., Waeber, B., Williams, B., Management of Arterial Hypertension of the European Society Of, H. and European Society Of, C. (2007). 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 25, 1105-87. doi: 10.1097/HJH.0b013e3281fc975a
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Bohm, M., Christiaens, T., Cifkova, R., De Backer, G., Dominiczak, A., Galderisi, M., Grobbee, D. E., Jaarsma, T., Kirchhof, P., Kjeldsen, S. E., Laurent, S., Manolis, A. J., Nilsson, P. M., Ruilope, L. M., Schmieder, R. E., Sirnes, P. A., Sleight, P., Viigimaa, M., Waeber, B., Zannad, F. and Task Force, M. (2013). 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 31, 1281-357. doi: 10.1097/01.hjh.0000431740.32696.cc
- Martens, C. R. and Edwards, D. G. (2011). Peripheral vascular dysfunction in chronic kidney disease. *Cardiol Res Pract*, 2011, 267257. doi: 10.4061/2011/267257
- Martins-Filho, R. K., Zotin, M. C., Rodrigues, G. and Pontes-Neto, O. (2020). Biomarkers Related to Endothelial Dysfunction and Vascular Cognitive Impairment: A Systematic Review. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 49, 365-374. doi: 10.1159/000510053
- Matavelli, L. C. and Siragy, H. M. (2015). AT<sub>2</sub> receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol*, 65, 226-32. doi: 10.1097/FJC.0000000000000208
- Matic, A., Jukic, I., Stupin, A., Baric, L., Mihaljevic, Z., Unfirer, S., Tartaro Bujak, I., Mihaljevic, B., Lombard, J. H. and Drenjancevic, I. (2018). High salt intake shifts the mechanisms of flow-

- induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315, H718-H730. doi: 10.1152/ajpheart.00097.2018
- Matoba, T., Shimokawa, H., Kubota, H., Morikawa, K., Fujiki, T., Kunihiro, I., Mukai, Y., Hirakawa, Y. and Takeshita, A. (2002). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 909-13. doi: 10.1006/bbrc.2001.6278
- Matrougui, K., Loufrani, L., Heymes, C., Levy, B. I. and Henrion, D. (1999). Activation of AT(2) receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension*, 34, 659-65. doi: 10.1161/01.hyp.34.4.659
- Matrougui, K., Schiavi, P., Guez, D. and Henrion, D. (1998). High sodium intake decreases pressure-induced (myogenic) tone and flow-induced dilation in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension*, 32, 176-9. doi: 10.1161/01.hyp.32.1.176
- Mcdonald, J. E., Padmanabhan, N., Petrie, M. C., Hillier, C., Connell, J. M. and McMurray, J. J. (2001). Vasoconstrictor effect of the angiotensin-converting enzyme-resistant, chymase-specific substrate [Pro(11)(D)-Ala(12)] angiotensin I in human dorsal hand veins: in vivo demonstration of non-ace production of angiotensin II in humans. *Circulation*, 104, 1805-8. doi: 10.1161/hc4001.097220
- Mcperson, E. A., Luo, Z., Brown, R. A., Lebard, L. S., Corless, C. C., Speth, R. C. and Bagby, S. P. (2004). Chymase-like angiotensin II-generating activity in end-stage human autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 15, 493-500. doi: 10.1097/01.asn.0000109782.28991.26
- Meijers, B., Evenepoel, P. and Anders, H. J. (2019). Intestinal microbiome and fitness in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 15, 531-545. doi: 10.1038/s41581-019-0172-1
- Merino, J., Guasch-Ferre, M., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Estruch, R., Fito, M., Ros, E., Aros, F., Bullo, M., Gomez-Gracia, E., Monino, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Razquin, C., Buil-Cosiales, P., Sorli, J. V., Munoz, M. A., Pinto, X., Masana, L. and Salas-Salvado, J. (2015). Is complying with the recommendations of sodium intake beneficial for health in individuals at high cardiovascular risk? Findings from the PREDIMED study. *Am J Clin Nutr*, 101, 440-8. doi: 10.3945/ajcn.114.096750
- Metzger, R., Franke, F. E., Bohle, R. M., Alhenc-Gelas, F. and Danilov, S. M. (2011). Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessel, organ and species specificity. *Microvasc Res*, 81, 206-15. doi: 10.1016/j.mvr.2010.12.003
- Mills, K. T., Stefanescu, A. and He, J. (2020). The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol*, 16, 223-237. doi: 10.1038/s41581-019-0244-2
- Milusev, A., Rieben, R. and Sorvillo, N. (2022). The Endothelial Glycocalyx: A Possible Therapeutic Target in Cardiovascular Disorders. *Front Cardiovasc Med*, 9, 897087. doi: 10.3389/fcvm.2022.897087
- Miura, S. and Karnik, S. S. (1999). Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin II through different types of epitope recognition. *J Hypertens*, 17, 397-404. doi: 10.1097/00004872-199917030-00013
- Miura, S., Matsuo, Y., Kiya, Y., Karnik, S. S. and Saku, K. (2010). Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 391, 85-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.008
- Miyake-Ogawa, C., Miyazaki, M., Abe, K., Harada, T., Ozono, Y., Sakai, H., Koji, T. and Kohno, S. (2005). Tissue-specific expression of renin-angiotensin system components in IgA nephropathy. *Am J Nephrol*, 25, 1-12. doi: 10.1159/000083224
- Miyazaki, M. and Takai, S. (2000). Role of chymase on vascular proliferation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1, 23-6. doi: 10.3317/jraas.2000.004
- Miyazaki, M. and Takai, S. (2001). Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res*, 24, 189-93. doi: 10.1291/hypres.24.189
- Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-42. doi:

- Montezano, A. C. and Touyz, R. M. (2014). Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal*, 20, 164-82. doi: 10.1089/ars.2013.5302
- Moriguchi, Y., Yogo, K., Aizawa, K., Serizawa, K., Tashiro, Y., Yorozu, K., Ishizuka, N., Iwabuchi, S., Kitamura, H. and Nishimura, T. (2011). Left ventricular hypertrophy is associated with inflammation in sodium loaded subtotal nephrectomized rats. *Biomed Res*, 32, 83-90. doi: 10.2220/biomedres.32.83
- Morikawa, T., Imanishi, M., Suzuki, H., Okada, N., Okumura, M., Konishi, Y., Yoshioka, K., Takai, S. and Miyazaki, M. (2005). Mast cell chymase in the ischemic kidney of severe unilateral renovascular hypertension. *Am J Kidney Dis*, 45, e45-50. doi: 10.1053/j.ajkd.2004.11.018
- Morris, J. L. (1995). Peptides as neurotransmitters in vascular autonomic neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22, 792-802. doi: 10.1111/j.1440-1681.1995.tb01938.x
- Mortensen, E. M., Restrepo, M. I., Copeland, L. A., Pugh, J. A. and Anzueto, A. (2008). Association of hydrophilic versus lipophilic angiotensin-converting enzyme inhibitor use on pneumonia-related mortality. *Am J Med Sci*, 336, 462-6. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31817149ed
- Mortensen, S. P., Gonzalez-Alonso, J., Bune, L. T., Saltin, B., Pilegaard, H. and Hellsten, Y. (2009). ATP-induced vasodilation and purinergic receptors in the human leg: roles of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, R1140-8. doi: 10.1152/ajpregu.90822.2008
- Motiejunaite, J., Amar, L. and Vidal-Petiot, E. (2021). Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol (Paris)*, 82, 193-197. doi: 10.1016/j.ando.2020.03.012
- Mueller, C. F., Laude, K., McNally, J. S. and Harrison, D. G. (2005). ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 274-8. doi: 10.1161/01.ATV.0000149143.04821.eb
- Muller, D. N., Fischli, W., Clozel, J. P., Hilgers, K. F., Bohlender, J., Menard, J., Busjahn, A., Ganten, D. and Luft, F. C. (1998). Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res*, 82, 13-20. doi: 10.1161/01.res.82.1.13
- Nehme, A., Zouein, F. A., Zayeri, Z. D. and Zibara, K. (2019). An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J Cardiovasc Dev Dis*, 6. doi: 10.3390/jcdd6020014
- Nickenig, G. and Harrison, D. G. (2002). The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation*, 105, 393-6. doi: 10.1161/hc0302.102618
- Nickenig, G., Strehlow, K., Roeling, J., Zolk, O., Knorr, A. and Bohm, M. (1998). Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. *Hypertension*, 31, 1272-7. doi: 10.1161/01.hyp.31.6.1272
- Nishiyama, K., Aono, K., Fujimoto, Y., Kuwamura, M., Okada, T., Tokumoto, H., Izawa, T., Okano, R., Nakajima, H., Takeuchi, T. and Azuma, Y. T. (2019). Chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy disturbs the intestinal microbiota and alters intestinal motility. *J Cell Physiol*, 234, 6667-6678. doi: 10.1002/jcp.27408
- Noll, G., Tschudi, M., Nava, E. and Luscher, T. F. (1997). Endothelium and high blood pressure. *Int J Microcirc Clin Exp*, 17, 273-9. doi: 10.1159/000179239
- O'donnell, M. J., Yusuf, S., Mente, A., Gao, P., Mann, J. F., Teo, K., Mcqueen, M., Sleight, P., Sharma, A. M., Dans, A., Probstfield, J. and Schmieider, R. E. (2011). Urinary sodium and potassium excretion and risk of cardiovascular events. *JAMA*, 306, 2229-38. doi: 10.1001/jama.2011.1729
- Oberleithner, H., Peters, W., Kusche-Vihrog, K., Korte, S., Schillers, H., Kliche, K. and Oberleithner, K. (2011). Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Arch*, 462, 519-28. doi: 10.1007/s00424-011-0999-1
- Okamura, T., Okunishi, H., Ayajiki, K. and Toda, N. (1990). Conversion of angiotensin I to angiotensin II in dog isolated renal artery: role of two different angiotensin II-generating enzymes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15, 353-9. doi: 10.1097/00005344-199003000-00002
- Okunishi, H., Miyazaki, M., Okamura, T. and Toda, N. (1987). Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun*, 149, 1186-92. doi: 10.1016/0006-291x(87)90533-x

- Oudit, G. Y., Crackower, M. A., Backx, P. H. and Penninger, J. M. (2003). The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med*, 13, 93-101. doi: 10.1016/s1050-1738(02)00233-5
- Park, S., Bivona, B. J., Kobori, H., Seth, D. M., Chappell, M. C., Lazartigues, E. and Harrison-Bernard, L. M. (2010). Major role for ACE-independent intrarenal ANG II formation in type II diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298, F37-48. doi: 10.1152/ajprenal.00519.2009
- Patiag, D., Qu, X., Gray, S., Idris, I., Wilkes, M., Seale, J. P. and Donnelly, R. (2000). Possible interactions between angiotensin II and insulin: effects on glucose and lipid metabolism in vivo and in vitro. *J Endocrinol*, 167, 525-31. doi: 10.1677/joe.0.1670525
- Peleli, M., Flacker, P., Zhuge, Z., Gomez, C., Wheelock, C. E., Persson, A. E. G. and Carlstrom, M. (2017). Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease, which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity. *Redox Biol*, 13, 522-527. doi: 10.1016/j.redox.2017.06.013
- Petrie, M. C., Padmanabhan, N., McDonald, J. E., Hillier, C., Connell, J. M. and McMurray, J. J. (2001). Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 37, 1056-61. doi: 10.1016/s0735-1097(01)01111-1
- Piwońska, A., Piotrowski, W., Kozela, M., Pająk, A., Nadrowski, P., Kozakiewicz, K., Tykarski, A., Bielecki, W., Puch-Walczak, A., Zdrojewski, T. and Drygas, W. (2018). Cardiovascular diseases prevention in Poland: results of WOBASZ and WOBASZ II studies. *Kardiologia Pol*, 76, 1534-1541. doi: 10.5603/KP.a2018.0154
- Pober, J. S. and Sessa, W. C. (2014). Inflammation and the blood microvascular system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a016345. doi: 10.1101/cshperspect.a016345
- Poch, E., Gonzalez, D., Giner, V., Bragulat, E., Coca, A. and De La Sierra, A. (2001). Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. *Hypertension*, 38, 1204-9. doi:
- Porrello, E. R., Pflieger, K. D., Seeber, R. M., Qian, H., Oro, C., Abogadie, F., Delbridge, L. M. and Thomas, W. G. (2011). Heteromerization of angiotensin receptors changes trafficking and arrestin recruitment profiles. *Cell Signal*, 23, 1767-76. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.011
- Potje, S. R., Paula, T. D., Paulo, M. and Bendhack, L. M. (2020). The Role of Glycocalyx and Caveolae in Vascular Homeostasis and Diseases. *Front Physiol*, 11, 620840. doi: 10.3389/fphys.2020.620840
- Price, A. M., Moody, W. E., Stoll, V. M., Vijapurapu, R., Hayer, M. K., Biasioli, L., Weston, C. J., Webster, R., Wesolowski, R., Mcgee, K. C., Liu, B., Baig, S., Pickup, L. C., Radhakrishnan, A., Law, J. P., Edwards, N. C., Steeds, R. P., Ferro, C. J. and Townend, J. N. (2021). Cardiovascular Effects of Unilateral Nephrectomy in Living Kidney Donors at 5 Years. *Hypertension*, 77, 1273-1284. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15398
- Querio, G., Antoniotti, S., Geddo, F., Levi, R. and Gallo, M. P. (2023). Modulation of Endothelial Function by TMAO, a Gut Microbiota-Derived Metabolite. *Int J Mol Sci*, 24. doi: 10.3390/ijms24065806
- Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50, 413-92. doi:
- Rassler, B. (2010). The Renin-Angiotensin System in the Development of Salt-Sensitive Hypertension in Animal Models and Humans. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3, 940-960. doi: 10.3390/ph3040940
- Reilly, C. F., Schechter, N. B. and Travis, J. (1985). Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase. *Biochem Biophys Res Commun*, 127, 443-9. doi: 10.1016/s0006-291x(85)80180-7
- Reilly, C. F., Tewksbury, D. A., Schechter, N. M. and Travis, J. (1982). Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem*, 257, 8619-22. doi:
- Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., Van Zandvoort, M. A. and Oude Egbrink, M. G. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*, 454, 345-59. doi: 10.1007/s00424-007-0212-8
- Richard, V., Hurel-Merle, S., Scalbert, E., Ferry, G., Lallemand, F., Bessou, J. P. and Thuillez, C. (2001). Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. *Circulation*, 104, 750-2. doi: 10.1161/hc3201.094971

- Rodriguez-Garcia, J. L., Villa, E., Serrano, M., Gallardo, J. and Garcia-Robles, R. (1999). Prostacyclin: its pathogenic role in essential hypertension and the class effect of ACE inhibitors on prostaglandin metabolism. *Blood Press*, 8, 279-84. doi: 10.1080/080370599439490
- Rose, J. M. and Audus, K. L. (1998). Receptor-mediated angiotensin II transcytosis by brain microvessel endothelial cells. *Peptides*, 19, 1023-30. doi: 10.1016/s0196-9781(98)00054-0
- Rosón, M. I., Cavallero, S., Della Penna, S., Cao, G., Gorzalczany, S., Pandolfo, M., Kuprewicz, A., Canessa, O., Toblli, J. E. and Fernandez, B. E. (2006). Acute sodium overload produces renal tubulointerstitial inflammation in normal rats. *Kidney Int*, 70, 1439-46. doi: 10.1038/sj.ki.5001831
- Russell, F. D. and Davenport, A. P. (1999). Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*, 126, 391-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0702315
- Saito, H., Godo, S., Sato, S., Ito, A., Ikumi, Y., Tanaka, S., Ida, T., Fujii, S., Akaike, T. and Shimokawa, H. (2018). Important Role of Endothelial Caveolin-1 in the Protective Role of Endothelium-dependent Hyperpolarization Against Nitric Oxide-Mediated Nitrative Stress in Microcirculation in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 71, 113-126. doi: 10.1097/FJC.0000000000000552
- Samuel, P., Ali, Q., Sabuhi, R., Wu, Y. and Hussain, T. (2012). High Na intake increases renal angiotensin II levels and reduces expression of the ACE2-AT(2)R-MasR axis in obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303, F412-9. doi: 10.1152/ajprenal.00097.2012
- Sandoo, A., Van Zanten, J. J., Metsios, G. S., Carroll, D. and Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*, 4, 302-12. doi: 10.2174/1874192401004010302
- Santos, C. F., Caprio, M. A., Oliveira, E. B., Salgado, M. C., Schippers, D. N., Munzenmaier, D. H. and Greene, A. S. (2003). Functional role, cellular source, and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H775-83. doi: 10.1152/ajpheart.00818.2002
- Santos, R. a. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M. and Campagnole-Santos, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*, 98, 505-553. doi: 10.1152/physrev.00023.2016
- Sawicki, W. 1993. *Histologia. Podręcznik dla studentów*. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat*, 10, 128-34. doi: 10.1002/pst.426
- Shah, A. D. and Arora, R. R. (2005). Tissue angiotensin-converting enzyme inhibitors: are they more effective than serum angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Clin Cardiol*, 28, 551-5. doi: 10.1002/clc.4960281203
- Shimokawa, H. (2014). 2014 Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities-from bench to bedside. *Eur Heart J*, 35, 3180-93. doi: 10.1093/eurheartj/ehu427
- Shimokawa, H. and Godo, S. (2020). Nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization mediated by hydrogen peroxide in health and disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 127, 92-101. doi: 10.1111/bcpt.13377
- Silva-Filho, J. L., Souza, M. C., Henriques, M., Morrot, A., Savino, W., Nunes, M. P., Caruso-Neves, C. and Pinheiro, A. A. (2011). AT1 receptor-mediated angiotensin II activation and chemotaxis of T lymphocytes. *Mol Immunol*, 48, 1835-43. doi: 10.1016/j.molimm.2011.05.008
- Silver, R. B., Reid, A. C., Mackins, C. J., Askwith, T., Schaefer, U., Herzlinger, D. and Levi, R. (2004). Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13607-12. doi: 10.1073/pnas.0403208101
- Sofola, O. A., Knill, A., Hainsworth, R. and Drinkhill, M. (2002). Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol*, 543, 255-60. doi: 10.1113/jphysiol.2002.022277
- Soler, M. J., Wysocki, J. and Battle, D. (2013). ACE2 alterations in kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 28, 2687-97. doi: 10.1093/ndt/gft320
- Steckelings, U. M., Kaschina, E. and Unger, T. (2005). The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides*, 26, 1401-9. doi: 10.1016/j.peptides.2005.03.010

- Stoll, M., Steckelings, U. M., Paul, M., Bottari, S. P., Metzger, R. and Unger, T. (1995). The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*, 95, 651-7. doi: 10.1172/JCI117710
- Stuehr, D., Pou, S. and Rosen, G. M. (2001). Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*, 276, 14533-6. doi: 10.1074/jbc.R100011200
- Suzuki, A., Tomita, H. and Okada, H. (2022). Form follows function: The endothelial glycocalyx. *Transl Res*, 247, 158-167. doi: 10.1016/j.trsl.2022.03.014
- Sylvester, F. A., Stepp, D. W., Frisbee, J. C. and Lombard, J. H. (2002). High-salt diet depresses acetylcholine reactivity proximal to NOS activation in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H353-63. doi: 10.1152/ajpheart.00127.2002
- Takahashi, H., Nakanishi, T., Nishimura, M., Tanaka, H. and Yoshimura, M. (1992). Effects of endothelin-1 and inhibition of nitric oxide production with NG-monomethyl-L-arginine on arterial pressure and regional blood flow in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 20 Suppl 12, S176-8. doi: 10.1097/00005344-199204002-00049
- Takaki, A., Morikawa, K., Tsutsui, M., Murayama, Y., Tekes, E., Yamagishi, H., Ohashi, J., Yada, T., Yanagihara, N. and Shimokawa, H. (2008). Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med*, 205, 2053-63. doi: 10.1084/jem.20080106
- Tang, X., Edwards, E. M., Holmes, B. B., Falck, J. R. and Campbell, W. B. (2006). Role of phospholipase C and diacylglyceride lipase pathway in arachidonic acid release and acetylcholine-induced vascular relaxation in rabbit aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H37-45. doi: 10.1152/ajpheart.00491.2005
- Tantisattamo, E., Dafoe, D. C., Reddy, U. G., Ichii, H., Rhee, C. M., Streja, E., Landman, J. and Kalantar-Zadeh, K. (2019). Current Management of Patients With Acquired Solitary Kidney. *Kidney Int Rep*, 4, 1205-1218. doi: 10.1016/j.ekir.2019.07.001
- Tateishi, J. and Faber, J. E. (1995). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate alpha 2D-adrenergic receptor contraction of arteriolar smooth muscle and reversal of contraction by hypoxia. *Circ Res*, 76, 53-63. doi: 10.1161/01.res.76.1.53
- Thomas, W. G. and Mendelsohn, F. A. (2003). Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 774-9. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00263-7
- Titze, J. and Machnik, A. (2010). Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 19, 385-92. doi: 10.1097/MNH.0b013e32833aeb3b
- Tykowski, A., Filipiak, K. J., Januszewicz, A., Litwin, M., Narkiewicz, K., Prejbisz, A., Ostalska-Nowicka, D., Widecka, K. and Kostka-Jeziorny, K. (2019). Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym — 2019 rok. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce*, 5, 1-86. doi:
- Ufnal, M., Jazwiec, R., Dadlez, M., Drapala, A., Sikora, M. and Skrzypecki, J. (2014). Trimethylamine-N-oxide: a carnitine-derived metabolite that prolongs the hypertensive effect of angiotensin II in rats. *Can J Cardiol*, 30, 1700-5. doi: 10.1016/j.cjca.2014.09.010
- Ufnal, M., Zadło, A. and Ostaszewski, R. (2015). TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition*, 31, 1317-23. doi: 10.1016/j.nut.2015.05.006
- Urata, H. (2000). Pathological involvement of chymase-dependent angiotensin II formation in the development of cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1, S35-7. doi: 10.3317/jraas.2000.054
- Urata, H., Boehm, K. D., Philip, A., Kinoshita, A., Gabrovsek, J., Bumpus, F. M. and Husain, A. (1993). Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest*, 91, 1269-81. doi: 10.1172/JCI116325
- Urata, H., Healy, B., Stewart, R. W., Bumpus, F. M. and Husain, A. (1990a). Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res*, 66, 883-90. doi: 10.1161/01.res.66.4.883
- Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K. S., Bumpus, F. M. and Husain, A. (1990b). Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*, 265, 22348-57. doi:
- Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, 13, 658-67. doi: 10.1161/01.hyp.13.6.658



- Vaziri, N. D., Wong, J., Pahl, M., Piceno, Y. M., Yuan, J., Desantis, T. Z., Ni, Z., Nguyen, T. H. and Andersen, G. L. (2013). Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int*, 83, 308-15. doi: 10.1038/ki.2012.345
- Vegter, S., Perna, A., Postma, M. J., Navis, G., Remuzzi, G. and Ruggenenti, P. (2012). Sodium intake, ACE inhibition, and progression to ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 23, 165-73. doi: 10.1681/ASN.2011040430
- Vinaiphat, A., Pazhanchamy, K., Jebamercy, G., Ngan, S. C., Leow, M. K., Ho, H. H., Gao, Y. G., Lim, K. L., Richards, A. M., De Kleijn, D. P. V., Chen, C. P., Kalaria, R. N., Liu, J., O'leary, D. D., Mccarthy, N. E. and Sze, S. K. (2023). Endothelial Damage Arising From High Salt Hypertension Is Elucidated by Vascular Bed Systematic Profiling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 43, 427-442. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.318439
- Wal, P., Wal, A., Rai, A. K. and Dixit, A. (2011). Aliskiren: An orally active renin inhibitor. *J Pharm Bioallied Sci*, 3, 189-93. doi: 10.4103/0975-7406.80764
- Wang, D. H. and Du, Y. (1998). Regulation of vascular type 1 angiotensin II receptor in hypertension and sodium loading: role of angiotensin II. *J Hypertens*, 16, 467-75. doi: 10.1097/00004872-199816040-00008
- Wang, Z., Tang, W. H., Buffa, J. A., Fu, X., Britt, E. B., Koeth, R. A., Levison, B. S., Fan, Y., Wu, Y. and Hazen, S. L. (2014). Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J*, 35, 904-10. doi: 10.1093/eurheartj/ehu002
- Wasilewski, J., Kiljański, T., Mirolta, K. and Głowacki, J. (2012). Znaczenie naprężeń ścinających i rola numerycznej mechaniki płynów w badaniach nad patomechanizmem miażdżycy. *Folia Cardiologica*, 7, 95-100. doi:
- Weber, D. S., Frisbee, J. C. and Lombard, J. H. (1999). Selective potentiation of angiotensin-induced constriction of skeletal muscle resistance arteries by chronic elevations in dietary salt intake. *Microvasc Res*, 57, 310-9. doi: 10.1006/mvre.1999.2147
- Weber, D. S. and Lombard, J. H. (2000). Elevated salt intake impairs dilation of rat skeletal muscle resistance arteries via ANG II suppression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278, H500-6. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.2.H500
- Wei, C. C., Hase, N., Inoue, Y., Bradley, E. W., Yahiro, E., Li, M., Naqvi, N., Powell, P. C., Shi, K., Takahashi, Y., Saku, K., Urata, H., Dell'italia, L. J. and Husain, A. (2010). Mast cell chymase limits the cardiac efficacy of Ang I-converting enzyme inhibitor therapy in rodents. *J Clin Invest*, 120, 1229-39. doi: 10.1172/JCI39345
- Wei, C. C., Tian, B., Perry, G., Meng, Q. C., Chen, Y. F., Oparil, S. and Dell'italia, L. J. (2002). Differential ANG II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282, H2254-8. doi: 10.1152/ajpheart.00191.2001
- Wei, R., Lunn, S. E., Tam, R., Gust, S. L., Classen, B., Kerr, P. M. and Plane, F. (2018). Vasoconstrictor stimulus determines the functional contribution of myoendothelial feedback to mesenteric arterial tone. *J Physiol*, 596, 1181-1197. doi: 10.1113/JP274797
- Weinbaum, S., Tarbell, J. M. and Damiano, E. R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*, 9, 121-67. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959
- Weinberg, M. S., Weinberg, A. J. and Zappe, D. H. (2000). Effectively targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular and renal disease: rationale for using angiotensin II receptor blockers in combination with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 1, 217-33. doi: 10.3317/jraas.2000.034
- Weir, M. R. and Fink, J. C. (2005). Salt intake and progression of chronic kidney disease: an overlooked modifiable exposure? A commentary. *Am J Kidney Dis*, 45, 176-88. doi:
- Westcott, E. B. and Segal, S. S. (2013). Perivascular innervation: a multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling. *Microcirculation*, 20, 217-38. doi: 10.1111/micc.12035
- Wharton, J., Morgan, K., Rutherford, R. A., Catravas, J. D., Chester, A., Whitehead, B. F., De Leval, M. R., Yacoub, M. H. and Polak, J. M. (1998). Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 323-36. doi:
- Wilck, N., Matus, M. G., Kearney, S. M., Olesen, S. W., Forslund, K., Bartolomaeus, H., Haase, S., Mahler, A., Balogh, A., Marko, L., Vvedenskaya, O., Kleiner, F. H., Tsvetkov, D., Klug, L.,

- Costea, P. I., Sunagawa, S., Maier, L., Rakova, N., Schatz, V., Neubert, P., Fratzer, C., Krannich, A., Gollasch, M., Grohme, D. A., Corte-Real, B. F., Gerlach, R. G., Basic, M., Typas, A., Wu, C., Titze, J. M., Jantsch, J., Boschmann, M., Dechend, R., Kleinewietfeld, M., Kempa, S., Bork, P., Linker, R. A., Alm, E. J. and Muller, D. N. (2017). Salt-responsive gut commensal modulates T(H)17 axis and disease. *Nature*, 551, 585-589. doi: 10.1038/nature24628
- World Health Organization 2014. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization.
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A. and Kuchroo, V. K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*, 496, 513-7. doi: 10.1038/nature11984
- Yang, T. and Du, Y. (2012). Distinct roles of central and peripheral prostaglandin E2 and EP subtypes in blood pressure regulation. *Am J Hypertens*, 25, 1042-9. doi: 10.1038/ajh.2012.67
- Yasuda, N., Akazawa, H., Qin, Y., Zou, Y. and Komuro, I. (2008). A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1-receptor activation without the involvement of angiotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377, 393-9. doi: 10.1007/s00210-007-0215-1
- Yasue, S., Masuzaki, H., Okada, S., Ishii, T., Kozuka, C., Tanaka, T., Fujikura, J., Ebihara, K., Hosoda, K., Katsurada, A., Ohashi, N., Urushihara, M., Kobori, H., Morimoto, N., Kawazoe, T., Naitoh, M., Okada, M., Sakaue, H., Suzuki, S. and Nakao, K. (2010). Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy. *Am J Hypertens*, 23, 425-31. doi: 10.1038/ajh.2009.263
- Yiannikouris, F., Karounos, M., Charnigo, R., English, V. L., Rateri, D. L., Daugherty, A. and Cassis, L. A. (2012). Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302, R244-51. doi: 10.1152/ajpregu.00323.2011
- Yoon, S. S., Burt, V., Louis, T. and Carroll, M. D. (2012). Hypertension among adults in the United States, 2009-2010. *NCHS Data Brief*, 1-8. doi:
- You, J., Johnson, T. D., Marrelli, S. P., Mombouli, J. V. and Bryan, R. M., Jr. (1999). P2u receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor from cerebrovascular endothelium in rats. *Stroke*, 30, 1125-33. doi: 10.1161/01.str.30.5.1125
- Zhang, D., Li, L., Chen, Y., Ma, J., Yang, Y., Aodeng, S., Cui, Q., Wen, K., Xiao, M., Xie, J., Xu, Y. and Li, Y. (2021). Syndecan-1, an indicator of endothelial glycocalyx degradation, predicts outcome of patients admitted to an ICU with COVID-19. *Mol Med*, 27, 151. doi: 10.1186/s10020-021-00412-1
- Zhao, T. V., Li, Y., Liu, X., Xia, S., Shi, P., Li, L., Chen, Z., Yin, C., Eriguchi, M., Chen, Y., Bernstein, E. A., Giani, J. F., Bernstein, K. E. and Shen, X. Z. (2019). ATP release drives heightened immune responses associated with hypertension. *Sci Immunol*, 4. doi: 10.1126/sciimmunol.aau6426
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M. and Leung, S. W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*, 129, 83-94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002
- Zupcic, A., Slezak, P. and Radloff, J. 2023. The Gastrointestinal Microbiota as a Potential Cause and Target in Chronic Kidney Disease Accentuating Treatment and Intervention Strategies. *Applied Sciences* [Online], 13.