

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

mgr farm. Aneta Marta Sawicka

## **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 osoczowego układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS). Kluczowym enzymem aktywującym ten układ jest renina – enzym proteolityczny wytwarzany w aparacie przykłębuszkowym nerki – katalizujący przekształcenie angiotensynogenu osoczowego 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 śródbłonna na odkształcenie mechaniczne (sztywnienie śródbłonna) i zmniejszenie wydzielania tlenu 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 niedokrwienego, 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. Długotrwale 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. Długotrwale 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 osoczonego, jak i lokalnego układu renina-angiotensyna;
4. Inhibitory chymazy są skuteczniejsze w leczeniu sodo-zależnego nadciśnienia tętniczego niż inhibitory osoczonego 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 odsłonić 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 śródbłoka 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,

$5 \times 10^{-7}$  M) w przypadku GMA i adenozy-5'-trifosforanu (ATP  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M) w przypadku MCA; iii) inhibitora syntazy tlenku azotu – ester metylowy-nitro-L-argininy (L-NAME,  $10^{-5}$  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<sub>agon</sub>), 15 (ACh, ATP, ET-1) lub 30 minutach (L-NAME) po podaniu badanej substancji.

W dalszych doświadczeniach, pobierano GMA i MCA od zwierząt z sodozależnym 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<sub>agon</sub> 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.