

mgr inż. Iwona Baranowska

**„OCENA WPŁYWU CHRONICZNEGO BLOKOWANIA NIEZALEŻNYCH OD ACE  
SZLAKÓW KONWERSJI ANGIOTENSYNY W DOŚWIADCZALNYM  
NADCIŚNIENIU TĘTNICZYM”**

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

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Kompanowska-Jezierska

Promotor pomocniczy: dr inż. Olga Gawryś



 Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego



Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący  
2012-2017

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

Warszawa 2018

## Streszczenie

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

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

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

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

Jako inhibitora niezależnych od ACE szlaków powstawania angiotensyny II zastosowano innowacyjne, syntetyczne peptydy RIY (Arginina-Izoleucyna-Tyrozyna) oraz

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

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

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

Analiza wyników otrzymanych u młodych zwierząt po zablokowaniu chymazy nie wskazuje na jej kluczową rolę w rozwoju nadciśnienia. Chymostatyna i peptydowe inhibitory chymazy mogły przyczynić się do pewnego zahamowania progresji choroby,

ale obserwowane efekty były dość subtelne. Dodatkowo analiza wyników była utrudniona ze względu na silniejsze zmiany w grupach otrzymujących roztwory kontrolne.

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

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

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

Wydaje się, że brak zakładanej (i zbliżonej do RIY) skuteczności pochodzącego z nasion rzepaku peptydu VWIS wynika z jego rozpadu w układzie pokarmowym i krwionośnym do fragmentów, z których VW jest co prawda słabym blokerem ACE (dane literaturowe), ale nie posiada takich właściwości wobec chymazy (pokazane w dysertacji

badania *in vitro*). W związku z powyższym blokowanie tylko jednego ze szlaków, może w układzie przewlekłym prowadzić do uruchomienia alternatywnego szlaku konwersji angiotensyny, tj. chymazy. Co więcej, w założonej przez nas hipotezie to właśnie tkankowe powstawanie Ang II w warunkach patologicznych ma kluczowe znaczenie dla uszkodzenia narządów i dalszej progresji nadciśnienia.

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

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

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