

## Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: Agnieszka Walkowska
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/~~artystyczne~~ – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:  
2000 – magister biologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
2003 – doktor nauk medycznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Zakład Fizjologii Stosowanej i Klinicznej PAN, Warszawa  
Tytuł rozprawy doktorskiej:  
„Tlenek azotu i unerwienie współczulne: rola w regulacji ukrwienia i czynności wydalniczej nerki szczura.”
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/~~artystycznych~~.

Od 1993 - Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Zakład Fizjologii Stosowanej i Klinicznej, Pracownia Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych potem Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/~~artystycznego~~,

**Nerwy nerkowe, tlenek azotu i cytochrom P-450 w regulacji funkcji nerek i w kontroli ciśnienia tętniczego u szczurów normotensyjnych i w doświadczalnym nadciśnieniu**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. **Walkowska A, Bądryńska B, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J.**  
Effects of renal nerve stimulation on intrarenal blood flow in rats with intact or inactivated NO synthases.  
*Acta Physiol Scand.*, 182, 313-318, 2005  
IF<sub>(2006)</sub> = 2.865

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na: 75%*

**2. Bagnall NM, Dent PC, Walkowska A, Sadowski J, Johns EJ.**  
Nitric oxide inhibition and the impact on renal nerve-mediated antinatriuresis and antidiuresis in the anaesthetised rat.  
*Journal of Physiology (London)*, 569, 849-856, 2005  
IF (2006) - 4,364

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz częściowym przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na: 30%*

**3. Walkowska A, Škaroupková P, Husková Z, Vaňourková Z, Čertíková-Chábová V, Tesař V, Kramer HJ, Falck JR, Imig JD, Kompanowska-Jeziarska J, Sadowski J, Červenka L.**  
Intrarenal CYP-450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of the nonclipped kidney function in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats.  
*Journal of Hypertension*, 28, 582-593, 2010  
IF (2011) = 3.980

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczeń, nadzorze nad pozostałymi doświadczeniami, na opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na: 55%*

**4. Čertíková Chábova V, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kujal P, Vernerová Z, Vaňourková Z, Kopkan L, Kramer HJ, Falck JR, Imig JD, Hammock BD, Vaněčková I, Červenka L.**  
Combined inhibition of 20- hydroxyeicosatetraenoic acid formation and of epoxyeicosatrienoic acids degradation attenuates hypertension and hypertension induced end-organ damage in Ren-2 transgenic rats.  
*Clinical Science*, 118, 617-632, 2010  
IF (2011) = 4,613

**Zgodnie z adnotacją na stronie tytułowej, jestem, wspólnie z C.C.V., równorzędnym pierwszym autorem tej publikacji.**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na: 45%*

**5. Walkowska A, Sadowski J, Kompanowska-Jeziarska E.**  
Oxidative stress and neuronal NOS activity: putative determinants of rapid hypertensive response to renal denervation in anaesthetised rats.  
*Physiological Research*, 62(3), 257-266, 2013  
IF (2012) = 1,555

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu wszystkich doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na: 75%*

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Nerwy nerkowe, tlenek azotu i cytochrom P-450 w regulacji funkcji nerek i w kontroli ciśnienia tętniczego u szczurów normotensyjnych i w doświadczalnym nadciśnieniu

W problematyce cyklu można wyróżnić dwa powiązane nurty tematyczne:

(I). Zakres pierwszego (**publikacje**<sup>1,2,5</sup>) to badania - na zdrowych zwierzętach - roli układów: pobudzającego (współczulne nerwy nerkowe) oraz antagonizującego (tlenek azotu) układ renina-angiotensyna (RAS). Nowsze badania (5) nawiązują tu także do co najmniej równie ważnej roli enzymów generujących wolne rodniki tlenowe. Znaczenie powyższych prac wynika m.in. z tego, że nadmierna aktywność RAS to kluczowe ogniwo w patogenezie wielu form nadciśnienia tętniczego. Ponieważ zmiany ukrwienia nerki (szczególnie jej rdzenia) oraz tempa wydalania nerkowego soli i wody mają istotne znaczenie w regulacji ciśnienia tętniczego (Guyton i wsp., 1990, Cowley 1992), poświęcono im w tych pracach wiele uwagi. Badania przeprowadzono w macierzystej Pracowni (obecnie Zakład) Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych i w części w Zakładzie Fizjologii University College Cork (Irlandia).

(II). Wyniki badań fizjologicznych prowadzonych u szczurów normotensyjnych zachęcały do zrobienia kolejnego kroku i zbadania czy nadciśnienie zależne od doświadczalnej aktywacji RAS (dwa różne modele) można obniżyć modyfikując aktywność czynników wazoaktywnych innych niż impulsacja współczulna i NO: pochodnych kwasu arachidonowego generowanych przez enzymy zależne od cytochromu P-450. Takie badania wymagają podejścia multidyscyplinarnego, z udziałem wielu badaczy i bazy laboratoryjnej wyspecjalizowanych ośrodków hipertensjologicznych; udało mi się w nich w sposób istotny uczestniczyć w ramach dwóch projektów (**publikacje**<sup>3,4</sup>) prowadzonych i koordynowanych przez wiodący w tej dziedzinie zespół z Pragi czeskiej. Obie prace uzyskały nagrodę

Dyrektora mojego Instytutu za artykuły opublikowane w najwyżej notowanych czasopismach międzynarodowych.

## Część I

Czynność wydalnicza nerek ma zasadnicze znaczenie dla utrzymania homeostazy płynów ustrojowych. Wydalanie przebiega pod kontrolą czynników pozanerkowych (wpływy hormonalne i nerwowe) oraz w sposób autonomiczny, poprzez syntezę miejscowo działających regulatorów, takich jak *NO*, produkty metabolizmu kwasu arachidonowego, szczególnie szlaku cyklooksygenaz prostaglandynowych i enzymów zależnych od cytochromu P-450.

Działanie poszczególnych czynników jest często przeciwstawne: aktywność nerwów nerkowych i tlenek azotu (*NO*) działają w przeciwnym kierunku, zarówno w obrębie naczyń jak i kanalików nerkowych. Na unerwienie nerki składają się przede wszystkim włókna adrenergiczne układu współczulnego a uwalniana na ich zakończeniach noradrenalina powoduje skurcz naczyń. Ponadto, działając poprzez receptory  $\alpha_1$ -adrenergiczne w obrębie kanalików nerkowych, noradrenalina nasila reabsorpcję sodu obniżając w ten sposób jego wydalanie. Niezależnie od bezpośredniego działania na naczynia i kanaliki, noradrenalina poprzez receptory  $\beta$ -adrenergiczne stymuluje układ renina-angiotensyna a powstająca angiotensyna II (*Ang II*) działa silnie naczyniokurcząco i zwiększa reabsorpcję kanalikową sodu. Tlenek azotu ma działanie przeciwstawne: powoduje rozkurcz naczyń, zwiększając wewnątrznerkowy przepływ krwi oraz ma bezpośredni wpływ na transport jonów, hamując reabsorpcję w kanaliku proksymalnym i zbiorczym.

### Rola nerek w regulacji ciśnienia krwi

Wartość ciśnienia tętniczego krwi jest kontrolowana głównie przez działania układu nerwowego, szczególnie układu autonomicznego, oraz układu renina-angiotensyna-aldosteron, na napięcie naczyń oporowych i na czynność wydalniczą nerek decydującą o objętości i składzie płynów ustrojowych.

Procesy regulacji objętości płynów ustrojowych zależne od tempa wydalania nerkowego i regulacja czynności układu sercowo-naczyniowego i ciśnienia tętniczego krwi są ściśle powiązane. Tak na przykład w myśl teorii Guytona wzrost ciśnienia krwi prowadzi do zwiększenia wydalania chlorku sodu (Guyton i wsp., 1990). Nawet niewielkie zmiany

ciśnienia powodują dość znaczne wahania w wydalaniu, co jest mechanizmem zabezpieczającym stałość objętości wewnątrznaczyniowej i ciśnienia krwi. Zjawisko to jest określane jako diureza i natriureza z nadciśnienia (ang. pressure diuresis and pressure natriuresis). Według tej teorii u podłoża pierwotnego nadciśnienia leżą zaburzenia mechanizmów nerkowego wydalania wody i chlorku sodu.

Układ współczulny ma podstawowe znaczenie w krótkookresowej regulacji układu krążenia ale jego aktywacja może również mieć długookresowy wpływ na wysokość ciśnienia tętniczego. Jest to zarówno wpływ bezpośredni na napięcie naczyń oporowych jak i pośredni, poprzez stymulację układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Dzięki obecności receptorów  $\beta$ -adrenergicznych w aparacie przykłębuszkowym nerki układ współczulny zwiększa sekrecję reniny i powstawanie naczyniokurczącej Ang II. W regulacji ciśnienia krwi RAAS powiązany jest zarówno z kaskadą *NO* jak i wywodzącymi się z kwasu arachidonowego produktami enzymów zależnych od cytochromu P-450. Poza wpływem naczyniokurczącym angiotensyna II, bezpośrednio i za pośrednictwem stymulowanego przez nią aldosteronu, zwiększa reabsorpcję kanalikową sodu powodując wzrost objętości płynów ustrojowych i także podwyższenie ciśnienia krwi. Istotne znaczenie w regulacji ciśnienia ma interakcja układu współczulnego, *NO* i RAAS z układem enzymów generujących wolne rodniki tlenowe (ang. reactive oxygen species, ROS), których nadprodukcja prowadzi do stresu oksydacyjnego. Stan ten prowadzi do wzrostu oporów naczyniowych, m.i. poprzez ograniczenie biodostępności *NO* ale też poprzez stymulację produkcji AngII. Zwiększona jej aktywność dalej stymuluje produkcję ROS (*circulus vitiosus* lub dodatnie sprzężenie zwrotne). Wiadomo także, że zwiększając ekspresję receptora dla Ang II (AT1R), ROS nasilają reabsorpcję sodu w kanalikach nerkowych.

Działanie *NO*, w zasadzie przeciwstawne do wpływu Ang II, ma w rzeczywistości charakter dosyć złożony (Romero i Stick, 1993). Oprócz wspomnianego wcześniej bezpośredniego wpływu naczyniorozszerzającego stwierdzono, że *NO* bezpośrednio modyfikuje aktywność RAAS. *NO* pochodzący z syntazy endotelialnej (eNOS) hamuje sekrecję reniny podczas gdy *NO* pochodzący z syntazy neuronalnej (nNOS) działa pobudzająco (Tojo i wsp., 1994).

Wymienione wyżej układy i czynniki były przedmiotem mojego zainteresowania w pracach należących do I nurtu badawczego (1, 2, 5). Ostatnie dwie dekady przyniosły wiedzę, ciągle narastającą, dotyczącą roli innych jeszcze układów regulacyjnych w kontroli BP. Istnieje także zależność między układem RAAS a aktywnymi metabolitami z szlaku

cytochromu P-450 : Ang II stymuluje syntezę naczyniokurczącego 20-HETE (Roman, 2002) a NO antagonizuje jego działanie naczyniokurczące (o tym szerzej w części II).

### Uwagi o metodyce

Prowadzone badania mieściły się w obszarze szeroko rozumianej fizjologii integracyjnej i narządowej, co uzasadniało wybór zastosowanych metod badawczych i pomiarowych. W niemal wszystkich doświadczeniach prowadzono pomiary ukrwienia nerki *in situ*, u narkotyzowanych szczurów wybranych szczepów. Do pomiaru całkowitego przepływu krwi przez nerkę (RBF – renal blood flow) używano przepływomierza ultradźwiękowego firmy Transonic z sondą okołonaczyniową zakładaną na tętnicę nerkową. Do badania ukrwienia poszczególnych warstw nerki używano sond laserowo-Dopplerowskich umieszczanych na powierzchni nerki, do pomiaru ukrwienia kory (cortical blood flow, CBF). Laserowo-Dopplerowskie sondy igłowe wkłuwano do nerki na głębokość odpowiednią dla mierzenia ukrwienia rdzenia zewnętrznego (outer medullary blood flow, OMBF) i wewnętrznego (inner medullary blood flow, IMBF). Sondy współpracowały z wielokanałowym miernikiem przepływu krwi firmy Perimed.

Stymulację elektryczną nerwów nerkowych u szczura przeprowadzano w sposób typowy, stosując wymagany w takich badaniach zakres częstotliwości. Odnerwienie nerki szczura przeprowadzano za pomocą opracowanej w naszym Zakładzie małoinwazyjnej metody umożliwiającej niemal natychmiastową obserwację zmian hemodynamiki nerek i innych parametrów czynnościowych, szczególnie ciśnienia krwi (Kompanowska-Jeziarska i wsp., 2001).

\* \* \*

Nerka jest unerwiona przez nerwy eferentne układu współczulnego, które wywodzą się głównie ze zwoju trzewnego. Zakończenia włókien nerwowych znaleziono m.i. w ścianach tętniczek doprowadzających i odprowadzających kłębuszków. Wykazano też bezpośredni kontakt między zakończeniami nerwowymi a błoną podstawno-boczną komórek nabłonka kanalików nerkowych (DiBona i wsp., 1977) co jest podstawą znanego bezpośredniego wpływu aktywności nerwów na transport kanalikowy.

Funkcjonowanie nerwów nerkowych można badać zarówno poprzez stymulację nerwów nerkowych jak i odnerwienie czyli przerwanie impulsacji do- i odnerkowej. W

pierwszej pracy cyklu habilitacyjnego (**Publikacja<sup>1</sup>**) postanowiłam zbadać czy naczyniorozszerzający *NO* przeciwdziała obniżeniu perfuzji nerki po stymulacji elektrycznej współczulnych nerwów nerkowych (renal nerve stimulation, RNS). Jak wiadomo, stymulacja nerwów nerkowych prądem o niskiej częstotliwości powoduje uwolnienie reniny oraz zwiększenie reabsorpcji sodu. Podwyższenie częstotliwości wywołuje ponadto skurcz naczyń wewnątrznerkowych (DiBona i Kopp, 1997). Odpowiedzią na to jest uruchomienie mechanizmów kompensacyjnych przeciwdziałających obniżeniu przepływu krwi przez nerkę a jednym z czynników naczyniorozszerzających mógłby być *NO*. Celem doświadczeń było sprawdzenie zależności zmian całkowitego przepływu krwi przez nerkę oraz ukrwienia obu warstw rdzenia od częstotliwości stymulacji (2; 3,5; 5; 7,5 Hz) oraz ustalenie roli *NO* jako potencjalnego czynnika buforującego obniżenie perfuzji nerki.

Gdy stymulacja nerwów nie była poprzedzona podaniem inhibitora syntezy *NO*, wszystkie parametry hemodynamiki nerek (RBF, OMBF i IMBF) obniżały się proporcjonalnie do rosnącej częstotliwości prądu. Odpowiedź na stymulację elektryczną nerwów była najslabsza ze strony rdzenia wewnętrznego (IMBF), co jest to zgodne z obserwacjami innych badaczy (Leonard i wsp., 2001) a także, pośrednio, z wynikami badań z naszego ośrodka: po ostrym odnerwienie nerki, przy rosnącym przepływie krwi przez korę nie zaobserwowano większego wpływu na ukrwienie rdzenia wewnętrznego (Kompanowska - Jeziarska i wsp., 2001). W naszych doświadczeniach stymulacja obniżyła IMBF znacznie mniej niż OMBF co sugeruje, że ukrwienie tych obszarów rdzenia może być regulowane niezależnie. Niższa wrażliwość rdzenia wewnętrznego nerki na bodźce nerwowe nie jest do końca wyjaśniona: mogłaby zależeć od mniejszej liczby zakończeń nerwowych lub bardziej efektywnego buforowania wpływów nerwowych przez czynnik naczyniorozszerzający, taki jak *NO*.

W nerce zidentyfikowano wszystkie trzy izoformy syntazy tlenu azotu. Syntaza endotelialna (eNOS) jest wykrywana w śródbłonku naczyń nerkowych i kapilarach kłębuszka. Syntaza neuronalna (nNOS) jest znajdowana w okolicy zakończeń włókien nerwowych biegnących w sąsiedztwie naczyń oraz włóknach dochodzących do miedniczki nerkowej oraz w kanalikach nerkowych, między innymi w płamce gęstej. Miejscem najwyższej podstawowej ekspresji mRNA dla iNOS jest w nerce rdzeniowy odcinek ramienia wstępującego pętli Henlego.

Stosując nieselektywny i selektywny inhibitor syntezy *NO* chciałam zbadać, która izoforma NOS odgrywa tu decydującą rolę. Wpływ blokady syntezy *NO* na odpowiedź hemodynamiki nerek na stymulację nerwów nerkowych (RNS) był różny w różnych warstwach nerki. O ile dawka L-NAME zbliżona do maksymalnej (1,8 mg/kg) nasiliła obniżenie RBF (parametr stosowany tutaj jako przybliżona miara ukrwienia kory), nie wpływając na zmianę OMBF i IMBF, stymulacja nerwów po selektywnym zahamowaniu nNOS (S-methylthiocitruline, SMTTC) nie prowadziła do zmiany odpowiedzi RBF. O ile blokada nNOS nie wpłynęła na efekty stymulacji nerwowej w obrębie kory i rdzenia zewnętrznego, niespodziewanie zaobserwowano pogłębienie obniżenia IMBF. Jak już wspomniano wcześniej, to właśnie ukrwienie rdzenia wewnętrznego obniżyło się stosunkowo najmniej po RNS. Sugeruje to, że *NO* pochodzący z nNOS przeciwstawia się w części naczyniokurczącemu działaniu RNS szczególnie tej warstwie rdzenia, co jest zgodne z obserwacjami Zou i Cowleya (2000), którzy stwierdzili, że RNS może stymulować uwalnianie *NO*. Niejasne jest dlaczego nie obserwuje się podobnej reakcji po zablokowaniu wszystkich izoform *NO* za pomocą L-NAME. Uderzające jest, że w naszych wcześniejszych badaniach po ostrym odnerwieniu nerki IMBF wracał do poziomu sprzed blokady nNOS natomiast nie obserwowano takiego przywrócenia w przypadku zastosowania nieselektywnej blokady wszystkich izoform (Walkowska i wsp., 2004). Kolejna dekada badań w tej dziedzinie nie przyniosła wyjaśnienia tej zagadki. Możliwe, że za kontrolę krążenia wewnątrznerkowego odpowiada kompleksowe działanie *NO* pochodzącego z syntazy neuronalnej tlenku azotu, *NO* pochodzącego z syntazy endotelialnej oraz z zakończeń włókien nitrergiczných wykrywanych w różnych strukturach nerki. Reasumując, w warunkach aktywnej syntezy *NO* ukrwienie rdzenia wewnętrznego nie podlega depresyjnemu działaniu RNS w takim stopniu jak to obserwuje się w obrębie kory i rdzenia zewnętrznego. Choć wydaje się, że *NO* generowany przez wszystkie izoformy uczestniczy w buforowaniu wpływu elektrycznej stymulacji nerwów na ukrwienie nerek, w obrębie rdzenia wewnętrznego największe znaczenie ma prawdopodobnie *NO* pochodzący z nNOS.

Niezależnie od wpływu na napięcie naczyń, w obrębie nerki *NO* modyfikuje także transport kanalikowy sodu. Stymulacja nerwów nerkowych prądem o niskiej częstotliwości zwiększa uwalnianie reniny (Hesse i Johns, 1984) a niewielkie podwyższenie częstotliwości wywołuje dodatkowo zwiększenie reabsorpcji sodu w kanaliku proksymalnym (Bello-Reuss i wsp., 1976) i grubym ramieniu wstępującej części pętli Henlego (DiBona i Sawin, 1982). Wiele czynników autokrynych i parakrynych może wzmacniać lub zapobiegać wpływom



stymulacji nerwów na transport kanalikowy a jednym z nich jest właśnie *NO*. W badaniach mikropunkcyjnych wykazano, że podanie donora *NO* do kanalika proksymalnego prowadzi do obniżenia reabsorpcji proksymalnej a podanie L-NAME do jej wzrostu. Sugeruje to, że podstawowy poziom reabsorpcji proksymalnej jest pod tonicznym, hamującym wpływem *NO* (Ortiz i Garvin, 2002).

W kolejnej publikacji (**Publikacja<sup>2</sup>**) badano interakcje między *NO* i nerwami nerkowymi a dokładnie udział *NO* w procesie antydiurezy i antynatriurezy wywołanej przez RNS. Próbowano także ocenić rolę poszczególnych izoform NOS w tym procesie. W tym celu przed stymulacją nerwów nerkowych prądem o niskiej częstotliwości (0,5-1 Hz) podawano nieselektywne i selektywne inhibitory NOS. W grupie kontrolnej w reakcji na RNS diureza (*V*) i wydalanie sodu ( $U_{NaV}$ ) obniżyły się o 40-50%, przy jednoczesnym braku zmian w ciśnieniu tętniczym krwi, przepływie krwi przez nerkę i filtracji kłębuszkowej. W warunkach podstawowych po nieselektywnym zablokowaniu NOS za pomocą L-NAME (10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) nie zaobserwowano istotnych zmian w żadnym z badanych przez nas parametrów hemodynamicznych czy wydalniczych. Natomiast podanie L-NAME chroniło przed antydiurezą i antynatriurezą będącą następstwem RNS. Może to wskazywać na istnienie jeszcze dodatkowego mechanizmu działania *NO* na transport (poza wspomnianym hamowaniem reabsorpcji), np. jego stymulacja poprzez ułatwienie uwalniania noradrenaliny na zakończeniach włókien współczulnych.

Następnym krokiem było zbadanie, która izoforma NOS jest konieczna do efektywnej regulacji procesów reabsorpcji. Związek o symbolu 1400W wykazuje 500 razy większe powinowactwo do iNOS w porównaniu z eNOS. Podanie 1400W w dawce 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  nie zmieniło parametrów wyjściowych a efekt antydiuretyczny i antynatriuretyczny w odpowiedzi na RNS był identyczny jak w grupie kontrolnej. Indukowana izoforma NOS jest stale obecna w rdzeniu nerki ale nie wydaje się być zaangażowana w kontrolę wydalania nerkowego.

SMTC, selektywny inhibitor izoformy neuronalnej wykazuje 17 razy większe powinowactwo do nNOS niż do eNOS. Podanie tego inhibitora (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) spowodowało istotne statystycznie podwyższenie ciśnienia tętniczego krwi. Stymulacja nerwów na tle SMTC nie zmieniła nerkowych parametrów hemodynamicznych ale doprowadziła do nieznamiennego obniżenia diurezy i znamiennego obniżenia wydalania sodu (22%). Inhibitor

nNOS nie chronił w pełni przed zależną od stymulacji nerwowej antydiurezą i antynatriurezą. Zakładając, że zastosowana dawka SMTC nie hamowała powstawania *NO* z eNOS można sądzić, że zarówno *NO* pochodzące z eNOS jak i nNOS są zaangażowane w procesy transportu kanalikowego.

Jak widać, antagonizm nerwów nerkowych i *NO* w regulacji zarówno krążenia wewnątrznerkowego jak i transportu kanalikowego ma charakter złożony. *NO* generowany przez nNOS, wykrywany na zakończeniach nerwowych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym może modulować uwalnianie klasycznych neurotransmiterów, w tym noradrenaliny (Bredt i Snyder, 1992). Ocena roli nerwów nerkowych i *NO* w regulacji krążenia wewnątrznerkowego i transportu kanalikowego jest utrudniona ze względu na sprzeczność istniejących danych, które wskazują na stymulację (McKeogh i Brooks., 2001) lub hamowanie (Zaninger i wsp., 1995) aktywności współczulnych nerwów nerkowych przez *NO* pochodzący z nNOS. Z szeregu badań wynika także, że to właśnie *NO* pochodzący z izoformy neuronalnej może ograniczać uwalnianie noradrenaliny na synapsach nerwowych lub/i hamować eferentną impulsację synaptyczną („sympathetic outflow”) na wyższych piętrach układu nerwowego.

Odległym i trwałym następstwem odnerwienia nerek jest obniżenie ciśnienia tętniczego krwi, co obserwuje się zarówno u szczurów normotensyjnych jak i w wielu modelach nadciśnienia. Natomiast bezpośrednie (szybkie) efekty przerwania impulsacji współczulnej do nerek u szczurów narkotyzowanych mogą być różne. Przedmiotem kolejno omawianej tutaj pracy (**Publikacja 5**) było określenie wczesnego wpływu odnerwienia nerek na ciśnienie tętnicze krwi (BP) i hemodynamikę nerek w warunkach różnej podaży sodu w diecie oraz zbadanie jaką rolę w tym procesie odgrywa interakcja nerwów nerkowych i tlenu azotu produkowanego przez nNOS. Na szczurach stada Wistar, ostre odnerwienie kolejno prawej i lewej nerki, prowadziło w ciągu pierwszej godziny do znamiennego podwyższenia ciśnienia tętniczego krwi o 19%, 12%, i 6%, odpowiednio na diecie wysokosodowej (HS), niskosodowej (LS) i diecie o standardowej zawartości sodu (STD). Badanie zmian natychmiastowych, przed uruchomieniem większości mechanizmów kompensujących, było możliwe dzięki zastosowaniu metody opracowanej w naszym Zakładzie, polegającej na elektrokoagulacji tkanki zawierającej większość włókien nerwowych biegnących do nerki (Kompanowska-Jeziarska i wsp., 2001). Na tkankę tłuszczową i łączną zawierającą nerwy nerkowe wywodzące się ze zwoju trzewnego i

zmierzające w kierunku wnęki nerkowej zakładano wcześniej pętlę z cienkiego drutu stalowego, umożliwiającą później odnerwienie w wybranym momencie doświadczenia. Efektywność odnerwienia potwierdzono wykazując znikomą zawartość noradrenaliny w homogenacie odnerwionej nerki.

W naszej interpretacji, ostra hipertensyjna odpowiedź na odnerwienie mogła być spowodowana wzmożeniem aktywności współczulnej („sympatho-excitatory”), szczególnie w obrębie dogłowowo brzuszno-bocznego obszaru rdzenia przedłużonego (ang. rostral ventrolateral medulla, RVLm). W stanie stresu oksydacyjnego (będącego następstwem traumatyzującego doświadczonego zabiegu chirurgicznego oraz ekspozycji na dietę wysokosodową) wzmożona impulsacja afferentna z nerek ma hamujący wpływ na ten ośrodek a jej przerwanie poprzez odnerwienie powoduje wzrost aktywności nerwów współczulnych (sympathetic nerve activity, SNA) oraz wzrost obwodowego oporu naczyniowego.

Zastosowanie w doświadczeniach diety o zwiększonej lub zmniejszonej zawartości sodu zasadniczo zmieniło warunki doświadczenia i stan czynnościowy ustroju. Można było oczekiwać, że zwiększając lub zmniejszając podaż sodu spowodujemy zakłócenia przeciwnie skierowane, jednak okazało się, że obie sytuacje warunkowały wzrost ciśnienia po odnerwieniu. Jaki był wspólny mianownik tych przeciwstawnych manipulacji dietą? Z danych z literatury wynika, że ekspozycja zarówno na dietę wysoko- jak i niskosodową prowadzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego. Na diecie niskosodowej stres jest mediowany przez rosnący poziom Ang II w osoczu natomiast na diecie wysokosodowej mechanizm prowadzący do wzrostu aktywności wolnych aktywnych rodników tlenowych (ROS) jest bardziej skomplikowany i pozostaje przedmiotem badań (Majid i Kopkan, 2007). Aby potwierdzić hipotezę, że to właśnie wysoki poziom wolnych rodników jest koniecznym warunkiem uzyskania hipertensyjnej odpowiedzi na odnerwienie nerek obniżyliśmy ten poziom za pomocą wymiatacza wolnych rodników (4-Hydrokso-Tempo lub TEMPOL). Okazało się, że zastosowanie TEMPOLU chroniło zwierzęta doświadczalne przed wzrostem ciśnienia tętniczego krwi na każdej z diet.

Nie tylko redukcja stresu oksydacyjnego przy pomocy wymiatacza wolnych rodników zapobiegała wzrostowi ciśnienia po odnerwieniu. Na diecie wysokosodowej i standardowej zablokowanie NO pochodzącego z izoformy neuronalnej NOS za pomocą L-NPA (N(omega)-propyl-L-arginine)) chroniło przed wzrostem ciśnienia w następstwie odnerwienia nerek. Nie był to wynik zaskakujący ponieważ wiadomo, że NO generowany przez nNOS jest mediatorem hamowania ośrodków w pniu mózgu kontrolujących impulsację

współczulną dochodzącą m.i. do oporowych naczyń obwodowych (Hansen i wsp., 1994). Niedobór hamującego mediatora mógł powodować wysoką wyjściową aktywność tych ośrodków (np. RVLM) czyli sytuację, w której dalsze odhamowanie (przecięcie hamujących afferentnych nerwów nerkowych) było już nieskuteczne, stąd brak zmiany napięcia naczyń obwodowych i wzrostu ciśnienia.

Zablokowanie nNOS mogło także znieść lub zredukować wzrost ciśnienia po odnerwieniu poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Ustalono, że nNOS jest ważnym źródłem wolnych rodników w warunkach stresu, kiedy ROS błyskawicznie wchodzi w reakcję ze szczególnie reaktywnym neuronalnym *NO* tworząc ONOO<sup>-</sup> (anion nadtlenoazotynowy). Nie tylko zmniejsza się wówczas biodostępność *NO* ale ONOO<sup>-</sup> uszkadza także NOS powodując rozłączenie podjednostki homodimerycznego enzymu: niesprzężona (uncoupled) NOS staje się źródłem anionorodnika ponadtlenkowego a nie tlenku azotu (kindling radical phenomenon) (Sun i wsp., 2008).

Uzyskane wyniki są szczególnie interesujące w kontekście stosowanych obecnie w klinice zabiegów odnerwienia nerek za pomocą ablacji nerwów biegnących w ścianach tętnic nerkowych przy życiu fal o częstotliwości radiowej. U pacjentów z utrzymującym się bardzo wysokim ciśnieniem tętniczym krwi, opornym na leczenie farmakologiczne, po zabiegu obserwuje się obniżenie i ustabilizowanie ciśnienia (Simplicity HTN-1 investigators, 2011). Biorąc pod uwagę fakt, że pacjenci ci są często obciążeni wieloma schorzeniami, którym towarzyszy podwyższony poziom stresu oksydacyjnego, nasze badania wskazują na możliwe niepożądane reakcje w pierwszej fazie po przerwaniu impulsacji w nerwach nerkowych. W najnowszych doniesieniach opisywano rzeczywiście przypadki, w których po zastosowaniu odnerwienia pojawiały się krótkotrwałe epizody nadciśnieniowe (Brinkmann i wsp., 2012).

## Część II

Jak już sprecyzowano na samym wstępie, przedmiotem prac będących podstawą publikacji<sup>3</sup> i<sup>4</sup> było zbadanie czy nadciśnienie zależne od aktywacji RAS (dwa różne modele doświadczalne) można obniżyć modyfikując aktywność substancji wazoaktywnych generowanych przez enzymy zależne od cytochromu P-450.

## **Metodyka: zastosowane modele nadciśnienia**

*Model goldblatowski.* Chociaż zwężenie tętnicy nerkowej stanowi przyczynę zaledwie 1 do 4% wszystkich przypadków nadciśnienia u ludzi, model zwężeniowy stosuje się, począwszy od klasycznego opisu przez Goldblatta bardzo powszechnie w celu podwyższenia ciśnienia u zwierząt doświadczalnych (Goldblatt i wsp., 1934). W przypadku obustronnego zwężenia (model two-kidney, two-clip; 2K2C) główną rolę w tym podwyższeniu odgrywają mechanizmy związane z zahamowaniem wydalania i zatrzymywaniem sodu w ustroju natomiast przy zwężeniu tętnicy jednej nerki (2K1C - model two-kidney, one-clip) główną przyczyną rozwoju nadciśnienia jest wzmożona aktywność układu renina-angiotensyna-aldosteron. Istotą modelu 2K1C jest wywołanie niedokrwienia nerki poprzez założenie różnego typu zacisków na tętnicę nerkową zwierząt doświadczalnych. Umieszczenie zacisku ma za zadanie obniżenie perfuzji nerkowej co powoduje wzrost wydzielania reniny z nerki bez zacisku. Bezpośrednim tego następstwem jest podwyższenie stężenia krążącej Ang II i wzrost obwodowego oporu naczyniowego co prowadzi do wzrostu ciśnienia krwi; zmiany te są typowe dla początkowego okresu po założeniu zacisku. W odpowiedzi na wzrastające ciśnienie tętnicze krwi przeciwległa nerka (bez zacisku) „dąży” do pozbycia się sodu, na zasadzie mechanizmu natriurezy z nadciśnienia (pressure natriuresis).

*Model genetyczny.* Wykorzystano w badaniach szczury transgeniczne z dodatkowym mysim genem dla reniny: TGR(mRen2)<sup>27</sup> (Mullins i wsp., 1990). Szczep ten charakteryzują się wysokim ciśnieniem tętniczym krwi, niskim poziomem krążącej aktywnej reniny i obniżonym poziomem reniny w nerce.

W związku z tym, że w modelu goldblatowskim w fazie utrwalonego nadciśnienia stężenie Ang II wraca do poziomu obserwowanego u szczurów normotensyjnych, wydaje się, że RAAS nie jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za występowanie nadciśnienia w tym modelu. Istnieje ścisły, funkcjonalny związek między Ang II a kwasem 20-hydroksyeikozatetraenowym (20-HETE), substancją genrowaną z kwasu arachidonowego przez enzymy zależne od cytochromu P-450 (Roman, 2002). W nerce funkcjonują dwa szlaki monoooksygenacji kwasu arachidonowego zależne od cytochromu P-450: szlak  $\omega$ -hydroksylacji produkujący kwasy hydroksyeikozatetraenowe (związki typu HETE) oraz szlak epoksygenacji produkujący kwasy epoksyekozatrienowe (związki typu EETs, epoksydy).

20-HETE syntetyzowany jest przez komórki mięśni gładkich naczyń i wpływa wyłącznie na skurcz drobnych tętniczek o średnicy do 100  $\mu\text{m}$ . Wykazuje on ponadto działanie natriuretyczne poprzez hamowanie ATP-azy sodowo-potasowej i ko-transportu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  w ramieniu wstępującym pętli Henlego (Maier i Roman, 2001), przyczyniając się do większego wydalania sodu. EETs rozkurczają naczynia, zwiększając w nerce przepływ krwi i filtrację kłębuszkową. Wykazano różnice w kierunku działania różnych izoform związków EETs na krążenie nerkowe: 8,9-EET; 11,12-EET oraz 14,15-EET rozszerzają naczynia w mikrokrażeniu nerkowym, natomiast 5,6-EET działają naczyniokurcząco (Imig i wsp., 1996). EETs produkowane w kanaliku proksymalnym i zbiorczym działają lokalnie hamując reabsorpcję sodu i wody.

Zadaniem kolejnej pracy (**Publikacja**<sup>3</sup>) było zbadanie jak w modelu goldbłatowskim (wariant 2K1C) zmieniona aktywność 20-HETE i EETs może wpływać na funkcje przeciwległej (bez zacisku) nerki. Badania prowadzono na szczurach w fazie wstępnego nadciśnienia (zacisk zwężający tętnicę przez 7 dni) i nadciśnienia utrwalonego (zacisk zwężający tętnicę przez 27 dni).

Punktem wyjścia było zbadanie aktywności 20-HETE i EETs w modelu 2K1C. Ustalono, że u szczurów poddanych zwężeniu tętnicy nerkowej przez 27 dni wydalanie EETs w moczu jest znacząco niższe a 20-HETE wyższe w porównaniu z grupą kontrolną. Ponieważ aktywność epoksygenazy i poziom ekspresji CYP2C3 pozostały na tym samym poziomie co w grupie kontrolnej, wydaje się, że o obniżonym poziomie wydalania EETs w moczu decyduje zwiększona ich konwersja do DHETEs, które są niemal pozbawione działania naczyniorozszerzającego i natriuretycznego. Zahamowanie aktywności EETs w nerce za pomocą infuzji do tętnicy nerkowej MS-PPOH, specyficznego inhibitora, spowodowało obniżenie parametrów hemodynamicznych i wydalania sodu zarówno w grupie kontrolnej jak i we wstępnej fazie nadciśnienia reninozależnego - ale nie w fazie nadciśnienia utrwalonego. Natomiast zablokowanie wewnątrznerkowego 20-HETE za pomocą infuzji do t. nerkowej DDMS obniżyło wydalanie sodu (przy niezmiennych parametrach hemodynamicznych) w grupie kontrolnej, natomiast spowodowało wzrost parametrów hemodynamicznych nerek i wydalania sodu w modelu 2K1C.

Ustaliliśmy, że w modelu 2K1C, poziom Ang II zarówno w osoczu jak i nerce bez zacisku wzrastał w fazie wstępnej nadciśnienia, po czym w fazie utrwalonego nadciśnienia wracał w pobliże poziomu wyjściowego. Należy jednak podkreślić, że wobec znacznego

podwyższenia ciśnienia był to poziom nieadekwatnie wysoki. Pozostaje to w zgodzie z poglądem, że w modelu 2K1C nerka bez zacisku nie jest zdolna do obniżenia zwiększonej aktywności AngII w odpowiedzi na rosnący poziom ciśnienia. Uzyskane wyniki wskazują, że zmienione wytwarzanie i/lub aktywność metabolitów cytochromu P-450 w połączeniu z podwyższonym poziomem nerkowej AngII odgrywają kluczową rolę w patofizjologii utrwalonego goldblatowskiego nadciśnienia typu 2K1C.

W następnej pracy (**Publikacja** <sup>4</sup>) wykorzystano genetyczny model nadciśnienia u szczurów z zmodyfikowanym genem dla reniny (model TGR(mRen2)27). U szczurów szczepu TGR obserwuje się obniżony poziom aktywności układu RAA w osoczu, natomiast zwiększona jest produkcja Ang II w tkankach (szczególnie w nadnerczach, mózgu i ścianach naczyń krwionośnych). Ustalono także, że szczury te charakteryzują się zwiększoną wewnątrznerkową zawartością 20-HETE przy jednocześnie obniżonym poziomie EETs (Certikova-Chabova i wsp., 2007). Mimo iż 20-HETE działa natriuretycznie, wykazano niespodziewanie, że u szczurów TGR podwyższony poziom 20-HETE prowadzi do retencji sodu (Certikova-Chabova i wsp., 2007), bez obniżenia ukrwienia nerek lub filtracji.

W oparciu o te dane chcieliśmy ustalić czy i w jakim stopniu manipulacje poziomem aktywnych metabolitów kwasu arachidonowego zależnych od CYT P-450 mogą determinować rozwój nadciśnienia u szczurów TGR oraz wpływać na wynikające z tego uszkodzenie narządów. W doświadczeniach chronicznie stosowano inhibitor 20-HETE (DDMS), inhibitor hydrolazy sEH (NCND) chroniący EET przed konwersją do nieaktywnego DHETE oraz kombinację obu blokerów. Tylko jednoczesne hamowanie syntezy 20-HETE i zwiększanie aktywności EETs skutecznie chroniło przed wystąpieniem nadciśnienia u młodych (30 dniowych) szczurów TGR spowodowanego wysokim poziomem krążącej i tkankowej Ang II. U szczurów dorosłych (190 dni), z rozwiniętym nadciśnieniem, jednoczesne podanie DDMS i NCND prowadziło do obniżenia ale nie do unormowania ciśnienia tętniczego krwi oraz zmniejszało białkomocz i stopień uszkodzenia mięśnia sercowego. Wydaje się, że u szczurów TGR zmieniony poziom produkcji i/lub aktywności 20HETE i EETs odgrywa ważną ale nie kluczową rolę w patogenezie nadciśnienia i w powstawaniu związanych z nadciśnieniem uszkodzeniem narządów. Uzyskane wyniki mogą okazać się pomocne w rozwoju nowych terapii wczesnych stadiów nadciśnienia u ludzi.

### Spis literatury:

1. Bello-Reuss E, Travino DL, Gotschalk CB. Effect of renal sympathetic nerve stimulation on proximal water and sodium reabsorption. *Journal of Clinical Investigation*, 57:1104-1110, 1976
2. Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8: 3-11, 1992, Review
3. Brinkmann J, Heusser K, Schmidt BM, Menne J, Klein G, Bauersachs J, Haller H, Sweep FC, Diedrich A, Jordan J, Tank J. Catheter-based renal nerve ablation and centrally generated sympathetic activity in difficult-to-control hypertensive patients. *Hypertension*, 60(6):1485-1490, 2012
4. Certíková Chábová V, Kramer HJ, Vanecková I, Thumová M, Skaroupková P, Tesar V, Falek JR, Imig JD, Cervenka L. The roles of intrarenal 20-hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acids in the regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res.*, 30:335-346, 2007
5. Cowley AW Jr., Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev.*, 72: 231-300, 1992, Review.
6. DiBona GF. Neurogenic regulation of renal tubular sodium reabsorption. *Am J Physiol.*, 233:73-81, 1977, Review
7. DiBona, Sawin, 1982, Effect of renal nerve stimulation on NaCl and H<sub>2</sub>O transport in Henle's loop of the rat. *Am J Physiol.*, 243:576-580, 1982
8. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiological Review*, 77, 104-106, 1997.
9. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension 1. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.*, 59:347-379, 1934
10. Guyton AC, Hall JE, Coleman TG, Manning RD Jr. The dominant role of the kidneys in the long term regulation of arterial pressure in normal and hypertensive states. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. New York, New York: Raven Press, Publishers;1029-1052, 1990
11. Hesse IF, Johns EJ. The effect of graded renal nerve stimulation on renal function in the anaesthetized rabbit. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.*;79:409-414, 1984
12. Hansen J, Jacobsen TN, Victor RG. Is nitric oxide involved in the tonic inhibition of central sympathetic outflow in humans? *Hypertension* 24: 439-444, 1994



13. Imig JD, Navar LG, Roman RJ, Reddy KK, Falck JR. Actions of epoxygenase metabolites on the glomerular vasculature. *J Am Soc Nephrol.*, 7:2364-70, 1996
14. Kompanowska-Jeziarska E, Walkowska A, Edward J. Johns, Sadowski J. Early effects of renal denervation in the anaesthetised rat: natriuresis and increased cortical blood flow. *Journal of Physiology (London)*, 531, 527-534, 2001
15. Leonard BL, Malpas SC, Denton KM, Madden AC & Evans RG. Different neural control of internal blood flow during reflex increases in sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology*, 280, 62-68, 2001
16. Maier KG, Roman RJ. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 10:81-87, 2001, Review
17. Majid DS, Kopkan L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 34: 946-952, 2007
18. McKeogh DF i Brooks VL., Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition reduces renal sympathetic nerve activity and heart rate in conscious rats. *The Physiological Society Meeting*, 78P, York 17-19 Dec, 2001
19. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature.* 344:541-544, 1990
20. Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 282:777-784, 2002 Review
21. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.*, 82:131-185, 2002, Review
22. Romero JC, Strick DM. Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 2:114-121, 1993
23. Sun J, Druhan LJ, Zweier JL. Dose dependent effects of reactive oxygen and nitrogen species on the function of neuronal nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys.*, 471: 126-133, 2008
24. Symplicity HTN-1 investigators. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension. Durability of blood pressure reduction out to 24 months. *Hypertension*, 57: 911-917, 2011
25. Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol.*, 4:1438-1447, 1994

26. Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J. Nitric oxide and renal nerves: comparison of effects on renal circulation and sodium excretion in anesthetised rats. *Kidney Int.*, 66: 705-712, 2004
27. Zanzinger J, Czachurski J, Sessler H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *Am J Physiol.*, 268: 958-62, 1995
28. Zou AP, Cowley AW Jr. Alpha(2)-adrenergic receptor-mediated increase in NO production buffers renal medullary vasoconstriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 279: 769-77, 2000

### Podsumowanie i wnioski

1. W warunkach aktywnej syntezy *NO* ukrwienie rdzenia wewnętrznego nerki nie podlega depresyjnemu działaniu elektrycznej stymulacji nerwów nerkowych w takim stopniu jak w obrębie kory i rdzenia zewnętrznego. *NO* generowany przez wszystkie izoformy jego syntazy uczestniczy w buforowaniu wpływu elektrycznej stymulacji nerwów na ukrwienie nerek, ale w obrębie rdzenia wewnętrznego największe znaczenie ma prawdopodobnie *NO* pochodzący z izoformy neuronalnej (nNOS) [1]. W modulację procesów transportu kanalikowego po stymulacji nerwów nerkowych prądem o niskiej częstotliwości zaangażowany jest *NO* pochodzący z endotelialnej NOS jak i z nNOS [2]
2. Wzmocniona impulsacja afferentna z chemoreceptorów wewnątrz nerki związana ze stresem oksydacyjnym może być powodem wzrostu ciśnienia tętniczego krwi w początkowej fazie po ostrym odnerwieniu nerki. Redukcja stresu oksydacyjnego przy pomocy TEMPOLU oraz zablokowanie *NO* pochodzącego z izoformy neuronalnej NOS chroni przed wzrostem ciśnienia w następstwie odnerwienia nerek. nNOS jest nie tylko źródłem *NO* mediującego hamowania ośrodków w pniu mózgu kontrolujących impulsację współczulną; „rozprężona” (uncoupled) izoforma jest także ważnym źródłem wolnych rodników w warunkach stresu oksydacyjnego [5].
3. U szczurów w goldblatowskim modelu nadciśnienia (wariant 2K1C), w fazie ustalonego nadciśnienia wydalanie EETs jest znacząco niższe a 20-HETE wyższe niż u szczurów kontrolnych. Zmienione wytwarzanie i/lub aktywność czynnych pochodnych kwasu arachidonowego generowanych w ramach metabolizmu zależnego

od cytochromu P-450 w połączeniu z podwyższonym poziomem nerkowej Ang II odgrywają istotną rolę w patofizjologii utrwalonego goldblatowskiego nadciśnienia typu 2K1C [3].

4. U transgenicznych szczurów TGR zmieniony poziom produkcji i/lub aktywności 20HETE i EETs odgrywa ważną ale nie kluczową rolę w patogenezie nadciśnienia i w związanych z nim uszkodzeniem narządów. Jednoczesne zahamowanie syntezy 20-HETE i zwiększanie aktywności EETs chroni przed wystąpieniem nadciśnienia u młodych szczurów a u szczurów z rozwiniętym nadciśnieniem prowadzi do obniżenia ale nie do całkowitego unormowania ciśnienia tętniczego krwi oraz zmniejsza białkomocz i stopień uszkodzenia mięśnia sercowego [4].

Reasumując, badania przedstawionego cyklu (1-5) przyczyniły się do wypełnienia istotnych luk w wiedzy dotyczącej działania i interakcji czynników regulujących napięcie naczyń krwionośnych i stan płynów ustrojowych, a więc odpowiedzialnych także za poziom i możliwe zmiany ciśnienia tętniczego krwi. Badania ujawniły nowe aspekty udziału w kontroli ciśnienia aktywnych substancji powstających na ścieżce metabolizmu kwasu arachidonowego zależnej od cytochromu P-450 (20-HETE, EET). Jednak powodzenie prób normalizacji ciśnienia krwi poprzez farmakologiczną modyfikację aktywności tych związków było ograniczone: terapia była skuteczna tylko w wczesnych stadiach nadciśnienia.

W 1993 roku zakończyłam studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i w 2000 roku zdałam egzamin magisterski w Zakładzie Embriologii Zwierząt Instytutu Zoologii. Następnie podjęłam pracę w Zakładzie Fizjologii Stosowanej Instytutu-Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk (obecnie IMDiK im. Mirosława Mossakowskiego PAN). W 1996 roku nasz zespół został wyłączony z Zakładu Fizjologii Stosowanej jako odrębna jednostka: Pracownia Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych (od roku 2012 Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych). W 2003 roku uzyskałam tytuł doktora nauk medycznych nadany przez Radę Naukową IMDiK PAN, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Tlenek azotu i unerwienie współczulne: rola w regulacji ukrwienia i czynności wydalniczej nerki szczura.” Do chwili obecnej pracuję na stanowisku adiunkta.

## Główne osiągnięcia badawcze (poza cyklem habilitacyjnym)

- Dzięki metodzie ciągłego pomiaru admitancji elektrycznej tkanki *in situ* (opracowanej przez prof. Janusza Sadowskiego) w naszym ośrodku rozpoczęto serię badań nad kształtowaniem i zmianami korowo-rdzeniowego gradientu elektrolitowego w nerce t.j. podstawy procesów zagęszczania moczu. W badaniach, w których uczestniczyłam stwierdzono, że glukagon przyczynia się wzrostu stężenia elektrolitów w rdzeniu nerki a proces ten jest niezależny od zmian ukrwienia czy filtracji kłębuszkowej. Potwierdzało to wcześniejsze przypuszczenia co do bezpośredniego wpływu glukagonu na transport kanalikowy. Prowadziłam też badania nad wpływem ukrwienia różnych obszarów nerki na kształtowanie się gradientu. Obniżenie się przepływu przez rdzeń nerki (MBF) bez zmian w ciśnieniu krwi, filtracji kłębuszkowej i przepływie korowym wywołuje wzrost admitancji elektrycznej tkanki rdzenia (wzrost gradientu elektrolitowego). Wykazano i sprecyzowano stopień korelacji pomiędzy zmianami MBF a stężeniem elektrolitów w rdzeniu: ok. 50% wahania przepływu krwi przez rdzeń wywołują około 10%-wą zmianę w admitancji tkanki, co wskazuje na wyraźną ale niezbyt dużą wrażliwość gradientu na zmiany ukrwienia rdzenia (tytuły w wykazie publikacji 1,3).
- Powszechnie wiadomo, że narkoza i stres chirurgiczny zmieniają czynność narządów i wpływają na wyniki doświadczeń. Biorąc to pod uwagę, w naszej pracowni stworzono, przy moim udziale, model doświadczalny „eksplantowanej nerki”. Pozwalał on na badanie czynności nerki bez użycia głębokiej narkozy, w stanie zbliżonym do stanu czuwania. Na kilka dni przed właściwym doświadczeniem wykonywano zabieg chirurgiczny w uśpieniu barbituranowym polegający na wyłonieniu nerki szczura pod skórę. Powłoki skórne i mięśnie zaszywano pozostawiając w tych ostatnich miejsce na naczynia nerkowe i moczowód. Kaniulowano tętnicę i żyłę udową a ich końcowe odcinki wylaniano na karku i przepłukiwano roztworem heparyny w glukozie. W dniu eksperymentu w lekkiej narkozie chloralozowej przecinano szwy w skórze, kaniulowano moczowód a w odsłoniętą nerkę wkładano sondy do pomiaru przepływu krwi przez nerkę i stężenia elektrolitów; potwierdzono, że „eksplantowana nerka” nie różniła się czynnościowo

od nerki przeciwległej i przeprowadzono na nowym modelu badania dotyczące mechanizmu diurezy wodnej (2,4).

- We wcześniejszych pracach (nie wchodzących do cyklu habilitacyjnego) poświęconych roli aktywnych pochodnych kwasu arachidonowego w regulacji czynności i ukrwienia nerek stwierdziliśmy, że produkty szlaku cykloksygenazy (COX) nie wpływają na filtrację kłębuszkową. Nie zaobserwowano związku pomiędzy aktywnością  $PGE_2$  a tempem filtracji kłębuszkowej w stanie postępującej ekspansji pozakomórkowej wywołanej infuzją soli izotonicznej lub hipertonicznej. Natomiast okazało się, że produkty epoksygenacji zależnej od cytochromu P-450 pełnią ważną rolę w utrzymywaniu prawidłowej hemodynamiki kłębuszków. W doświadczeniach użyto skonstruowanej w naszej pracowni zintegrowanej sondy do jednoczesnego pomiaru przepływu krwi i admitancji (miara stężenia jonów w tkance) w tym samym obszarze rdzenia nerki. Pomiar przepływu odbywał się za pomocą lasero-Dopplerowskiej sondy igłowej, której powierzchnia zewnętrzna była częściowo zaizolowana a odizolowany odcinek końcowy stanowił jedną z elektrod służących do pomiaru admitancji. Druga elektroda była wykonana z drutu platynowo-irydowego. Połączenie dwóch „czujników” czyli ukrwienia i admitancji ograniczało uszkodzenie tkanki nerkowej, co jest szczególnie ważne wobec niewielkich rozmiarów rdzenia nerki szczura. Skonstruowanie takiej sondy pozwoliło na jednoczesną obserwację zmian i wzajemnych zależności między zmianami przepływu krwi przez rdzeń nerki a stężeniem nagromadzonych w rdzeniu elektrolitów (8).
- Brałam także istotny udział w badaniach, które zaowocowały opracowaniem nowej, mało inwazyjnej metody odnerwienia nerek, umożliwiającej ciągłą obserwację czynności nerki bezpośrednio po przerwaniu impulsacji donerkowej. Istota tej metodyki to elektrokoagulacja tkanki tłuszczowej i łącznej otaczającej włókna nerwowe wywodzące się z zwoju trzewnego. Dotychczasowa standardowa metoda polegająca na przecięciu włókien nerwowych biegnących w szypule nerkowej i chemicznym niszczeniu włókien biegnących w przydanie tętnicy nerkowej za pomocą roztworu fenolu, wymaga przynajmniej godzinnej przerwy przed rozpoczęciem pomiarów. Dzięki zastosowaniu nowej metody wykazaliśmy, że korowy przepływ krwi znajduje się pod tonicznym naczyniokurczącym wpływem współczulnych nerwów nerkowych. Opracowanie tej metody stało się punktem wyjścia dla moich

badań nad rolą nerwów nerkowych, ich wpływem na przepływ krwi w różnych obszarach nerki oraz nad tlenkiem azotu – czynnikiem, który może ten wpływ modulować, co zostało przedstawione w mojej pracy doktorskiej (7, 9).

*A. Wallomska*