

mgr Krzysztof Hubert Olszyński
Zakład Fizjologii Nerek i Płynów Ustrojowych
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Modyfikacja czynności i struktury nerki w zależności od wysokiej podaży sodu – udział wybranych elementów macierzy zewnątrzkomórkowej

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Kompanowska-Jeziarska

Choroba nadciśnieniowa przyczynia się do rozwoju wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym udaru mózgu i zawału serca. Istotnym składnikiem ryzyka rozwoju nadciśnienia tętniczego jest wysokie spożycie sodu. Pomimo, że związek sodu z ciśnieniem krwi jest znany od dawna, wysoki współczynnik zapadalności i wysoka śmiertelność w grupie chorób krążeniowych zobowiązuje do dalszych poszukiwań podstawowych mechanizmów patologicznych. Bardzo ważną rolę w kształtowaniu ciśnienia krwi odgrywają nerki, szczególnie narażone na uszkodzenia przy wysokiej podaży sodu w diecie. Chociaż dane literaturowe przynoszą wiele informacji na temat czynności nerek oraz zmian ekspresji/ aktywności wielu cząsteczek w procesach sodozależnego kształtowania ciśnienia krwi, nadal odczuwa się brak badań łączących obserwacje czynnościowe z oznaczeniami konkretnych czynników biochemicznych. Wiele z nich (VEGF-A, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*; NO, tlenek azotu; NGAL, ang. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*; MMP2, MMP9, ang. *Matrix Metalloproteinase 2 i 9*) działa w przestrzeni pozakomórkowej wywierając silny wpływ na strukturę tkanki czy funkcje komórek.

Cel niniejszej pracy wynikał z potrzeby kompleksowego spojrzenia na udział nerki w kształtowaniu ciśnienia krwi w zależności od wysokiej podaży sodu w diecie u szczurów o różnych predyspozycjach do rozwoju nadciśnienia. Podjęto próbę znalezienia czynników biochemicznych w macierzy zewnątrzkomórkowej, których obecność mogłaby wiązać się ze zmianami czynnościowo-morfologicznymi w nerce.

Doświadczenia zostały przeprowadzone na szczurach stada Wistar (zwierzęta normotensyjne) i szczepu SHR (ang. *Spontaneously Hypertensive Rats*, zwierzęta z predyspozycjami do rozwoju nadciśnienia) karmionych paszą standardową (STD, 0,25% Na, w/w) lub wysokosodową (HS, 4% Na, w/w) przez 21 dni. W tym okresie zwierzętom regularnie mierzono ciśnienie skurczowe krwi (SBP) oraz oznaczano stężenie jonów Na⁺ w

osoczu. W doświadczeniu ostrym, kończącym obserwacje chroniczne, uśpionym zwierzętom mierzono przepływy krwi przez nerkę (całkowity, RBF; korowy, CBF; zewnątrzrdzeniowy, OMBF; wewnątrzrdzeniowy, IMBF) oraz wydalanie nerkowe (diureza, wydalanie sodu i ogółu substancji osmotycznie czynnych). Pobrane nerki utrwalano w PFA i przeznaczano do barwienia (hematoksylina i eozyna) oraz znakowania przeciwciałami (skierowanymi przeciwko PCNA, ang. *Proliferative Cell Nuclear Antigen*, i VEGF-A) lub utrwalano przez mrożenie w izopentanie schłodzonym ciekłym azotem i przeznaczano do oznaczenia aktywności żelatynolitycznej metodą zymografii żelatynowej *in situ*. Pobrane osocze i mocz wykorzystano w analizie z użyciem testów ELISA, oznaczając stężenia VEGF-A, NO, NGAL i 8-izo-PGF2 α (8-izoprostaglandyny F2 α). Uszkodzenie nerek oceniano poprzez oznaczenie indeksu uszkodzenia kłębuszków (kora) oraz zmian liczebności jąder wraz ze stopniem ich wyznakowania przeciwko PCNA (rdzeń).

Skurczowe ciśnienie krwi w odpowiedzi na dietę wysokosodową wzrastało zarówno u szczurów Wistar, jak i SHR, jednak tylko u szczurów Wistar zmianie tej towarzyszył wzrost stężenia jonów sodu w osoczu. Mechanizmy wydalania sodu i wody wydawały się działać prawidłowo, reagując na wysoką podaż sodu w diecie natężonym usuwaniem jonów sodowych w moczu. Wzrost ciśnienia krwi po 21 dniach diety był jednak wyższy u szczurów SHR, u których kumulacja sodu w osoczu nie zachodziła. Jednakże wzrost stężenia jonów sodu w osoczu nie jest jedyną możliwą drogą oddziaływania sodu na ciśnienie krwi; być może miała tu miejsce kumulacja pozaosoczowa jonów sodowych, np. w płynie międzykomórkowym. Z drugiej strony zmiany zawartości sodu nie musiały być jedyną przyczyną zmian ciśnienia krwi tętniczej. U szczurów Wistar oraz u szczurów SHR, w odpowiedzi na dietę wysokosodową obserwowano spadek stosunku ukrwienia rdzenia zewnętrznego do wewnętrznego, jednak dochodziło do tego w następstwie zmiany innej części składowej: u szczurów Wistar w wyniku wzrostu IMBF, u szczurów SHR w wyniku spadku OMBF. Zmianom hemodynamicznym u szczurów Wistar towarzyszyły zmiany w lokalizacji VEGF-A. O ile wyznakowanie w obrębie rdzenia zewnętrznego (OM) pozostawało stałe niezależnie od diety, ilość wyznakowanych struktur w rdzeniu wewnętrznym (IM) obniżała się w miarę trwania diety wysokosodowej. Dodatkowo obserwowano również zmniejszenie liczebności komórek w obydwu warstwach rdzenia; w grupie Wistar STD była wyraźna różnica w liczbie komórek między OM a IM, po diecie HS ubytek komórek w obydwu warstwach prowadził do zaniku tej różnicy. Pomimo ograniczenia immunoreaktywności VEGF-A w IM oraz spadku liczebności komórek w tej warstwie, przepływ przez rdzeń

wewnętrzny (IMBF) wzrastał. Z kolei zmiany w przepływach rdzeniowych u szczurów SHR zachodziły równolegle ze zmianami liczebności komórek i aktywności żelatynolitycznej: w rdzeniu zewnętrznym obserwowano zarówno obniżenie przepływu krwi, jak i liczby komórek i aktywności żelatynolitycznej, podczas gdy wartości te pozostawały na stałym poziomie w rdzeniu wewnętrznym. Być może niska immunoreaktywność VEGF-A w rdzeniu wewnętrznym jest czynnikiem przesądzającym o skłonności do rozwoju nadciśnienia; charakteryzuje ona bowiem szczury spontanicznie nadciśnieniowe (SHR) w warunkach podstawowych, bez względu na dietę, a u szczurów Wistar pojawia się w odpowiedzi na wysoką podaż sodu, wraz ze zwiększeniem stężenia jonów sodowych w osoczu i podwyższeniem wartości ciśnienia tętniczego krwi. W osoczu szczurów Wistar, jak i SHR, obserwowano wzrost stężenia metabolitów NO w odpowiedzi na dietę wysokosodową, co sugeruje uruchomienie ogólnoustrojowych mechanizmów przeciwstawiających się wzrostowi ciśnienia krwi oraz rosnącemu stresowi oksydacyjnemu. W wydalaniu NGAL i metabolitów NO nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic, natomiast stężenie VEGF-A w moczu było dodatnio skorelowane ze stopniem uszkodzenia kłębuszków. Wyjściowa aktywność żelatynolityczna w rdzeniu u szczurów SHR była znacznie wyższa niż u szczurów Wistar; dodatkowo u jednych i u drugich szczurów pojawiała się w tym obszarze aktywność jądrowa, sugerująca udział MMP2 i/ lub MMP9 w transkrypcji genów.

Wydaje się więc, że kluczowe zmiany czynnościowe, jak i w lokalizacji/aktywności wybranych substancji w nerce szczurów z wysoką podażą sodu w diecie zachodzą w obszarze rdzenia, strukturze uznawanej za kluczową dla kontroli ciśnienia krwi. Silna korelacja pomiędzy wydalaniem VEGF-A a uszkodzeniem kłębuszków daje nadzieję na przyszłe zastosowanie w praktyce klinicznej tego oznaczenia jako wskaźnika stanu kłębuszków.