

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Natálie Drábková

Úloha vybraných vazoaktivních systémů v rozvoji chronického onemocnění ledvin
Contribution of particular vasoactive systems in the development of chronic kidney disease

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ivana Vaněčková, DSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 8. 2019

.....

Natálie Drábková

Poděkování

Děkuji RNDr. Ivaně Vaněčkové, DSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu při zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Josefu Zichovi, DrSc. za cenné připomínky při vyhodnocování výsledků. Mé poděkování patří i Mgr. Silvii Hojné, Ph.D. a Zdeňce Kopecké za pomoc v experimentální části mé práce.

Abstrakt

Chronické onemocnění ledvin (CKD) je život ohrožující choroba, která vzniká jako častý důsledek diabetu a hypertenze. Protože zpravidla probíhá utajeně, často končí úplným selháním ledvin. Zvládnutí chronického selhání ledvin se tak stává díky stále více stárnoucí populaci závažným zdravotním problémem. Cílem této práce bylo zjistit podíl vybraných vazoaktivních systémů na výši krevního tlaku v rozvojové a udržovací fázi CKD. K tomu byly použity dva modely CKD: 5/6 nefrektomie u Ren-2 transgenních potkanů (TGR) a stenóza renální artérie (2K1C) u kmene Wistar. U obou modelů CKD se ukázalo, že renin-angiotenzinový systém nehraje tak významnou roli na udržování krevního tlaku, naopak větší význam má sympatický nervový systém. Při rozvoji a udržování CKD převládají vazokonstrikční systémy nad vazodilatačně působícím systémem NO-syntázy. Úloha tohoto vazodilatačního systému je u TGR potkanů s 5/6 nefrektomií postupně oslabována, zatímco u Wistar potkanů s 2K1C hypertenzí je v rozvojové i udržovací fázi CKD udržována na stejné úrovni.

Klíčová slova:

chronické onemocnění ledvin, vazoaktivní systémy, 5/6 nefrektomie, dvouledvinová jednotvorková hypertenze, renin-angiotenzinový systém, sympatický nervový systém, NO-syntáza

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a life-threatening disease which arises as a frequent consequence of diabetes and hypertension. Since it is going on silently, CKD often progresses to the end-stage renal disease. It is therefore necessary to combat this disease especially due to the fact that the world population is growing old. The aim of this work was to determine the contribution of selected vasoactive systems contributing to the maintenance of high blood pressure in the developmental and established phase of CKD. Two models of CKD were used: 5/6 nephrectomy in Ren-2 transgenic rats (TGR) and stenosis of renal artery (2K1C) in Wistar rats. We demonstrated that renin-angiotensin system does not play so important role in blood pressure maintenance in both CKD models. By contrast, a more important role has sympathetic nervous system. During both the developmental and established phase of CKD, vasoconstrictor systems prevail above vasodilator NO-synthase effects. In fact, the role of NO-dependent vasodilation gradually decreased in nephrectomized TGR rats, while it was unchanged in Wistar rats with 2K1C hypertension.

Keywords:

chronic kidney disease, vasoactive systems, 5/6 nephrectomy, two-kidney, one-clip hypertension, renin-angiotensin system, sympathetic nervous system, NO-synthase

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	PŘEHLED LITERATURY.....	9
2.1	CHRONICKÉ ONEMOCNĚNÍ LEDVIN.....	9
2.2	MODELY CHRONICKÉHO ONEMOCNĚNÍ LEDVIN.....	11
2.2.1	Model 5/6 nefrektomie	12
2.2.2	Model dvouledvinové jednosvorkové hypertenze	14
2.3	REGULACE KREVNÍHO TLAKU	16
2.4	VAZOAKTIVNÍ SYSTÉMY	16
2.4.1	Renin-angiotenzinový systém.....	16
2.4.2	Sympatický nervový systém	20
2.4.3	Syntáza oxidu dusnatého.....	22
3	CÍLE PRÁCE.....	24
4	METODIKA	25
5	VÝSLEDKY.....	29
5.1	5/6 NEFREKTOMIE	29
5.2	2K1C.....	40
6	DISKUZE	50
7	ZÁVĚR	53
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54

SEZNAM ZKRATEK

2K1C - two-kidney, one-clip

ANG I - angiotenzin I

ANG II - angiotenzin II

AT₁ - receptor pro ANG II 1. typu

CKD - chronic kidney disease, chronické onemocnění ledvin

ECT - extracelulární tekutina

ESRD - end-stage renal disease, konečné selhání ledvin

GFR - glomerular filtration rate, glomerulární filtrace

HanSD - Hannover Sprague Dawley potkan

JG - juxtaglomerulární

NE - noradrenalin

NO - oxid dusnatý

NOS - NO-syntáza, syntáza oxidu dusnatého

eNOS - endoteliální NO-syntáza

nNOS - neuronální NO-syntáza

RAS - renin-angiotenzinový systém

RBF - renal blood flow, průtok krve ledvinami

RPF - renal plasma flow, průtok plasmy ledvinami

SNS - sympatický nervový systém

TGR - Ren-2 transgenní potkan

TK - tlak krve

1 ÚVOD

Chronické onemocnění ledvin (chronic kidney disease, CKD) je závažné onemocnění, které vede k postupné ztrátě funkce ledvin. Podle závažnosti, snižující se glomerulární filtrace a zvyšující se proteinurie je rozděleno do 5 stádií, přičemž poslední stádium je definováno jako úplné selhání ledvin a jedinou léčbou je dialýza a transplantace ledvin.

Chronické onemocnění ledvin postihuje 9 - 13 % obyvatelstva a je spjato s moderním životním stylem. Mezi nejvýznamnější rizikové faktory však patří hypertenze, diabetes a obezita. Dalšími rizikovými faktory jsou například vysoký věk, kouření, užívání alkoholu, nízká tělesná aktivita, nevhodná dieta i genetické predispozice.

Kromě konečného selhání ledvin bývá problémem pacientů s chronickým onemocněním ledvin vysoké riziko kardiovaskulárních onemocnění. To výrazně vzrůstá s pokročilostí stádia CKD. V posledním stádiu je riziko kardiovaskulárního onemocnění 10 - 20krát větší. V mírnějších stádiích CKD se jedná hlavně o aterosklerózu, v pokročilejších stádiích je to chronické selhání srdce a infarkt myokardu (Herzog et al. 2011).

Nedílnou součástí chronického onemocnění ledvin je hypertenze, která zvyšuje míru kardiovaskulárních komplikací a zvyšuje poškození orgánů. Poškozené ledviny čím dál více ztrácejí schopnost správné regulace krevního tlaku, vylučování sodíku a vody, a tím se dále rozvíjí CKD a hypertenze. Proto je snaha při léčbě CKD snížit hypertenzi. V současné době se používá široká škála léčiv, pomocí nichž lze omezit rozvoj tohoto onemocnění. Využívá se především blokátorů renin-angiotenzinového systému (blokátorů angiotenzin konvertujícího enzymu a blokátorů receptoru AT1 pro angiotenzin II), v menší míře diuretik, blokátorů kalciových kanálů, beta blokátorů a pokračuje také klinický výzkum s využitím inhibitorů endotelinového systému.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 CHRONICKÉ ONEMOCNĚNÍ LEDVIN

Chronické onemocnění ledvin (CKD) je klasifikováno podle snižující se glomerulární filtrace (GFR) a zvyšující se albuminurie, přičemž zhoršená funkce ledvin musí trvat déle než tři měsíce. Podle závažnosti je rozděleno do 5 stádií (tabulka 1). Od 3. stádia je funkce ledvin a GFR výrazně snížena a ledviny začínají selhávat. Poslední 5. stádium je konečné (end-stage renal disease, ESRD) a jedinou možností léčby je dialýza a transplantace ledvin. CKD postihuje celosvětově 9 - 13 % lidí ve věku nad 20 let a jeho riziko roste s věkem, hypertenzí a diabetem. V 3. - 5. stádiu je prevalence CKD 5 - 6 % (Mills et al. 2015).

Jednou z příčin chronického onemocnění ledvin může být akutní selhání ledvin, které je charakterizováno náhlým poklesem funkce ledvin, při kterém jsou nedostatečně vylučovány dusíkaté (močovina a kreatinin) a nedusíkaté odpadní látky. V závislosti na závažnosti a délce trvání akutního selhání ledvin se tyto metabolity hromadí a narušují metabolickou rovnováhu (metabolická acidóza, hyperkalémie, změny v distribuci tělních tekutin). Závažnost akutního selhání ledvin je definována podle stoupající koncentrace kreatininu v plazmě. Příčiny akutního selhání ledvin jsou rozděleny do tří kategorií: prerenální, u které dochází k nedostatečnému prokrvení ledvin a snížení GFR, renální, u které dochází k narušení funkce nefronů, a postrenální, která nastává při obstrukci močovodu.

I přes nasazení léčby a odvrácení akutního selhání ledvin může přetrvávat poškození ledvin, které se může vyvinout v chronické onemocnění ledvin. Mechanismus, který vede k rozvoji CKD z akutního selhání ledvin, není zcela známý. Snížením průtoku krve ledvinami nastává ischemie až hypoxie vedoucí k poškození tkáně a nekróze buněk. Dochází tak k poškození tubulů, intersticiální fibróze a změnám v peritubulárním řečišti. Tyto změny ovlivňující průtok krve ledvinami (renal blood flow, RBF) pravděpodobně přispívají k rozvoji hypertenze a CKD (Basile et al. 2001). Při akutním selhání ledvin jsou zvýšené koncentrace angiotenzinu II (ANG II) v plazmě a zvýšená vazokonstrikční odpověď na ANG II v důsledku zvýšeného oxidativního stresu (Basile et al. 2012).

Chronické onemocnění ledvin se může rozvinout z několika příčin. Těmi nejčastějšími jsou hypertenze a diabetes, dále pak glomerulonefritida, dědičná onemocnění ledvin a autoimunitní onemocnění. Nezávisle na konkrétní příčině se rozvíjí nefropatie, dochází k poškození buněk ledvin, zánětu vedoucímu k fibrotizaci tkáně, poškození glomerulů a

tubulů, úbytku nefronů. Tím se snižuje průtok krve ledvinami, který spolu se sníženou plochou filtrační bariéry přispívá k poklesu glomerulární filtrace.

U hypertenzní nefropatie může dojít k poškození aferentních a eferentních arteriol i glomerulárních kapilár, glomeruloskleróze, intersticiální fibróze a narušení filtrační bariéry tvořené bazální glomerulární membránou, endoteliálními buňkami kapilár a podocyty.

Glomerulus je uložen v Bowmanově pouzdře tvořeném parietálními epitelialními buňkami. Podocyty jsou viscerální epitelialní buňky a svými výběžky obalují glomerulární kapiláry. Napomáhají tak k udržení správného nastavení filtrace pro určité látky. Při velké ztrátě podocytů dojde k obnažení glomerulární bazální membrány, která začne srůstat s parietálními epitelialními buňkami, a celá struktura glomerulu se začne ztlušovat. Tak se rozvíjí fokální segmentální glomeruloskleróza (Kriz 2003), která je spjata s proteinurií CKD (Dalla Vestra et al. 2003). Poškození a úbytek podocytů byl považován za nevratný proces, ale bylo zjištěno (Appel et al. 2009), že podocyty mohou migrovat z parietální epitelialní vrstvy, což by mohlo být využito v léčbě CKD.

Ztráta podocytů je zapříčiněna vysokým tlakem v glomerulu a hyperfiltrací. Mechanický stres působící na podocyty vyvolává zvýšení koncentrace ANG II v podocytech a zvýšení exprese receptoru pro angiotenzin II typu 1 (AT1 receptor) na podocytech (Durvasula et al. 2004). Blokáda renin-angiotenzinového systému zmírňuje poškození podocytů a proteinurii, ale nemusí být dostačující. Další příznivé účinky přináší blokáda ET_A receptorů endotelinového systému. Ta i u velmi rozvinuté hypertenze dokáže snížit proteinurii a poškození podocytů (Opočenský et al. 2006). Poškozená filtrační bariéra vede k vyšší filtraci proteinů a tím k proteinurii. Snížená GFR v poškozených nefronech vede k další aktivaci renin-angiotenzinového systému.

Ke správnému fungování ledvin je potřeba udržet stálý krevní tlak a průtok krve v glomerulech. To se děje pomocí vazokonstrikce a vazodilatace aferentních arteriol. Tato autoregulace je při CKD poškozena a přispívá tak k dalšímu rozvoji tohoto onemocnění.

Tabulka 1: Klasifikace chronického onemocnění ledvin (CKD) podle glomerulární filtrace (GFR) a albuminurie.

Kategorie GFR v CKD		
Kategorie GFR	GFR (ml/min/1,73 m ²)	Charakteristika
G1	≥ 90	Normální nebo zvýšená GFR
G2	60 - 89	Mírně snížená GFR
G3a	44 - 59	Mírně až středně snížená GFR
G3b	30 - 44	Středně až výrazně snížená GFR
G4	15 - 29	Výrazně snížená GFR
G5	< 15	Selhání ledvin

Kategorie albuminurie v CKD				
Kategorie	AER (mg/24hod)	ACR		Charakteristika
		(mg/mmol)	(mg/g)	
A1	< 30	< 3	< 30	Normální až mírně zvýšená
A2	30 - 300	3 - 30	30 - 300	Středně zvýšená
A3	> 300	> 30	> 300	Vážně zvýšená

CKD, chronické onemocnění ledvin; GFR, glomerulární filtrace; AER, exkrece albuminu; ACR, poměr albuminu a kreatininu

Převzato z („CKD Evaluation and Management – KDIGO" b.r.)

2.2 MODELY CHRONICKÉHO ONEMOCNĚNÍ LEDVIN

Ke studiu chronického onemocnění ledvin lze použít řadu modelů, lišících se od sebe rychlostí rozvoje CKD, typem poškození tkáně a mírou hypertenze.

Nejrychlejší rozvoj CKD s velmi rychlým nástupem terminálního poškození nastává u jednostranné obstrukce močového, která by se dala zařadit i mezi modely akutního selhání ledvin. U jednostranné obstrukce močového dochází k rychlému snížení RBF a GFR. Toto snížení je během 2 - 3 dnů následováno intersticiálním zánětem a po 7 dnech dilatací a atrofií tubulů a fibrózou. Po dvou týdnech dochází k selhání ledviny s obstrukcí močového (Chevalier et al. 2009).

Středně rychlým rozvojem CKD se vyznačují modely, které spočívají ve využití specifických protilátek, po jejichž podání se rozvíjí glomerulonefritida. Jednou z takových protilátek je anti-Thy-1, která se váže na antigen Thy-1 exprimovaný na glomerulárních mesangiálních buňkách. Krátce po navázání protilátky se aktivuje imunitní systém a dochází

k nekróze mesangiálních buněk, která je po 6 dnech následována mesangiální proliferací (Ishizaki et al. 1986). Touto metodou lze dosáhnout glomerulosklerózy a rozvoje intersticiální fibrózy.

Dalším modelem CKD je DOCA-solná hypertenze. Potkanům je podáván injekčně deoxykortikosteron acetát (DOCA) a 0,9% roztok NaCl v pití. Následně se rozvíjí hypertenze, proteinurie a glomeruloskleróza (Drenjančević-Perić et al. 2011).

Mezi další modely CKD patří radiační nefropatie, která je navozena ozářením. Po ozáření dochází nejprve k poškození glomerulů a tubulů a ke ztrátě endoteliálních buněk glomerulárních kapilár. Následuje poškození mesangiálních buněk a glomeruloskleróza (Robbins et al. 1995).

Přirozeným modelem s pomalým rozvojem CKD je stárnutí. K tomu se používají potkani kmene Sprague-Dawley, kteří jsou nejnáchylnější k postupnému snižování funkce ledvin s přibývajícím věkem. U tohoto modelu se již od 3. měsíce rozvíjí proteinurie a po 24 měsících života začíná klesat GFR a zvyšovat se glomeruloskleróza (Goldstein et al. 1988).

Dalším využívaným modelem jsou potkani se spontánní hypertenzí kmene SHR. Zvýšená vazokonstrikce u těchto potkanů způsobuje hypertenzi, která se rozvíjí od 5. - 6. týdne života, a u samců se po 6 týdnech začíná rozvíjet proteinurie (Reckelhoff et al. 1997).

Z hlediska relativně rychlého rozvoje CKD, průvodní hypertenze a proteinurie jsou pro nás nejvhodnější modely 5/6 nefrektomie a Goldblattovy dvouledvinové jednosvorkové hypertenze.

2.2.1 Model 5/6 nefrektomie

Jedním z nejpoužívanějších modelů CKD je 5/6 nefrektomie (5/6 NX) (Morrison 1962). Spočívá v chirurgickém odstranění jedné ledviny a obou pólů ledviny kontralaterální. Přibližně je tedy odstraněno 70 - 85 % tkáně ledvin. Redukcí tkáně ledvin je dosaženo i snížení počtu nefronů. Ve zbylých nefronech se během prvního týdne od provedení zákroku zvyšuje glomerulární filtrace a funkce ledvin je nedostatečná. Poté dochází ke kompenzační adaptaci a funkce ledvin se relativně stabilizuje. Během tohoto období však dochází k poškození glomerulů, tubulů a intersticia, které je spojeno s proteinurií. Po výrazném rozvinutí glomerulosklerózy ledvina přechází do konečného stádia renálního selhání (ESRD) (Shea et al. 1978; Olson et al. 1982; Kujal, Vernerová 2008).

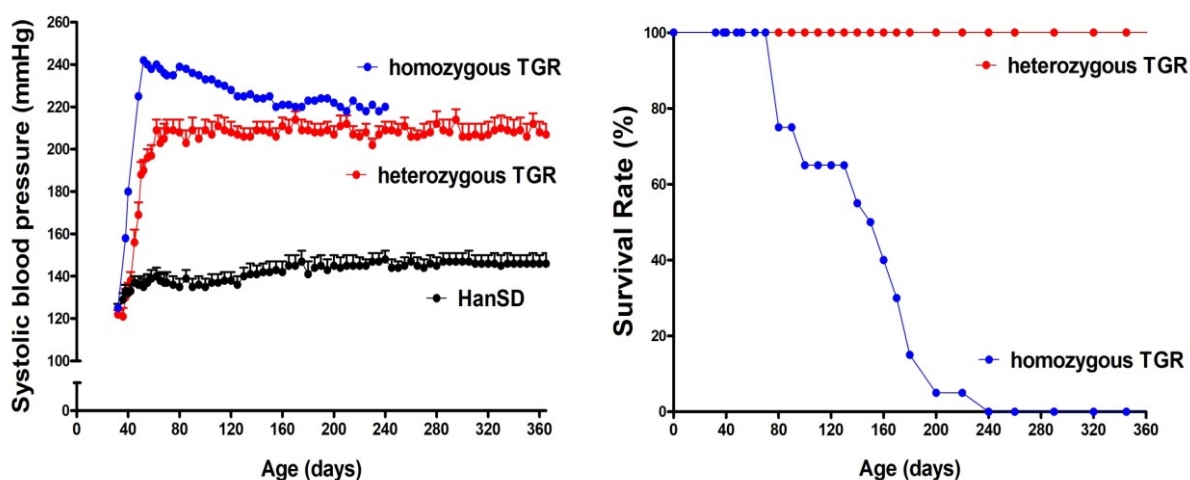
Studie Gretze (Gretz et al. 1988) hodnoí, jaký vliv má model 5/6 nefrektomie na rozvoj chronického onemocnění ledvin a za jakých podmínek je tento model standardizovaný.

5/6 nefrektomie byla provedena na dospělých normotenzních potkanech kmene Sprague-Dawley s hmotností přes 400 g. Měřen byl sérový kreatinin a urea, poškození ledvin bylo zhodnoceno histologicky. Ukázalo se, že po provedení 5/6 nefrektomie dochází k stabilnímu zvýšení urémie. To je následováno poškozením ledvin, které se rozvíjí poté, co hodnota sérového kreatininu dosáhne koncentrace 20 $\mu\text{g/dl}$. Po dosažení této hodnoty potkan přežívá ještě 4 - 6 týdnů, poté dochází k výrazné ztrátě tělesné hmotnosti a úhynu zvířete. Celkově tak potkani Sprague-Dawley přežívají 6 - 12 měsíců od provedení 5/6 nefrektomie. Z této studie vyplývá, že model 5/6 nefrektomie je vhodný pro studium chronického onemocnění ledvin v pokročilejším stádiu u dospělých Sprague Dawley potkanů.

Ren-2 transgenní potkani (TGR)

Vhodným modelem chronického onemocnění ledvin je 5/6 nefrektomie provedená u hypertenzních Ren-2-transgenních potkanů (TGR). Tito potkani představují experimentální model hypertenze, který vznikl vložením myšího Ren-2 genu pro renin do genomu normotenzních HanSD potkanů (Mullins et al. 1990). V důsledku zvýšených koncentrací angiotenzinu II (ANG II) a endotelinu-1 v ledvinách jsou vhodným modelem CKD.

U heterozygotních TGR potkanů se v průběhu 5. - 8. týdne rozvíjí vysoký krevní tlak, který se dále drží na zvýšené hodnotě kolem 210 mm Hg. Krevní tlak homozygotních TGR potkanů je zvýšen na hodnoty kolem 230 mm Hg a jejich přežívání oproti heterozygotním TGR potkanům je výrazně sníženo (graf 1) (Dvořák et al. 2004; Vaněčková et al. 2011).



Graf 1: Systolický krevní tlak a přežívání homozygotních a heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů. Převzato z (Dvořák et al. 2004; Vaněčková et al. 2011)

Ve studii (Kopkan et al. 2004) zabývající se koncentrací ANG II v plazmě a ledvinách a množstvím AT₁ receptorů v kůře ledvin bylo cílem zjistit rozdíl mezi TGR a Hannover Sprague Dawley (HanSD) potkany a vyhodnotit, jaký vliv na krevní tlak má blokáda AT₁ receptorů pomocí candesartanu. Bylo zjištěno, že plazmatické a renální hodnoty ANG II jsou u TGR nižší než u HanSD potkanů, zatímco exprese AT₁ receptorů se mezi těmito kmeny nelišila. Akutní intravenózní podání candesartanu způsobilo srovnatelný pokles tlaku krve (TK) u TGR i HanSD. Rozdíl nastal v průtoku plazmy ledvinami (RPF) a exkreci sodíku, kdy u TGR došlo k nárůstu hodnot obou parametrů bez změny GFR. K zvýšení RPF došlo u TGR potkanů i po intrarenálním podání candesartanu. Z těchto výsledků vyplývá, že hemodynamika ledvin a exkrece sodíku jsou u hypertenzních TGR potkanů pod silným vlivem ANG II.

V další studii (Kopkan et al. 2005) byl podáván ANG II intravenózně a intrarenálně normotenzním HanSD potkanům a prehypertenzním TGR potkanům ve věku 35 dní. TGR potkani měli do 38. dne života krevní tlak na podobné úrovni jako kontrolní HanSD, poté se u nich začala rozvíjet hypertenze. Po podání ANG II se zvýšil TK a snížil RBF u TGR potkanů více než u HanSD. Podání blokátoru AT₁ receptoru candesartanu zvýšilo RBF, GFR a exkrece sodíku u obou kmenů stejně. Koncentrace ANG II v plazmě a ledvinách byla u TGR potkanů vyšší než u HanSD. Celkové množství AT₁ receptorů v ledvinách bylo podobné u HanSD i TGR potkanů. Z toho vyplývá, že jsou ledviny u prehypertenzních TGR potkanů pod významnou kontrolou renin-angiotenzinového systému.

2.2.2 Model dvouledvinové jednosvorkové hypertenze

Dalším často používaným modelem CKD je model Goldblattovy dvouledvinové jednosvorkové hypertenze (two-kidney, one-clip, 2K1C), který je navozen stenózou renální artérie (Goldblatt et al. 1939). Do jedné ledviny je omezen průtok krve svorkou o určitém průměru, kontralaterální ledvina je bez omezení průtoku krve svorkou.

Po nasazení svorky na renální artérii dochází v zaklipované ledvině k výrazné sekreci reninu a zvyšuje se tak i plazmatická hladina reninu a ANG II. Pozměněná aktivita renin-angiotenzinového systému vede v kontralaterální ledvině ke změně hemodynamiky a tubulární reabsorpce sodíku. Po zákroku se rozvíjí hypertenze a nezaklipovaná ledvina je tak vystavena vyššímu perfuznímu tlaku. V důsledku toho se v této ledvině rozvíjí glomerulární a tubulointersticiální poškození. V zaklipované ledvině, která je před vysokým krevním tlakem chráněna svorkou, k takovým změnám nedochází (Eng et al. 1994).

U potkanů Sprague-Dawley byla provedena 2K1C a po 3 - 4 týdnech jim byly změřeny parametry v zaklipované a nezaklipované ledvině po podání ACE inhibitoru. V nezaklipované ledvině došlo oproti normotenzní kontrole ke zvýšení GFR a exkrece sodíku a vody, v zaklipované ledvině došlo jen k mírnému poklesu těchto parametrů (Huang et al. 1981).

V další studii (Červenka et al. 2008) byly využity myši s knockoutovaným receptorem AT_{1A} ($AT(1A)^{-/-}$) a kontrolní wild type myši ($AT(1A)^{+/+}$), kterým byla provedena stenóza renální artérie a následně podáván antagonist AT_2 receptoru CGP-42112A. Kontrolní myši měly zvýšený bazální krevní tlak oproti $AT(1A)^{-/-}$ myším a po 5 dnech od provedení 2K1C jim výrazně stoupl krevní tlak, zatímco u $AT(1A)^{-/-}$ myši nedošlo k žádné změně. Inhibice AT_2 receptoru neměla žádný vliv. Plazmatická koncentrace ANG II se začala významně zvyšovat u kontrolních myši po 3 dnech od provedení 2K1C a nejvyšších hodnot bylo dosaženo 9. den. Po 28 dnech po zaklipování klesla plazmatická koncentrace ANG II opět na původní hodnotu. Naopak u $AT(1A)^{-/-}$ myši s inhibitorem AT_2 receptoru nedošlo k žádné změně plazmatické koncentrace ANG II. Akutní blokáda NO-syntázy způsobila větší zvýšení TK u $AT(1A)^{+/+}$ 2K1C myši než u kontrolních $AT(1A)^{+/+}$ zvířat. Výsledky této studie poukazují na významný vliv AT_{1A} receptoru v modelu Goldblattovy hypertenze. AT_2 receptor u tohoto modelu nepůsobí významně antagonisticky proti účinkům AT_{1A} receptoru, zatímco NO-syntáza ano.

U Sprague-Dawley potkanů s tělesnou hmotností 140 - 190 g byla provedena stenóza renální artérie svorkou o třech různých průměrech: 0,3 mm, 0,25 mm a 0,2 mm. Po 24 - 28 dnech od provedení 2K1C byl potkanům měřen střední arteriální krevní tlak v aortě a renální arteriální tlak 2 - 3 mm distálně od nasazené svorky. Renální arteriální tlak byl u všech průměrů svorek stejný, střední arteriální tlak v aortě se významně zvýšil pouze u skupiny s průměrem 0,2 mm. Z těchto výsledků vyplývá, že tlak v zaklipované renální artérii je u modelu 2K1C regulován. V případě mírné konstrikce renální artérie (svorka o průměru 0,3 a 0,25 mm) je tato regulace na středním arteriálním tlaku nezávislá, v případě výrazné konstrikce (svorka o průměru 0,2 mm) se na regulaci podílí střední arteriální tlak (Murphy et al. 1984).

2.3 REGULACE KREVNIHO TLAKU

Regulace krevního tlaku je důležitá pro zajištění zásobování orgánů krví i za měnících se podmínek okolí. Orgány musí být stále dostatečně prokrveny a krevní zásobení musí být přerozděleno do právě aktivních částí těla. Krevní tlak je především ovlivňován průsvitem cév, dále celkovým objemem krve a srdeční činností. Průsvit cév, a tím i krevní tlak, je udržován hlavními vazokonstriktory (renin-angiotenzinový systém a sympatický nervový systém), kterým oponují vazodilatační systémy (oxid dusnatý).

Podle rychlosti nástupu a délky trvání účinků lze mechanismy regulace krevního tlaku rozdělit do tří skupin: krátkodobé, střednědobé a dlouhodobé mechanismy. Do krátkodobých mechanismů patří reflexní odpovědi zprostředkované baroreceptory a chemoreceptory. Tyto receptory reagují na snížený krevní tlak nebo ischemii. Jedná se tedy o autoregulaci v konkrétních orgánech. Mezi další krátkodobé mechanismy patří regulace pomocí katecholaminů. Po aktivaci sympatického nervového systému je z nervových zakončení a ze dřeně nadledvin rychle vyléván noradrenalin a adrenalin způsobující vazokonstrikci. Rychlou vazodilataci působí NO produkovaný endoteliální NO-syntázou. Mezi střednědobé mechanismy patří vazokonstrikční působení angiotenzinu II a antidiuretického hormonu aktivované např. krvácením nebo dehydratací. V dlouhodobých mechanismech se uplatňuje hlavně regulace objemu extracelulární tekutiny (ECT) a tím i objemu krve. Objem extracelulární tekutiny je řízen vylučováním sodíku a vody ledvinami. Na retenci sodíku a zvyšování objemu ECT se podílí hlavně aldosteron.

2.4 VAZOAKTIVNÍ SYSTÉMY

2.4.1 Renin-angiotenzinový systém

Renin-angiotenzinový systém (RAS) je významným regulačním systémem podílejícím se na regulaci krevního tlaku a objemu a složení extracelulární tekutiny. Aktivace RAS může být zprostředkována několika mechanismy. Jedná se zejména o pokles krevního tlaku, který je zaznamenáván intrarenálními baroreceptory. Pokles krevního tlaku vede ke snížení perfuze ledvin, a tím se do moči filtruje menší množství NaCl. Snížené množství NaCl je zaznamenáváno v *macula densa* distálního tubulu a vede k uvolňování reninu. Další možností pro uvolňování reninu může být aktivace sympatického nervového systému, který inervuje juxtaglomerulární buňky nefronů.

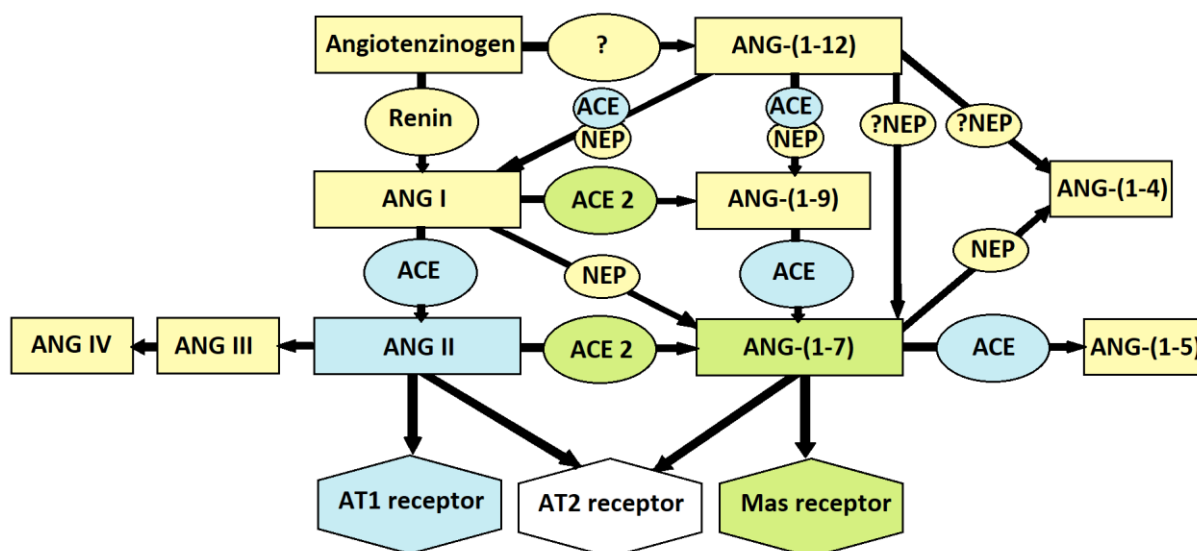
Renin, jehož činnost je prvním krokem v aktivaci RAS, je uvolňován exocytózou z juxtaglomerulárních (JG) buněk nefronu. Tento hormon je tvořen 335 aminokyselinami a je skladován v Golgiho aparátu JG buněk. Vzniká postupným odštěpováním aminokyselin z N-terminálního konce z preproreninu přes prorenin.

Zatím jediným známým substrátem pro renin je angiotenzinogen. Tento 453 aminokyselin dlouhý peptid je do krevního oběhu uvolňován z jater. Z angiotenzinogenu je reninem odštěpen neaktivní angiotenzin I (ANG I, ANG 1-10) dlouhý 10 aminokyselin.

Z ANG I je dále odštěpen dipeptid angiotenzin konvertujícím enzymem (ACE) na již plně aktivní oktapeptid angiotenzin II (ANG II, ANG 1-8). ACE je zinková metaloproteáza, která je exprimovaná převážně v plicích, a většina tohoto enzymu je vázána na membránu endotelu.

Hlavní účinky ANG II vedoucí k udržování krevního tlaku a reabsorpci soli a vody jsou zprostředkovány receptorem AT_1 . Mezi ně patří konstrikce krevních cév a eferentních arteriol, stimulace uvolňování aldosteronu a podpora buněčného růstu hladkosvalových buněk. K opačnému působení RAS dochází navázáním ANG II na AT_2 receptor. Výsledkem je vazodilatace zprostředkovaná NO syntázou, exkrece sodíku a inhibice buněčného růstu.

Dalším enzymem v kaskádě RAS je angiotenzin konvertující enzym 2 (ACE2), který hraje významnou roli ve vazodilataci. ACE2 přeměňuje ANG I na angiotensin-(1-9) a ANG II na angiotensin-(1-7) (ANG-(1-7)). Tím se odebírá substrát (ANG I) pro ACE a zároveň se snižuje množství ANG II. Výsledkem je snížení vazokonstrikčního působení ANG II přes AT_1 receptor. Navíc působení ANG-(1-7) vede k vazodilataci, natriuréze, diuréze a stimulaci tvorby vazodilatačních prostaglandinů (Chappell 2012). Tímto způsobem tvoří ACE2 a ANG-(1-7) protiváhu vazokonstrikčně působící ose ACE – ANG II – AT_1 . Nerovnováha tohoto systému může vést k různým patofyziologickým stavům, například k rozvoji hypertenze. Schéma RAS je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma renin-angiotenzinového systému. Modře je zvýrazněna klasická osa vedoucí k vazokonstrikčním účinkům zprostředkovaným AT₁ receptorem. Zeleně je zvýrazněna vazodilatační osa vedoucí přes ANG-(1-7) k Mas receptoru. ANG I, angiotenzin I; ANG II, angiotenzin II; ACE, angiotenzin konvertující enzym; ACE 2, angiotenzin konvertující enzym 2; NEP, neuronální endopeptidáza.

Převzato a upraveno z (Herath et al. 2013)

Ve studii (Guan S et al. 1992) porovnávající rozvojovou a udržovací fázi 2K1C hypertenze významně stoupl krevní tlak Sprague-Dawley potkanům po 7 dnech od provedení zákroku, po 25 dnech se ještě mírně zvýšil. Po 7 dnech stoupla i plazmatická koncentrace ANG I, ANG II a reninu. Po 25 dnech byly tyto hodnoty opět sníženy na původní úroveň jako u kontrolních potkanů. Koncentrace ANG II v obou ledvinách a koncentrace ANG I v zaklipované ledvině je zvýšená po 7 dnech a tyto zvýšené hodnoty přetrvávají i po 25 dnech, navzdory sníženým plazmatickým koncentracím ANG I, ANG II a reninu.

Ve studii zabývající se účinky ANG-(1-7) byl podáván inhibitor Mas receptoru kontrolním normotenzním HanSD potkanům a hypertenzním potkanům s rozvinutou aktivitou RAS (pokusné skupiny: TGR, HanSD po provedené 2K1C, HanSD s infuzí ANG II, HanSD a TGR na nízkosolné dietě). Bylo zjištěno, že inhibice účinku ANG-(1-7) způsobila významný pokles v GFR, RPF a exkreci sodíku u skupin se zvýšenou endogenní aktivitou RAS, tedy u potkanů TGR, u potkanů HanSD po provedené 2K1C nebo krmených nízkosolnou dietou. Oproti tomu tato inhibice neměla žádný vliv na kontrolní HanSD potkany, hypertenzní TGR a

HanSD s infuzí ANG II. ANG-(1-7) je tedy důležitým protihráčem ANG II za podmínek endogenně aktivovaného RAS (Bürgelová et al. 2005).

V navazující studii (Bürgelová et al. 2009) byly HanSD potkanům po zaklipování ledviny podávány inhibitory ANG-(1-7) receptoru a enzymu ACE2. Kontrolním HanSD potkanům se po 7 dnech od provedení 2K1C významně zvýšil krevní tlak, který se na podobně zvýšené úrovni držel až do konce pokusu (25. dne). Potkanům po provedené 2K1C s infuzí inhibitoru ANG-(1-7) receptoru se zvýšil krevní tlak a snížil RPF více než kontrolním potkanům. K ještě vyššímu zvýšení TK a snížení RPF a GFR došlo u skupiny potkanů po provedené 2K1C s infuzí inhibitoru ACE2 enzymu. U obou 2K1C skupin s infuzí inhibitorů byla naměřená plazmatická koncentrace ANG II na podobné úrovni jako u kontrolních potkanů. Naopak intrarenální koncentrace ANG II v nezaklipovaných ledvinách byly oproti kontrolám zvýšené. Tyto výsledky potvrzují, že v modelu 2K1C se ANG II významně podílí na rozvoji a udržování hypertenze a že ANG-(1-7) působí antagonisticky – vazodilatačně a renoprotektivně. Narušení osy ACE2 – ANG-(1-7) u modelu 2K1C přispívá k zhoršení hypertenze.

Vliv RAS blokády u CKD

Zablokováním renin-angiotenzinového systému pomocí inhibitorů ACE nebo blokátorů AT₁ receptorů se významně snižuje krevní tlak, čímž dochází ke zpomalení rozvoje CKD. Cílem několika studií bylo zjistit, zda má blokáda renin-angiotenzinového systému příznivý účinek na léčbu CKD pouze díky snížení TK nebo také prostřednictvím mechanismů nezávislých na snížení TK.

ANG II působí vazokonstrikčně na eferentní arteriolu, zatímco na aferentní arteriolu nemá takový vliv. Tím se zvyšuje tlak v glomerulu a dochází k hyperfiltraci, postupnému poškozování filtrační bariéry, zvyšování proteinurie a glomerulosklerózy. Blokáda RAS zamezuje vazokonstrikci eferentní arterioly a tak napomáhá k normalizaci tlaku v glomerulu a předchází rozvoji CKD.

Tuto představu potvrzuje několik studií. Potkanům kmene Munich-Wistar byla provedena ligační 5/6 NX. Po jednom týdnu od provedení zákroku byla některým skupinám nasazena léčba enalapilem (ACE inhibitor) a některým skupinám kombinovaná léčba pomocí reserpinu, hydralazinu, hydrochlorothiazidu. U neléčených skupin došlo k významnému zvýšení krevního tlaku, zatímco u obou léčených skupin bylo dosaženo nižšího TK, který byl u obou léčených skupin na podobné úrovni. Přesto se tyto dvě léčené skupiny odlišovaly

v proteinurii a glomeruloskleróze, které byly sníženy pouze u skupiny léčené enalaprilem (Anderson 1986).

Naopak ve studii (Kujal et al. 2010), ve které byla potkanům po provedené 5/6 NX podávána léčba blokující RAS (inhibitor ACE a blokátor AT₁ receptoru) a léčba nezávislá na RAS (alfa- a beta-blokátor a diuretikum), se zjistilo, že po snížení krevního tlaku na podobnou úroveň u obou typů léčby došlo i k podobným kardio- a renoprotektivním účinkům.

Cílem další studie (Adamczak et al. 2003) bylo zjistit, jestli může být glomeruloskleróza reverzibilním dějem. U Sprague-Dawley potkanů byla provedena 5/6 nefrektomie a po 8 týdnech od provedení zákroku se rozvinula glomeruloskleróza. Poté byla od 8. do 12. týdne od provedené 5/6 NX jedna skupina léčená vysokými dávkami enalaprilu a druhá ponechána bez léčby. U léčené skupiny došlo k částečnému zlepšení glomerulosklerózy a intersticiálního poškození při současném signifikantním snížení krevního tlaku. Zdá se proto, že tyto pozitivní účinky jsou závislé na změnách TK.

U modelu diabetické nefropatie (SHR/NDmcr-cp) bylo zjištěno, že navzdory podobnému snížení krevního tlaku pomocí tří různých látek (olmesartan – ACE inhibitor, nifedipin – blokátor kalciových kanálů, atenolol – beta-blokátor) pouze ACE inhibitor snižuje proteinurii a brání rozvoji glomerulosklerózy a tubulointersticiálního poškození (Izuhara et al. 2005).

2.4.2 Sympatický nervový systém

Sympatický nervový systém (SNS) se významně podílí na regulaci krevního tlaku a to tak, že působí vazokonstrikčně, zvyšuje srdeční akci, podporuje retenci sodíku ledvinami a stimuluje růst cév. Tato regulace je za normálních podmínek velmi významná. Problémem je však chronicky zvýšená aktivita SNS, která vede k hypertenzi a rozvoji CKD. Důvod, proč je zvýšená aktivita SNS udržována, zatím není zcela jasný.

Ledviny jsou bohatě inervovány a obsahují mnoho sensorických receptorů, z nichž nejdůležitějšími jsou baroreceptory, které jsou aktivovány v případě změny tlaku a průtoku krve v ledvině, a chemoreceptory aktivované ischemickými metabolity. Tyto receptory jsou aferentními nervy spojeny s mozkovými centry pro regulaci krevního tlaku a sympatického tonu.

Zvýšená aktivita sympatického nervového systému ovlivňuje v ledvinách několik funkcí. Prostřednictvím β_1 adrenergických receptorů exprimovaných na juxtaglomerulárních buňkách zvyšuje sekreci reninu, přes α_{1B} adrenergické receptory zvyšuje tubulární reabsorpci

sodíku a aktivací α_{1A} adrenergických receptorů zvyšuje odpor cév v ledvinách, čímž se snižuje RBF (DiBona 2005).

U Sprague-Dawley potkanů byla po provedené 5/6 nefrektomii měřena neuroadrenergická aktivita v různých částech mozku podílejících se na regulaci krevního tlaku pomocí stanovení hladiny noradrenalinu (NE). Bylo zjištěno, že po čtyřech týdnech od provedené 5/6 NX došlo ke zvýšení hladiny NE v posteriorním hypothalamickém jádru a v locus coeruleus (Bigazzi et al. 1994). V další studii byla navíc provedena bilaterální rhizotomie (přerušení aferentních nervů vedoucích z ledviny v oblasti dorzálních rohů míšních bez přerušení eferentní inervace) u potkanů po 5/6 NX, která zabránila zvýšeným hodnotám NE v mozku (Campese et al. 1995a). V následující studii (Campese et al. 1995b) byla navíc hodnocena glomeruloskleróza a výše krevního tlaku po 6 týdnech od provedení 5/6 NX a rhizotomie. Krevní tlak u Sprague-Dawley potkanů s 5/6 NX byl vyšší než u kontrol nebo u potkanů s 5/6 NX po rhizotomii. Glomeruloskleróza byla u potkanů s 5/6 NX po rhizotomii významně nižší než u potkanů po 5/6 NX. Tyto výsledky naznačují, že pro rozvoj a udržování hypertenze a CKD je nezbytná aktivace SNS pomocí aferentní inervace ledvin.

Výsledky studie (Brooks et al. 1993) zaměřující se na inhibici SNS pomocí beta-blokátorů ukázaly, že u potkanů po 5/6 NX je možné pomocí carvedilolu dosáhnout stejného poklesu krevního tlaku, proteinurie a glomerulosklerózy jako pomocí inhibitoru ACE captoprilu.

ANG II v mozku stimuluje SNS a podílí se tak na rozvoji hypertenze. U hypertenzních TGR potkanů je oproti normotenzním HanSD potkanům významně zvýšená koncentrace ANG II v hypothalamu a prodloužené míše, které odpovídají za regulaci TK (Senanayake et al. 1994). V další studii bylo zjištěno, že se ANG II podílí ve ventrolaterální části prodloužené míchy na excitaci sympatických neuronů a významně tak zvyšuje krevní tlak (Ito a Sved 1996).

Ve studii hodnotící sympatickou inervaci zaklípované ledviny pomocí fluorescenční mikroskopie se ukázalo, že u Sprague-Dawley potkanů se po 1 týdnu od provedení 2K1C rozvinula hypertenze a sympatická inervace se snížila. Po 1 - 3 týdnech po zaklípování ledviny byla u hypertenzních potkanů sympatická inervace na podobné úrovni jako u kontrolních potkanů. Důvodem těchto zjištění jsou pravděpodobně změny v koncentracích adrenergických transmitterů (Ljungqvist, Ungerstedt 1972).

Ve studii (Oliveira-Sales et al. 2014) bylo zjištěno, že se u potkanů kmene Wistar zvyšuje krevní tlak během 2 týdnů od provedení 2K1C a dále se významně zvyšuje až do 35. dne, poté je udržován na zvýšené hodnotě do 42. dne. Krevní tlak byl analyzován Fourierovou

transformací, ze které bylo zjištěno, že zvýšení sympatické aktivity nastává 28. den od provedení 2K1C, což odpovídá střední části rozvojové fáze a udržovací fázi hypertenze.

2.4.3 Syntáza oxidu dusnatého

Významným vazodilatačním systémem je syntáza oxidu dusnatého (NO-syntáza, NOS), která oponuje vazokonstrikčním systémům. Jsou známy tři izoformy tohoto enzymu - endotelová (eNOS), neuronální (nNOS) a indukibilní (iNOS).

NOS přeměňuje L-arginin na oxid dusnatý (NO) a L-citrulin. Vzniklý oxid dusnatý pak rychle difunduje do okolních hladkosvalových buněk, kde se váže na solubilní guanylát cyklázu. Ta umožňuje přeměnu GTP na cGMP, které aktivuje proteinkinázu G. Následně dojde ke snížení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů a tím k relaxaci hladkého svalstva a vazodilataci. NO je buňkami endotelu v malé míře produkován neustále a přispívá tak k regulaci udržování cévního tonu. Poločas rozpadu NO je velmi krátký, proto je působení NO lokální (Schmidt et al. 1993).

Pro regulaci krevního tlaku je nejdůležitější eNOS, která je exprimována buňkami endotelu krevních cév a v ledvině zodpovídá za největší část produkce NO. Ukázalo se však, že i nNOS hraje v ledvině důležitou roli. Neuronální NOS je ve velké míře exprimována v *macula densa*, v glomerulech, v buňkách tlustého vzestupného raménka a v aferentních i eferentních arteriolách (Wu et al. 1999).

Ve studii zabývající se produkcí oxidu dusnatého neuronální NO-syntázou (Kakoki et al. 2001) bylo zjištěno, že selektivní inhibicí nNOS pomocí dvou látek N-propyl-L-argininu (L-NPA) a N5-(1-imino3-butenyl)-L-ornitinu (v-NIO) došlo k 32 - 42% snížení množství NO v intersticiu ledvin. Toto snížení však nevedlo ke změně průtoku krve ledvinami. V případě, kdy byl podán neselektivní inhibitor NOS N-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME), došlo k podobnému snížení NO v intersticiu ledvin, avšak proti předchozímu případu došlo i k významnému snížení RBF. Z toho lze usuzovat, že produkce NO neuronální NO-syntázou je významná, má však minimální efekt na RBF. To by mohlo být způsobeno extravaskulárním výskytem nNOS.

V další studii (Červenka et al. 2001) bylo ukázáno, že u normotenzních potkanů kmene Wistar je NO produkován nNOS důležitým protihráčem vazokonstrikce zprostředkované ANG II. Po inhibici nNOS pomocí S-methyl-L-thiocitrulinu (L-SMTC) došlo u normotenzních potkanů k významnému snížení RBF a exkrece sodíku. V případě ANG II-hypertenzních potkanů (podávání ANG II potkanům kmene Wistar osmotickou

minipumpou) nedošlo po podání inhibitoru nNOS k žádné významné změně. Na základě těchto výsledků se dá předpokládat, že snížená aktivita nNOS u hypertenzních potkanů může přispívat k rozvoji a udržování hypertenze u tohoto modelu.

Dalším možným důvodem pro nedostatečné vazodilatační působení oxidu dusnatého u hypertenzních modelů je přítomnost reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Cílem další studie (Vaněčková et al. 2015) bylo zhodnotit roli NO a jeho interakci s kyslíkovými radikály v regulaci krevního tlaku a funkce ledvin během rozvojové fáze hypertenze u heterozygotních TGR potkanů. V první části byly srovnávány změny krevního tlaku a funkce ledvin u kontrolních normotenzních potkanů kmene HanSD a prehypertenzních TGR potkanů po akutním podání inhibitoru NOS L-NAME. Výchozí hodnoty tlaku u obou kmenů byly na podobné úrovni. Po podání L-NAME došlo k většímu vzrůstu krevního tlaku u TGR než u HanSD ($+42 \pm 4$ vs. $+25 \pm 3$ mm Hg). V druhé části byl potkanům podán tempol odstraňující kyslíkové radikály, který by měl zvýšit biologickou dostupnost NO, a tím tlakovou odpověď na L-NAME, ale žádný rozdíl mezi kmeny TGR a HanSD nebyl zaznamenán. Ukázalo se tedy, že prehypertenzní TGR potkani mají zvýšenou aktivitu NO v krevním řečišti, avšak relativně nedostatečnou intrarenální odpověď na NO. Nedostatečnost tohoto kompenzačního mechanismu působícího proti účinkům ANG II může v tomto modelu přispívat k rozvoji hypertenze.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit, jaký je podíl vybraných vazoaktivních (vazokonstrikčních/vazodilatačních) systémů, které se podílejí na regulaci krevního tlaku v různých fázích (rozvojová a udržovací) chronického onemocnění ledvin navozeného částečnou nefrektomií (5/6 nefrektomie) a dvouledvinovou-jednosvorkovou (2K1C) hypertenzí.

4 METODIKA

Potkani kmene TGR, HanSD a Wistar byli chováni za standardních laboratorních podmínek při teplotě 22 °C a režimu 12 hodin světlo - 12 hodin tma s volným přístupem k vodě a dietě Altromin (0,45 % NaCl). Všechny postupy byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu AV ČR a jsou v souladu s Evropskou konvencí o ochraně zvířat.

ČÁSTEČNÁ NEFREKTOMIE U REN-2 TRANSGENNÍCH POTKANŮ

V první části pokusu byli použiti samci hypertenzních heterozygotních Ren-2-transgenních (TGR) potkanů a samci normotenzních kontrolních potkanů kmene Hannover Sprague Dawley (HanSD). Pro navození stavu chronického onemocnění ledvin byla u některých potkanů kmene TGR a HanSD provedena částečná 5/6 nefrektomie (5/6 NX). Tato procedura spočívá v odebrání jedné celé ledviny a obou pólů kontralaterální ledviny. Celkem je odebráno 70 - 85 % tkáně. Tento zákrok proběhl pod celkovou anestézií s použitím anestetik Zoletil 100 (8 mg/kg) a Rometar (4 mg/kg) podaných intramuskulárně.

Na základě literárních údajů jsme zkoumali potkany v rozvojové fázi CKD, kdy se krevní tlak po provedení 5/6NX výrazně zvyšuje, a po čtvrtém týdnu, kdy nastává tzv. fáze udržovací, během níž se krevní tlak již udržuje na stabilní zvýšené úrovni. Podle toho byli potkani rozděleni do následujících skupin (tabulka 2):

Tabulka 2: Rozdělení TGR potkanů do skupin a jejich počty ve skupinách

Označení	Popis	Počet
TGR kontroly	Kontrolní TGR potkani	9
TGR 5/6NX - 1. týden	TGR potkani, kterým byl měřen krevní tlak a vazoaktivní balance 1 týden po provedené 5/6 nefrektomii	11
TGR 5/6NX - 4. týden	TGR potkani, kterým byl měřen krevní tlak a vazoaktivní balance 4 týdny po provedené 5/6 nefrektomii	9
HanSD kontroly	Kontrolní HanSD potkani	9
HanSD 5/6NX - 1. týden	HanSD potkani, kterým byl měřen krevní tlak a vazoaktivní balance 1 týden po provedené 5/6 nefrektomii	10
HanSD 5/6NX - 4. týden	HanSD potkani, kterým byl měřen krevní tlak a vazoaktivní balance 4 týdny po provedené 5/6 nefrektomii	12

GOLDBLATTOVA DVOULEDVIHOVÁ JEDNOSVORKOVÁ HYPERTENZE U POTKANŮ KMENE WISTAR

V druhé části práce byli použiti samci potkanů kmene Wistar. Jako model chronického onemocnění ledvin byla v tomto případě použita Goldblattova dvouledvinová jednosvorková hypertenze (two-kidney, one-clip, 2K1C). Byla provedena stenóza renální artérie pomocí tenké stříbrné svorky, která byla vytvarována tak, aby omezila průměr artérie na 0,2 mm. Tím bylo sníženo krevní zásobení ledviny a došlo k její atrofii. Naopak kontralaterální ledvina hypertrofovala. Stenóza byla provedena pod celkovou anestézií Izofluranem (2,5 %). Podobně jako u modelu 5/6 nefrektomie jsme potkany rozdělili do skupin rozvojové a udržovací fáze hypertenze (tabulka 3).

Tabulka 3: Rozdělení Wistar potkanů do skupin a jejich počty ve skupinách.

Označení	Popis	Počet
Wistar kontroly	Kontrolní potkani kmene Wistar	13
Wistar 2K1C - 1. týden	Wistar potkani, kterým byl měřen krevní tlak a vazoaktivní balance 1 týden po provedení 2K1C	11
Wistar 2K1C - 4. týden	Wistar potkani, kterým byl měřen krevní tlak a vazoaktivní balance 4 týdny po provedení 2K1C	8

MĚŘENÍ KREVNÍHO TLAKU A VAZOAKTIVNÍ BALANCE

Měření výše krevního tlaku potkanů kmene TGR, HanSD a Wistar probíhalo ve věku 11 - 13 týdnů. Pro omezení vlivu cirkadiálních rytmů bylo měření prováděno vždy dopoledne mezi 8. a 11. hodinou. Krevní tlak byl potkanům měřen přímou metodou po kanylaci karotické artérie. Pro následné podávání inhibitorů vazoaktivních systémů byla zavedena také další kanyla do jugulární vény. Kanylace proběhla pod celkovou anestézií pomocí Izofluranu (2,5 %) jeden den před vlastním měřením TK.

Měření krevního tlaku potkanů probíhalo v klimatizované místnosti při teplotě 21 °C. Potkani byli umístěni do průhledných krabiček, které částečně omezily jejich pohyb. Arteriální kanyla byla připojena k přístroji pro měření krevního tlaku PowerLab (ADInstruments Ltd., Bella Vista, NSW, Austrálie). Krevní tlak byl zaznamenáván pomocí programu LabChart (obrázek 2).

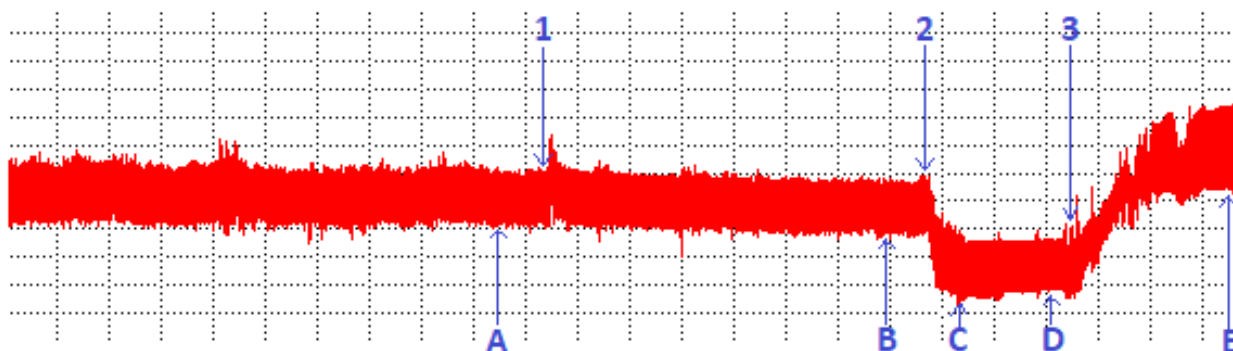


Obrázek 2: Měření krevního tlaku.

Při měření vazoaktivní balance byli potkani ponecháni v klidu po dobu 20 minut a na konci této periody byl zaznamenán bazální krevní tlak. Poté byly postupně podávány inhibitory jednotlivých vazoaktivních systémů. Nejprve inhibitor renin-angiotensinového systému captopril (ACE inhibitor) v dávce 10 mg/kg po dobu 15 minut. Druhý v pořadí byl podán inhibitor sympatického nervového systému pentolinum (gangliový blokátor) v dávce 5 mg/kg až do ustálení TK (cca 5 minut). Třetí podávanou látkou byl inhibitor syntázy oxidu dusnatého N-omega-nitro-L-arginin methylester hydrochlorid (L-NAME) v dávce 30 mg/kg. Ustálení TK po podání L-NAME trvalo 5 - 7 minut.

Všechny podávané inhibitory zakoupené u společnosti Sigma (St. Louis, Missouri, USA) byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. Látky byly podány jako intravenózní bolus (1 ml/kg).

Pro vyhodnocení naměřených záznamů pomocí programů Labchart a Excel byly vybírány úseky zaznamenané křivky po ustálení TK po podané látce podle obrázku 3. Odečtené hodnoty byly použity pro výpočet podílu RAS, SNS a NOS na výši krevního tlaku (delta capto, delta pento, delta L-NAME) podle tabulky 4.



Obrázek 3: Originální záznam tlaku krve. 1 - podání captoprilu (10 mg/kg), 2 - podání pentolinia (5 mg/kg), 3 - podání L-NAME (30 mg/kg), A - odečet bazálního krevního tlaku, B - výše TK po podání captoprilu, C - výše TK po podání pentolinia (největší pokles TK), D - výše tlaku po podání pentolinia (po ustálení TK), E - výše tlaku po podání L-NAME.

Tabulka 4: Výpočet podílu RAS, SNS a NOS na výši krevního tlaku (delta capto, delta pento, delta L-NAME).

	Označení v obrázku 3	Popis
Delta capto	Krevní tlak v bodě B minus krevní tlak v bodě A	TK po podání captoprilu - bazální TK
Delta pento	Krevní tlak v bodě D minus krevní tlak v bodě A	TK po podání pentolinia (po ustálení TK) - TK po podání captoprilu
Delta L-NAME	Krevní tlak v bodě E minus krevní tlak v bodě C	TK po podání L-NAME - TK po podání pentolinia (nejvyšší pokles TK)

ODBĚR ORGÁNŮ A KRVE

Po změření TK byla potkanům odebrána krev do zkumavek s EDTA, která byla následně stočena (5000 ot./min, 10 min, 4 °C). Získaná plazma byla zamražena a dále použita ke stanovení močoviny. Po usmrcení potkanů byly odebrány ledviny a srdce, které byly zváženy. Ke stanovení močoviny v plazmě byl použit Urea Assay Kit (Erba Mannheim, Germany) dle instrukcí výrobce.

STATISTIKA

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty \pm SEM. Data byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad InStat 3 pomocí testů one-way ANOVA a Tukey-Kramer test. Výsledky jsou považovány za statisticky významné při $p < 0,05$. Obrázky byly vytvořeny pomocí programu GraphPad Prism 5.

5 VÝSLEDKY

5.1 5/6 NEFREKTOMIE

Tělesná hmotnost

Z tabulky 5 vyplývá, že potkani kontrolní skupiny HanSD mají významně vyšší hmotnost než potkani TGR kontrolní skupiny a než všechny ostatní skupiny. Významný rozdíl v tělesné hmotnosti je dále u skupin HanSD a TGR měřených ve 4. týdnu od provedené 5/6 NX a u skupiny TGR kontroly proti TGR 5/6NX ve 4. týdnu.

Tabulka 5: Hmotnosti potkanů kmene TGR a HanSD a jejich počty v jednotlivých skupinách.

skupina	počet zvířat	hmotnost (g)	SE
HanSD kontroly	9	496	8
HanSD 5/6NX - 1. týden	11	390 #	18
HanSD 5/6NX - 4. týden	9	426 #	11
TGR kontroly	9	419 *	7
TGR 5/6NX - 1. týden	10	378 †	8
TGR 5/6NX - 4. týden	12	345 *#†	13

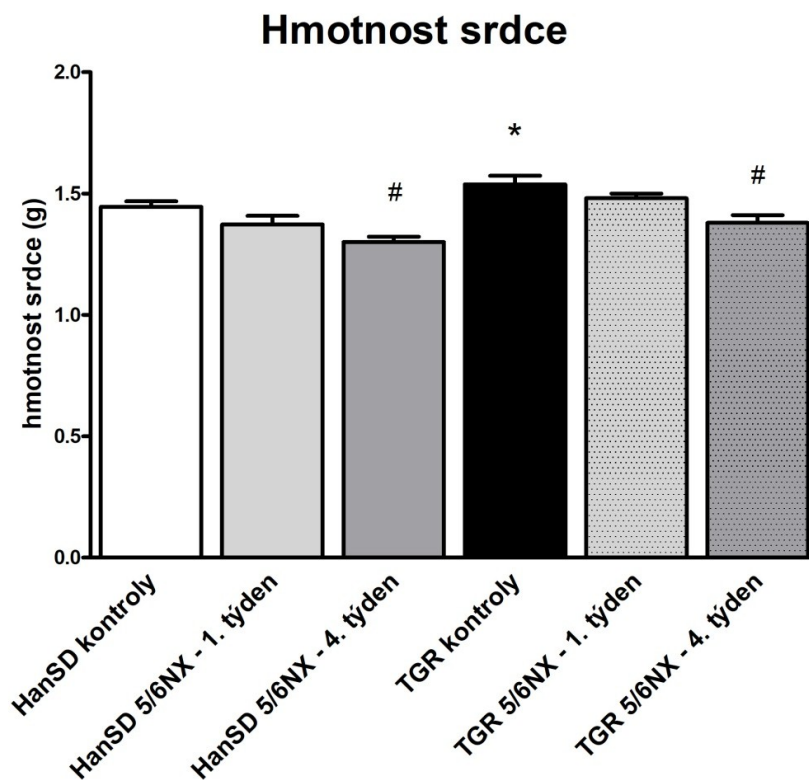
*p < 0,05 proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

#p < 0,05 proti kontrole v rámci skupiny

†p < 0,05 proti HanSD kontrole

Hmotnost srdce

Hmotnost srdce (graf 2) je u TGR potkanů významně vyšší než u HanSD potkanů. U obou kmenů (TGR a HanSD) vidíme v čase tendenci k poklesu hmotnosti srdce po 5/6NX. Tento pokles je u potkanů obou kmenů po 4 týdnech po 5/6NX signifikantní.



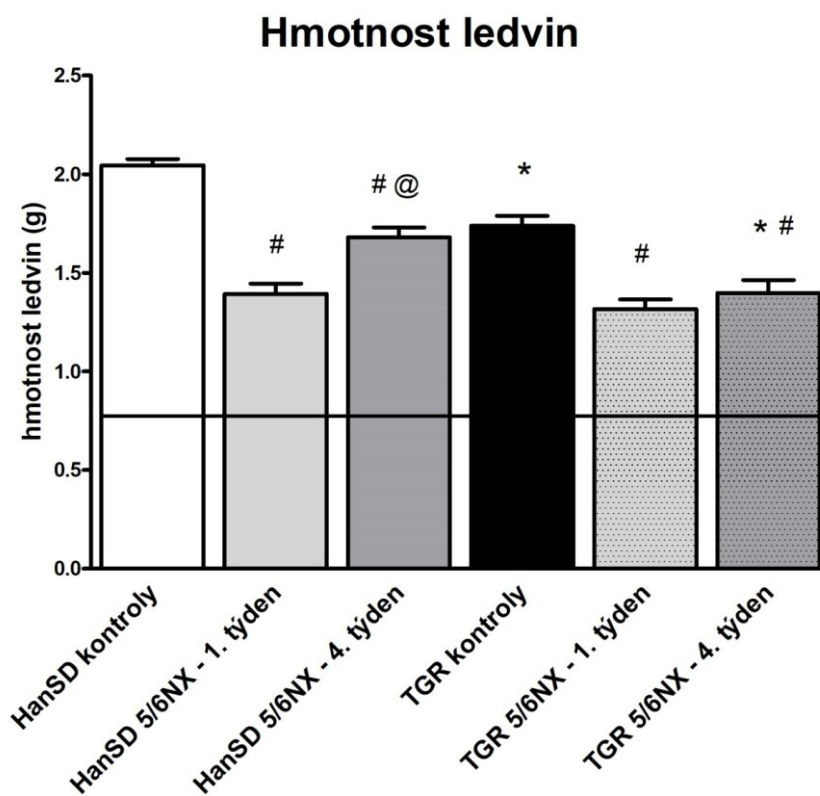
Graf 2: Hmotnost srdce u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

Hmotnost ledvin

Hodnoty hmotností ledvin uvedené v grafu 3 u kontrol (HanSD kontroly a TGR kontroly) se týkají jedné ledviny, u nefrektomovaných skupin je zaznamenána hmotnost zbytku ledviny. Při nefrektomii bylo potkanům odstraněno 73 % tkáně ledvin. Čára na grafu 3 odpovídá této hodnotě, znázorňuje tedy, kolik ledviny potkanům po nefrektomii zůstalo. Z obrázku je patrné, že 5/6 NX vede ke kompenzační hypertrofii kontralaterální ledviny. Zatímco u HanSD je tento proces průběžný, u TGR měřených po 4 týdnech po 5/6NX k dalšímu zvýšení hypertrofie nedochází.



Graf 3: Hmotnost ledvin u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX). Vodorovná čára znázorňuje redukci ledvinné tkáně po provedené 5/6 nefrektomii.

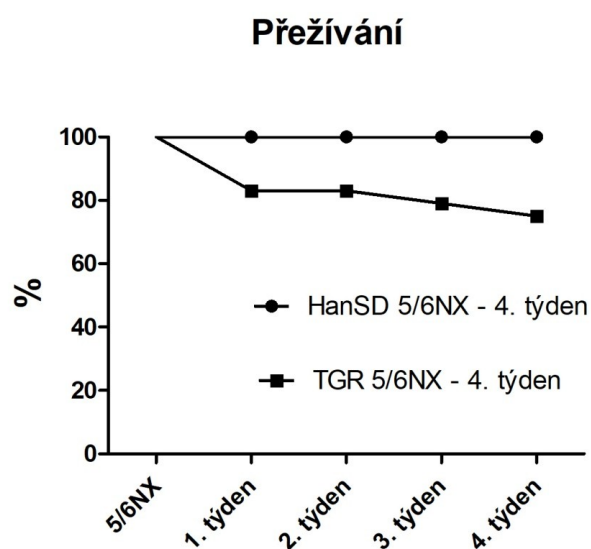
* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

@ $p < 0,05$ 1. týden proti 4. týdnu

Přežívání zvířat

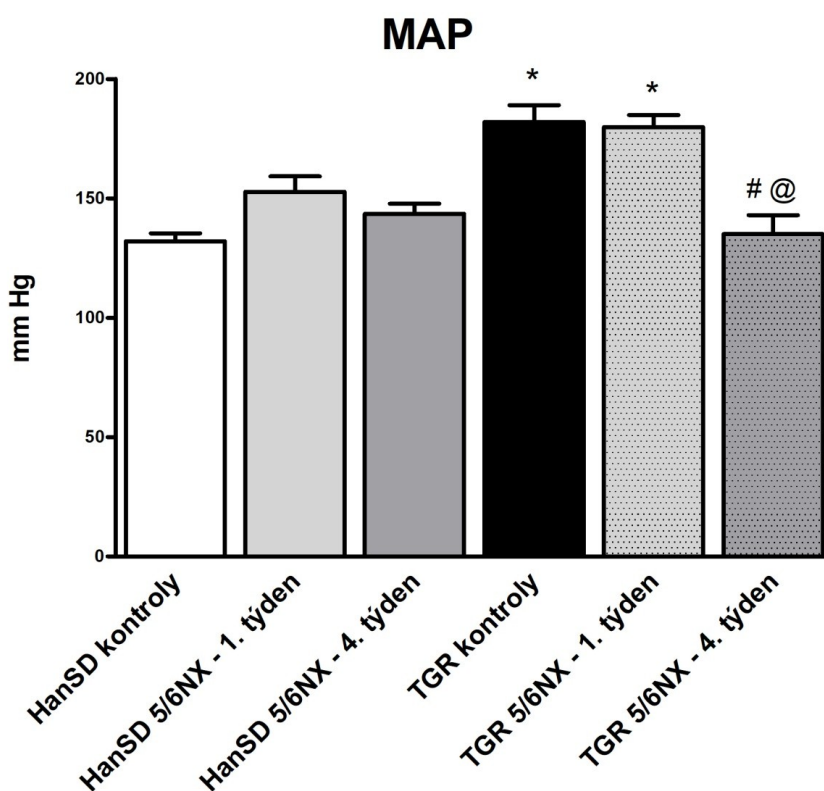
Přežívání kontrolních HanSD i TGR (graf 4) potkanů bylo 100 %, žádný HanSD potkan po provedené 5/6 nefrektomii neuhynul. Naproti tomu u TGR po provedené nefrektomii došlo v průběhu 1. týdne k významnému poklesu přežívání, které se v dalších třech týdnech podstatně nezhoršovalo. Výsledná mortalita u těchto zvířat byla 25 %.



Graf 4: Přežívání kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

Bazální střední arteriální tlak

Na grafu 5 jsou zachyceny hodnoty středního arteriálního tlaku. Je vidět signifikantní rozdíl mezi kmeny HanSD a TGR (HanSD kontroly 132 ± 3 mm Hg vs. TGR kontroly 182 ± 7 mm Hg). U skupiny HanSD měřených za týden po 5/6NX vidíme sice tendenci ke zvýšení TK, ale ani v 1. týdnu ani ve 4. týdnu nejsou hodnoty TK signifikantně vyšší. U TGR potkanů měřených 1 týden po provedené 5/6 nefrektomii nedochází k žádné změně TK, zatímco ve skupině TGR měřené 4. týden po 5/6 NX dochází naopak k významnému snížení středního arteriálního tlaku (TGR 5/6NX - 4. týden 135 ± 8 mm Hg).



Graf 5: Střední arteriální tlak (MAP) u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

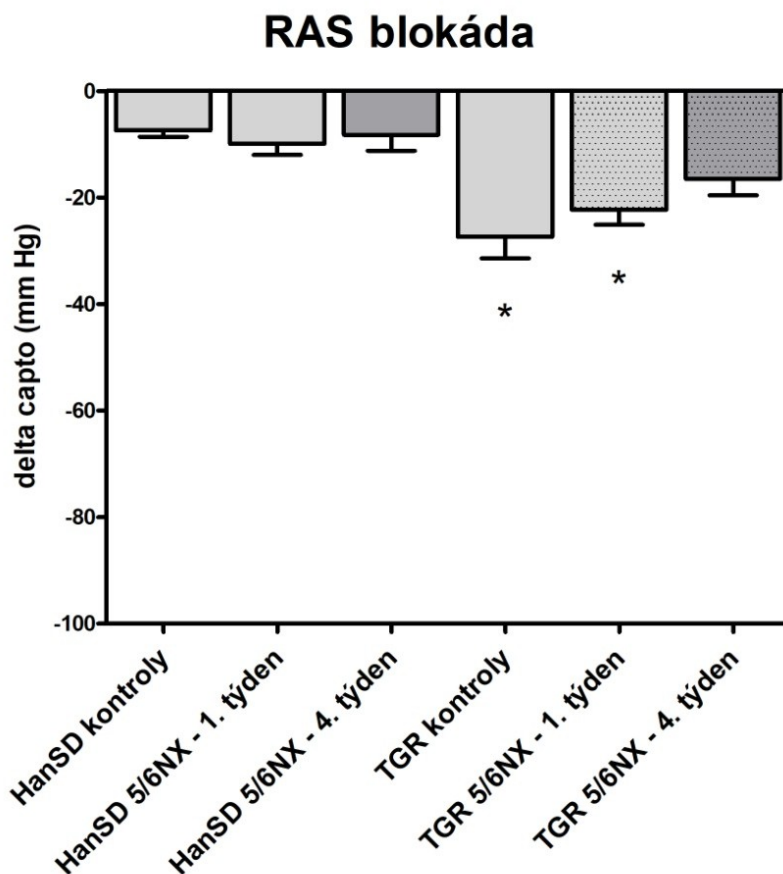
* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

@ $p < 0,05$ 1. týden proti 4. týdnu

Akutní blokáda renin-angiotenzinového systému

Podíl renin-angiotenzinového systému na udržování TK (graf 6) je u kmene TGR (-27 ± 4 mmHg) významně vyšší než u kmene HanSD ($-7 \pm 1,2$ mmHg). U HanSD potkanů měřených 1 a 4 týdny po provedené 5/6 NX nevidíme žádné signifikantní zvýšení podílu RAS na udržování TK. Naproti tomu u TGR potkanů měřených po 1 týdnu po 5/6 NX se tento podíl snižuje a tato tendence pokračuje i po 4 týdnech po provedené 5/6 nefrektomii.

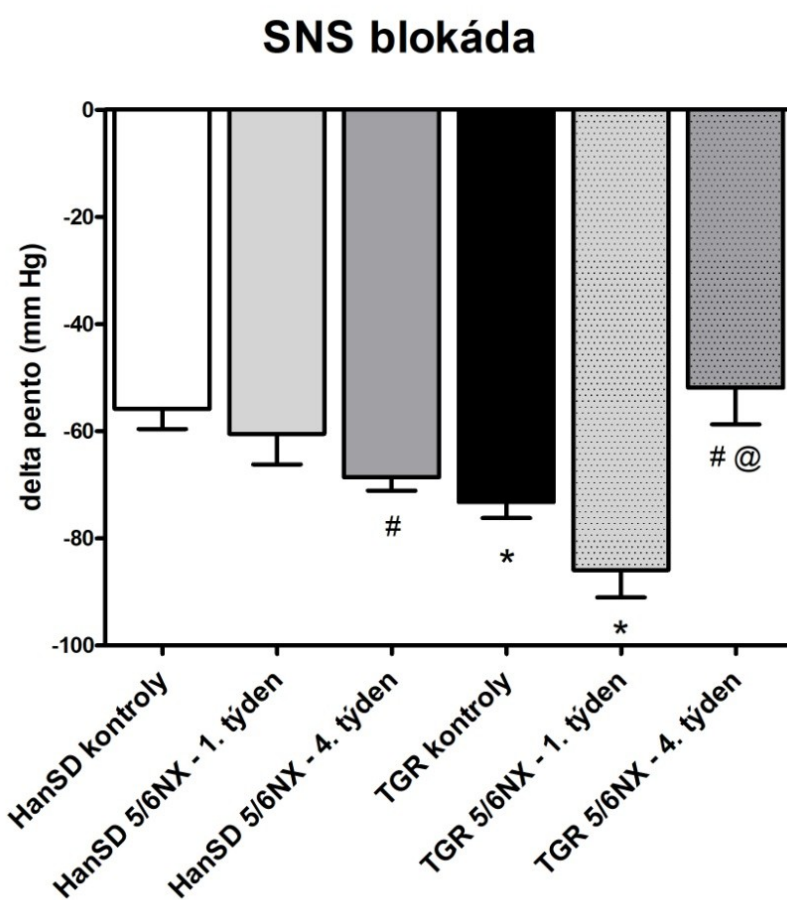


Graf 6: Akutní blokáda renin-angiotenzinového systému (RAS blokáda). Podíl renin-angiotenzinového systému na výši krevního tlaku (delta capto) u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

Akutní blokáda sympatického nervového systému

Podíl sympatické vazokonstrikce (graf 7) je u TGR potkanů vyšší (-73 ± 3 mm Hg) než u HanSD (-56 ± 4 mm Hg) a po provedené 5/6NX v prvním týdnu u obou kmenů jeho podíl mírně roste. Tento nárůst je u skupiny HanSD měřených po 4. týdnu po 5/6NX významný (o 12,8 mm Hg, HanSD 5/6NX - 1. týden $-69 \pm 2,5$ mm Hg). U skupiny TGR měřených po 4 týdnech po 5/6NX se však podíl SNS významně snižuje (TGR 5/6NX - 4. týden $-52 \pm 6,8$ mm Hg).



Graf 7: Akutní blokáda sympatického nervového systému (SNS blokáda). Podíl sympatického nervového systému na výši krevního tlaku (delta pento) u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

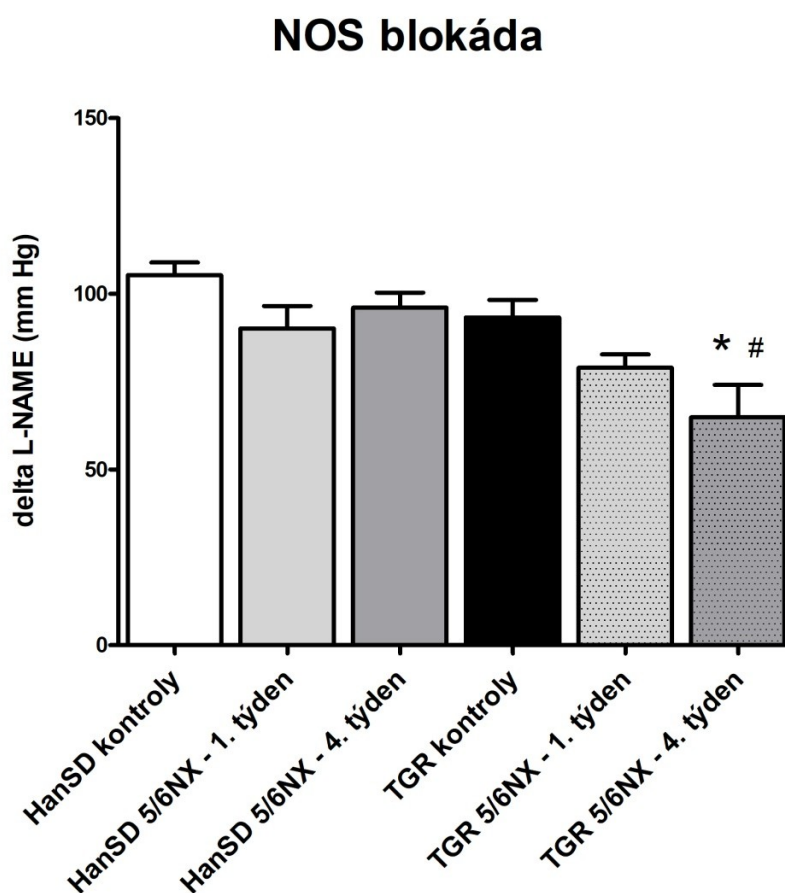
* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

@ $p < 0,05$ 1. týden proti 4. týdnu

Akutní blokáda syntázy oxidu dusnatého

Podíl NO-dependentní vazodilatace na udržování TK (graf 8) dosahuje ve všech skupinách podobné úrovně, není tedy ovlivněn 5/6 nefrektomií. Výjimkou je skupina TGR potkanů měřených po 4 týdnech po 5/6NX, u které je tlaková odpověď na podání L-NAME významně oslabena.



Graf 8: Akutní blokáda syntázy oxidu dusnatého (NOS blokáda). Podíl syntázy oxidu dusnatého na výši krevního tlaku (delta L-NAME) u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

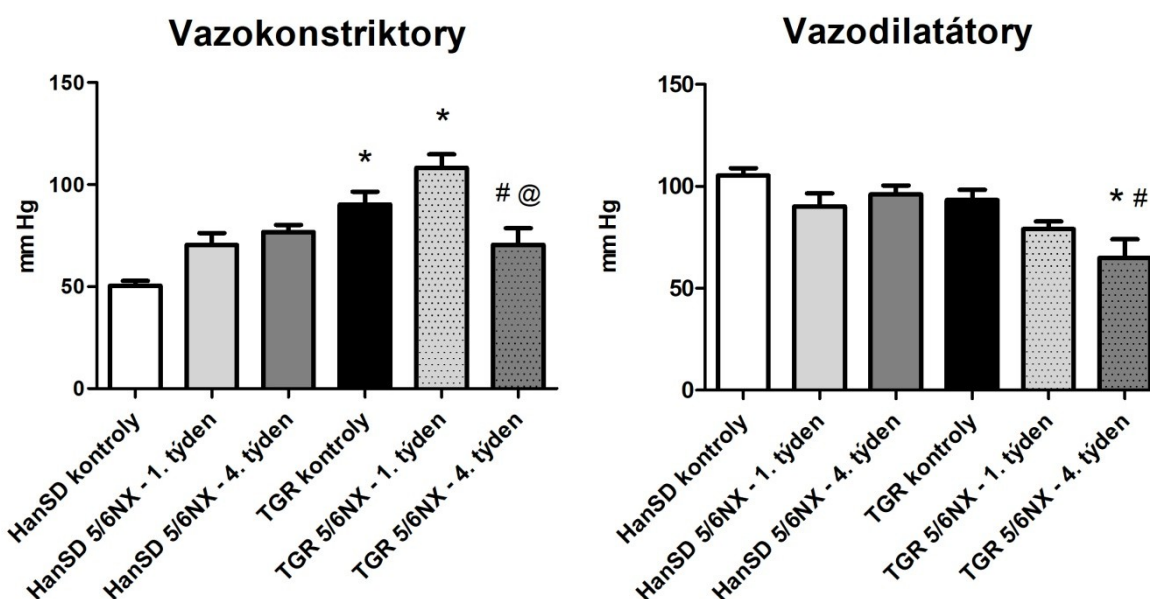
* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

Podíl vazokonstriktorů a vazodilatátorů

Na grafu 9 je zachycen podíl vazokonstriktorů a vazodilatátorů na udržování TK. U vazokonstriktorů byl zaznamenán významný mezikmenový rozdíl. Po provedení 5/6 NX se u obou kmenů podíl vazokonstriktivních systémů mírně zvyšuje, avšak u TGR potkanů měřených 4 týdny po provedení 5/6 NX podíl vazokonstriktorů významně klesá.

Podíl vazodilatačního systému NO-syntázy na výši krevního tlaku je u všech HanSD skupin na podobné úrovni. U TGR potkanů po 5/6 NX mírně klesá a po 4. týdnu je významně nižší než u TGR kontrol.



Graf 9: Podíl vazokonstriktorů a vazodilatátorů na udržování TK u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX). Vazokonstriktory: součet delta capto a delta pento. Vazodilatátory: delta L-NAME.

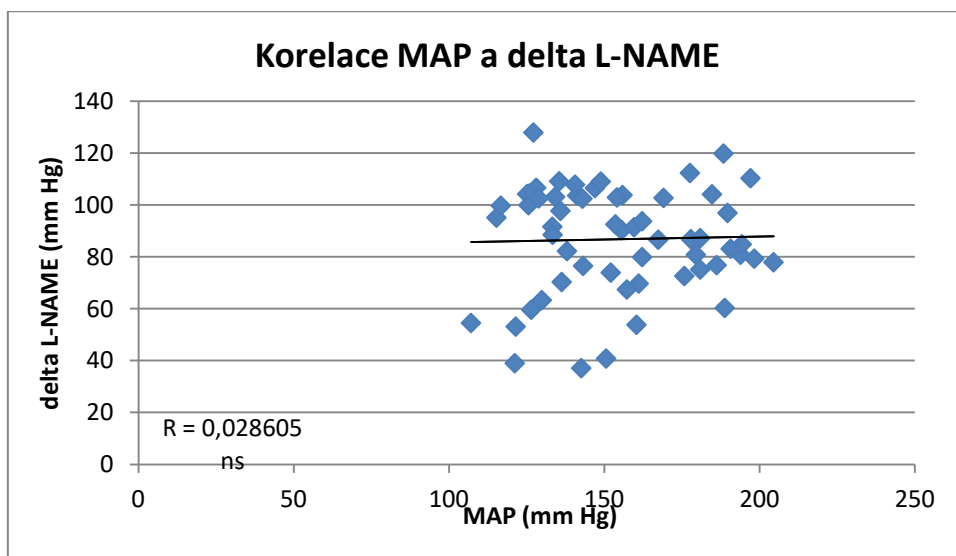
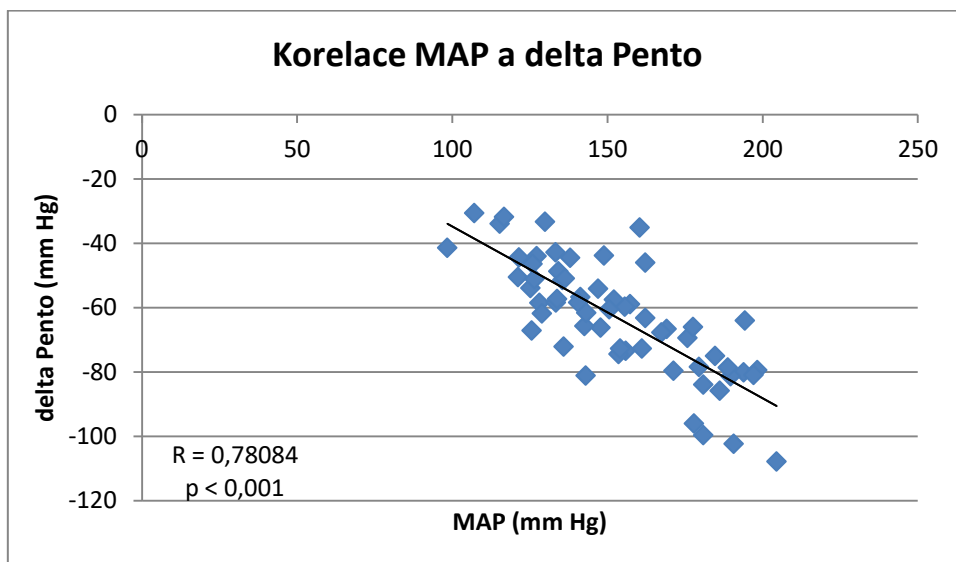
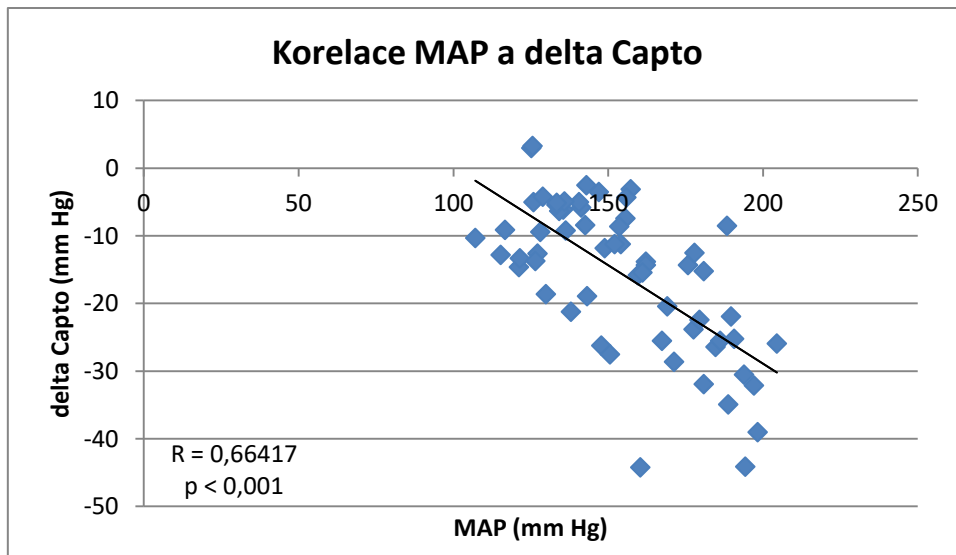
* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

@ $p < 0,05$ 1. týden proti 4. týdnu

Korelace středního arteriálního tlaku s RAS, SNS a NOS

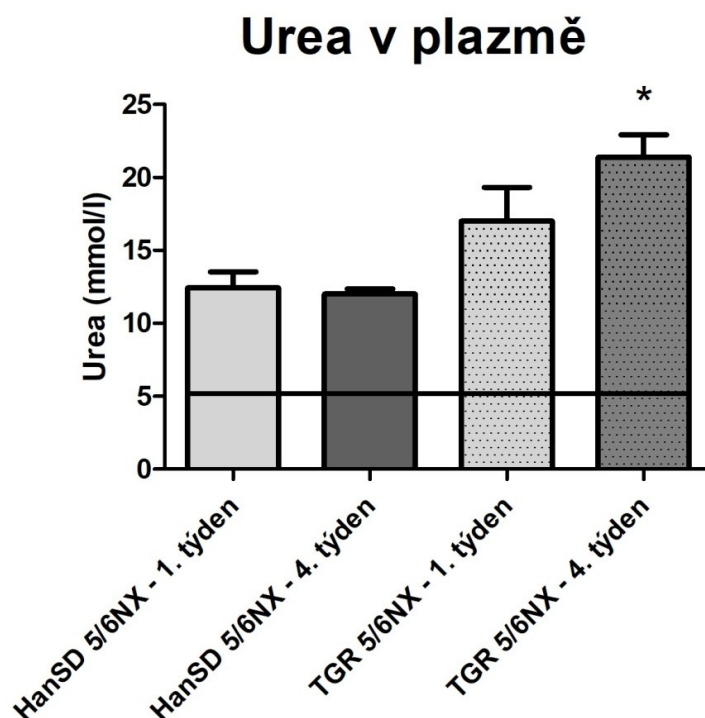
Na grafu 10 jsou vyneseny korelace bazálního arteriálního tlaku se změnami MAP po akutní blokádě RAS, SNS a NOS. Z analýzy vyplývá, že s rostoucím MAP roste i podíl RAS a SNS. V obou případech je tato korelace významná. Naproti tomu zůstává podíl NO syntázy stejný a se stoupajícím MAP se nemění.



Graf 10: Korelace středního arteriálního tlaku s RAS, SNS a NOS u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX).

Urea v plazmě

Koncentrace močoviny v plazmě (graf 11) u nefrektomovaných potkanů obou kmenů je zvýšená oproti normálním hodnotám uváděným v literatuře (Zicha et al. 1990) (tuto koncentraci znázorňuje vodorovná čára). U TGR potkanů měřených 4. týden od provedení 5/6 NX je koncentrace močoviny významně vyšší než u HanSD potkanů s 5/6 NX ($21,4 \pm 1,5$ vs. $12,0 \pm 0,4$ mmol/l).



Graf 11: Množství močoviny v plazmě u kontrolních HanSD a hypertenzních TGR potkanů po provedené 5/6 nefrektomii (NX). Vodorovná čára představuje hodnotu kontrolních potkanů.

* $p < 0,05$ proti odpovídající kontrolní skupině (HanSD vs. TGR)

5.2 2K1C

Tělesná hmotnost

Z tabulky 6 vyplývá, že tělesné hmotnosti potkanů kmene Wistar se liší ve skupině měřené po 1. týdnu od provedené 2K1C, u které je hmotnost nižší než u ostatních dvou skupin.

Tabulka 6: Hmotnosti potkanů kmene Wistar a jejich počty v jednotlivých skupinách.

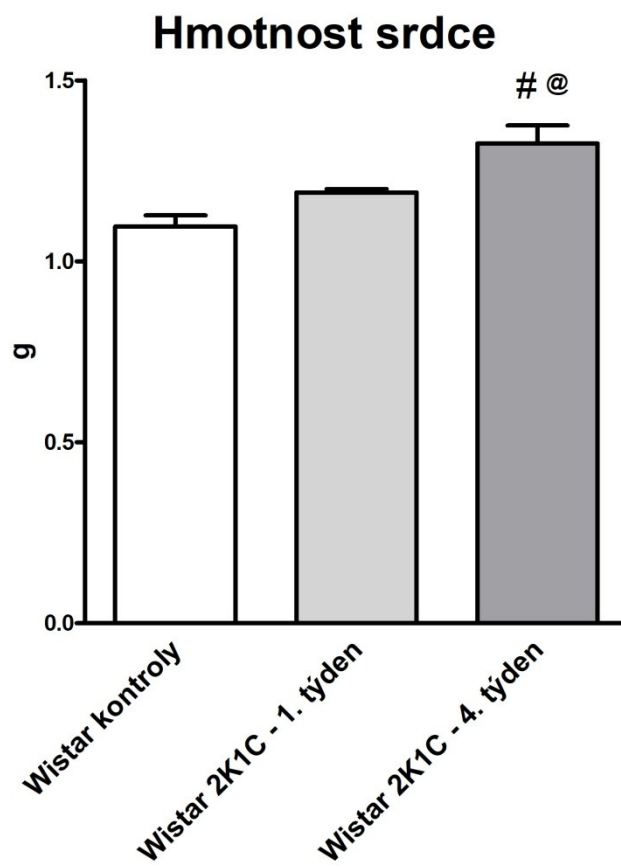
Skupina	Počet zvířat	Hmotnost (g)	SE
Wistar kontroly	13	463	10
Wistar 2K1C - 1. týden	11	399 #	8
Wistar 2K1C - 4. týden	8	445 @	14

#p < 0,05 proti kontrole v rámci skupiny

@p < 0,05 1. týden proti 4. týdnu

Hmotnost srdce

Hmotnost srdce (graf 12) se u potkanů kmene Wistar v důsledku rozvíjející se hypertenze po provedení 2K1C postupně zvyšuje. U skupiny potkanů měřených po 4 týdnech od 2K1C je toto zvýšení významné.



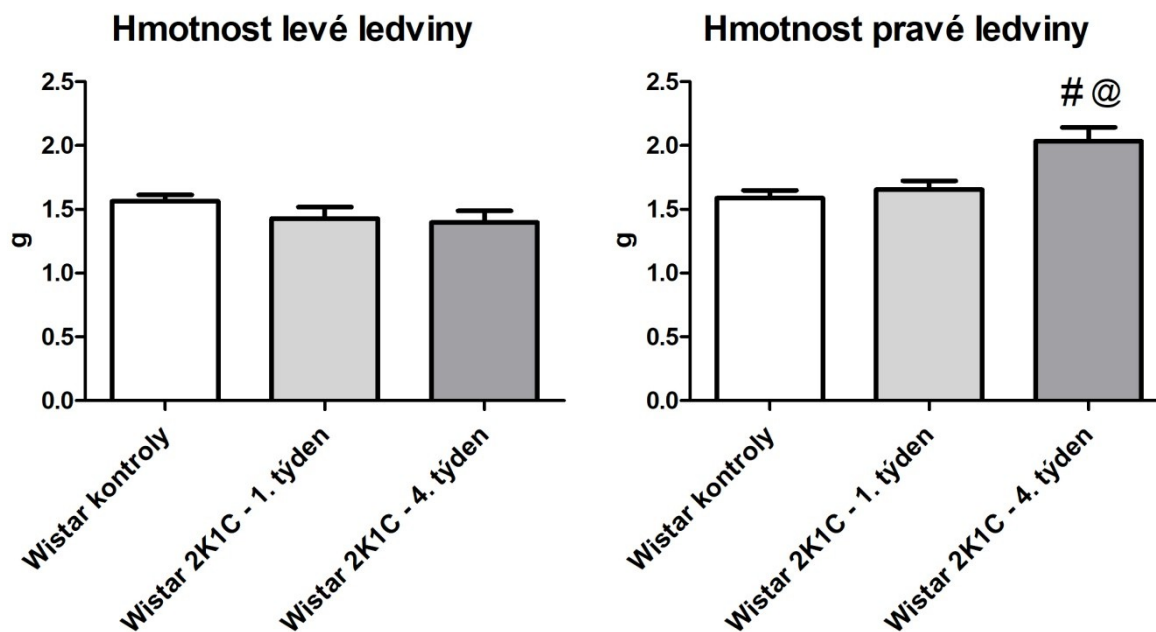
Graf 12: Hmotnost srdce u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

#p < 0,05 proti kontrole v rámci skupiny

@p < 0,05 1. týden proti 4. týdnu

Hmotnost ledvin

Hmotnost levé ledviny, do které byl omezen přístup krve stenózou renální artérie, se v průběhu pokusu po provedeném zákroku mírně snižuje. Naopak hmotnost pravé kontralaterální ledviny se po provedení 2K1C významně zvyšuje, toto zvětšení je po 4 týdnech od 2K1C statisticky významné (graf 13).



Graf 13. Hmotnost levé a pravé ledviny u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

#p < 0,05 proti kontrole v rámci skupiny

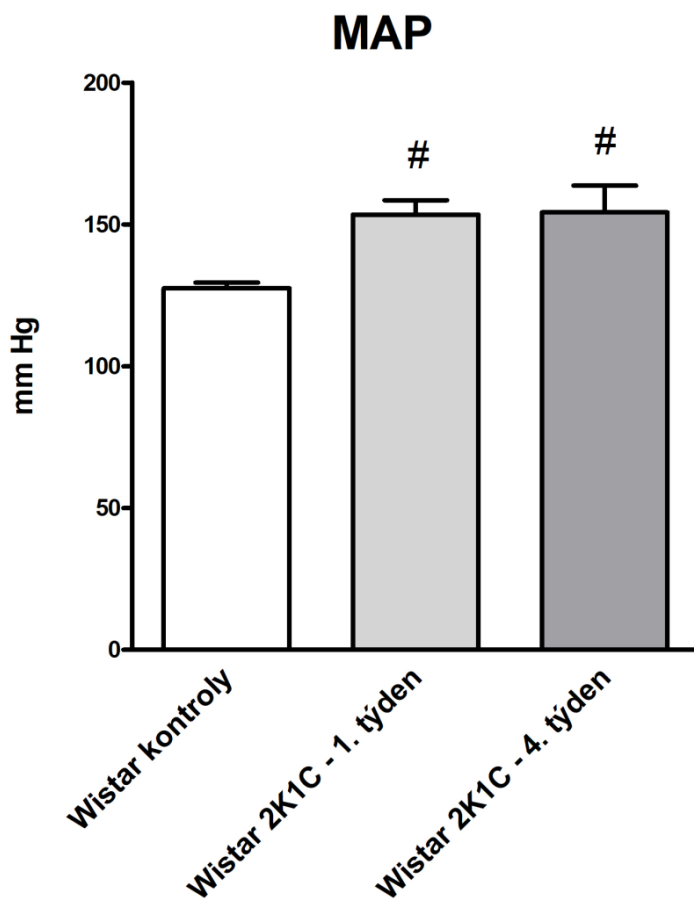
@p < 0,05 1. týden proti 4. týdnu

Přežívání zvířat

Čtvrtého týdne od provedené stenózy renální artérie se dožilo 100 % potkanů.

Bazální střední arteriální tlak

Na grafu 14 vidíme, že v průběhu pokusu došlo k signifikantnímu vzrůstu TK u potkanů po 2K1C po 1. a 4. týdnu oproti kontrolní skupině (Wistar kontroly 128 ± 2 mm Hg, Wistar 2K1C - 1. týden 153 ± 5 mm Hg, Wistar 2K1C - 4. týden 154 ± 9 mm Hg).

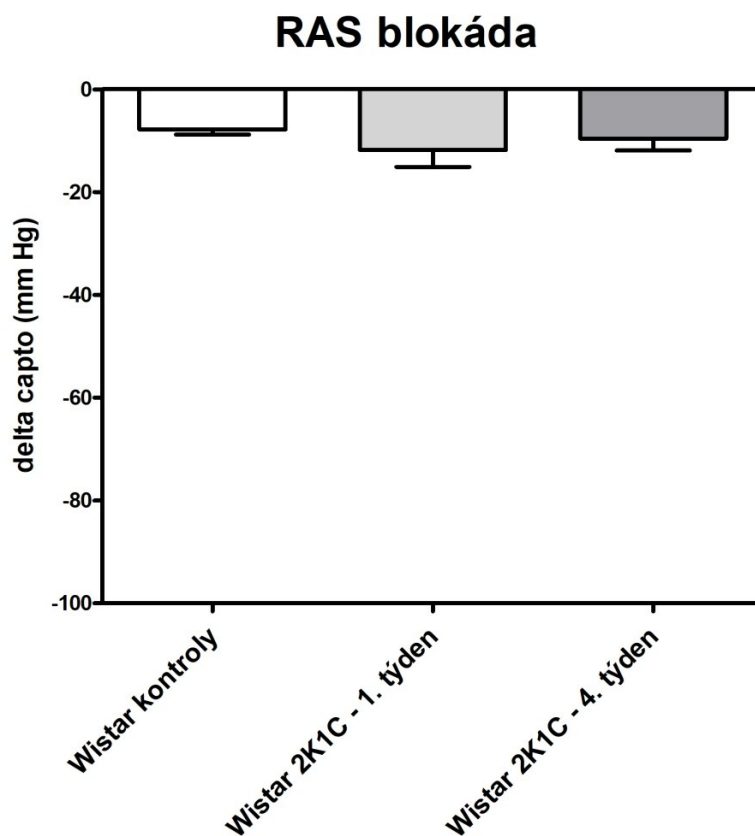


Graf 14: Střední arteriální tlak (MAP) u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

Akutní blokáda renin-angiotenzinového systému

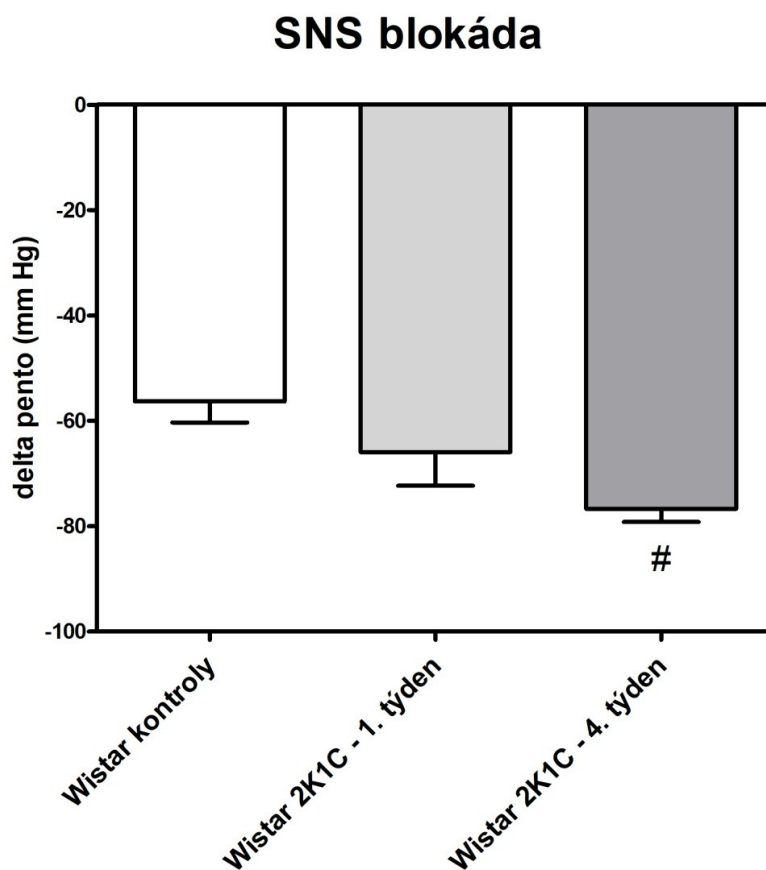
U potkanů Wistar po 2K1C je vidět tendence ke zvýšení podílu renin-angiotenzinového systému na výši krevního tlaku, která v čase opět klesá, není však významná (Wistar kontroly -8 ± 1 mm Hg, Wistar 2K1C - 1. týden -12 ± 3 mm Hg, Wistar 2K1C - 4. týden -10 ± 2 mm Hg) (graf 15).



Graf 15: Akutní blokáda renin-angiotensinového systému (RAS blokáda). Podíl renin-angiotensinového systému na výši krevního tlaku (delta capto) u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

Akutní blokáda sympatického nervového systému

Podíl sympatického nervového systému na výši krevního tlaku (graf 16) se u potkanů kmene Wistar po 2K1C postupně zvyšuje. Významný nárůst tohoto podílu je po 4 týdnech od provedení 2K1C (Wistar kontroly -56 ± 4 mm Hg, Wistar 2K1C - 1. týden -66 ± 6 mm Hg, Wistar 2K1C - 4. týden -77 ± 3 mm Hg).



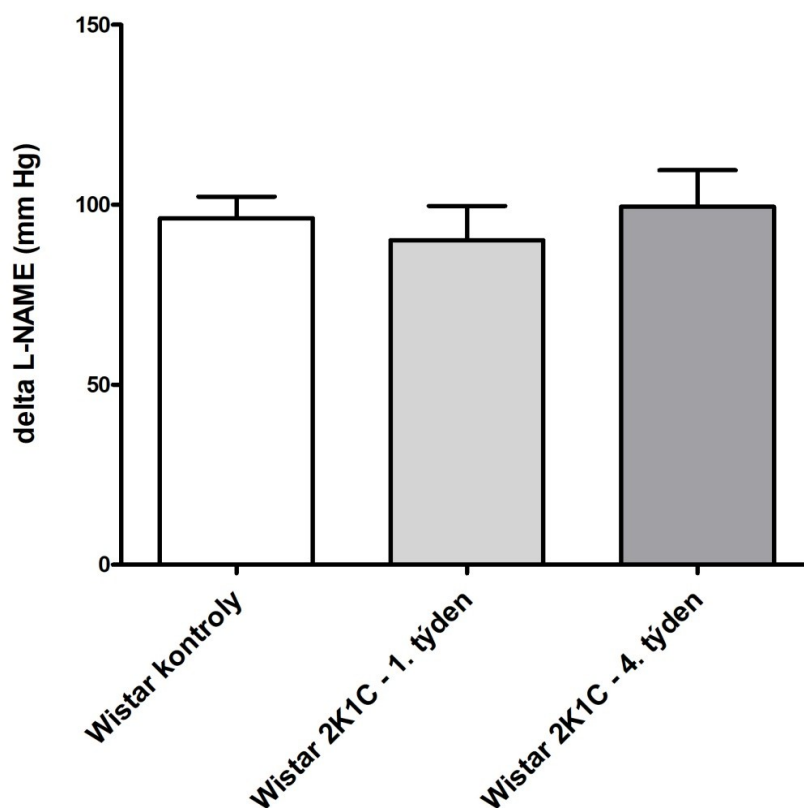
Graf 16: Akutní blokáda sympatického nervového systému (SNS blokáda). Podíl sympatického nervového systému na výši krevního tlaku (delta pento) u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

$p < 0,05$ proti kontrole v rámci skupiny

Akutní blokáda syntázy oxidu dusnatého

Podíl syntázy oxidu dusnatého na výši krevního tlaku (graf 17) zůstává u všech skupin na podobné úrovni (Wistar kontroly 96 ± 6 , Wistar 2K1C - 1. týden 90 ± 10 mm Hg, Wistar 2K1C - 4. týden 100 ± 10 mm Hg).

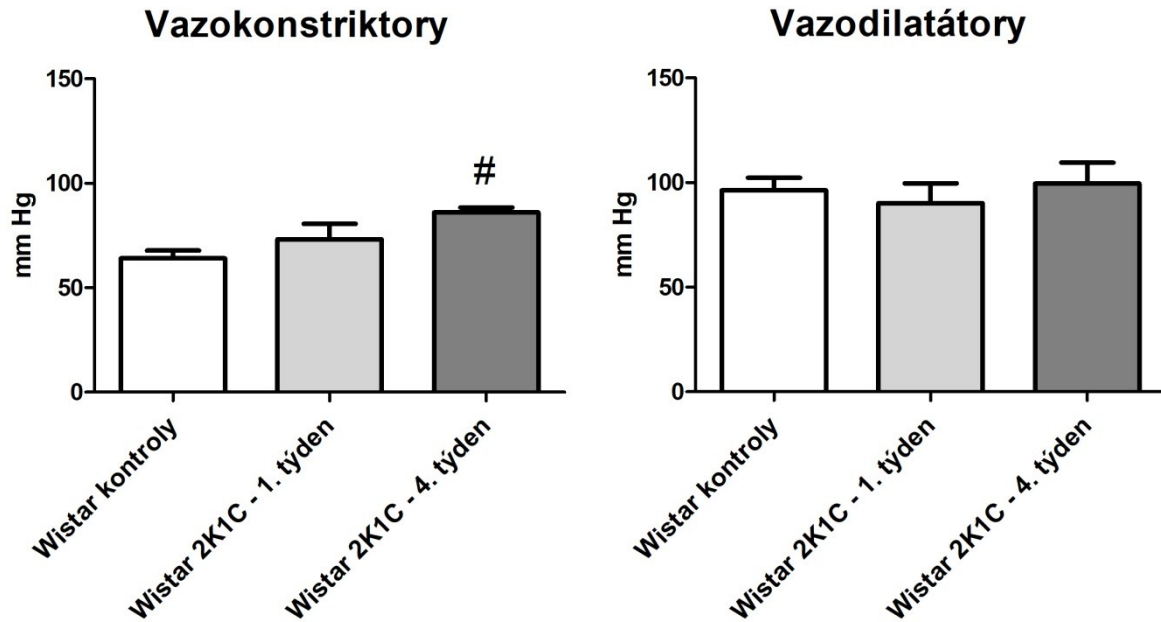
NOS blokáda



Graf 17: Akutní blokáda syntázy oxidu dusnatého (NOS blokáda). Podíl syntázy oxidu dusnatého na výši krevního tlaku (delta L-NAME) u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

Podíl vazokonstriktorů a vazodilatátorů

V průběhu pokusu došlo k postupnému nárůstu podílu vazokonstrikčních systémů, tento nárůst byl statisticky významný po 4. týdnu od provedení 2K1C. Podíl vazodilatačních systémů zůstal stejný (graf 18).

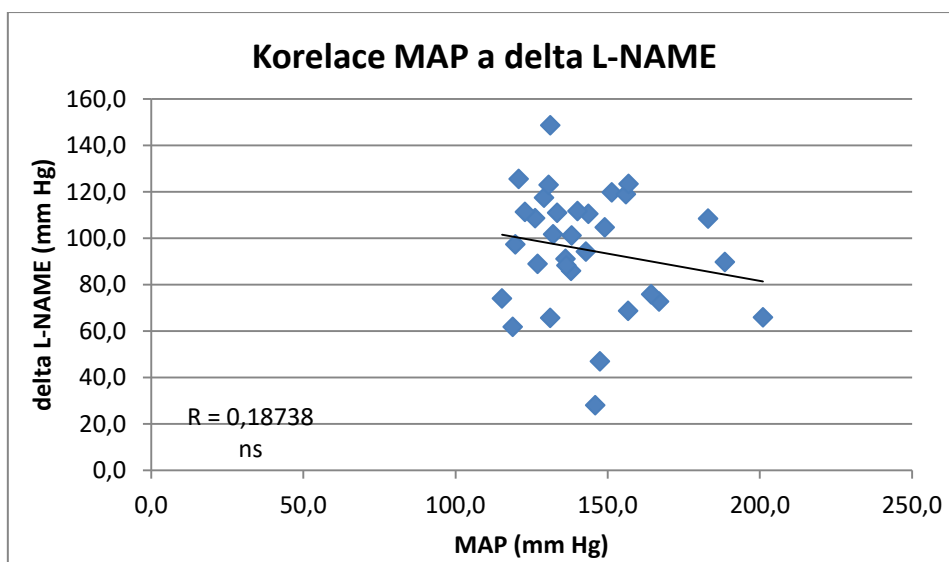
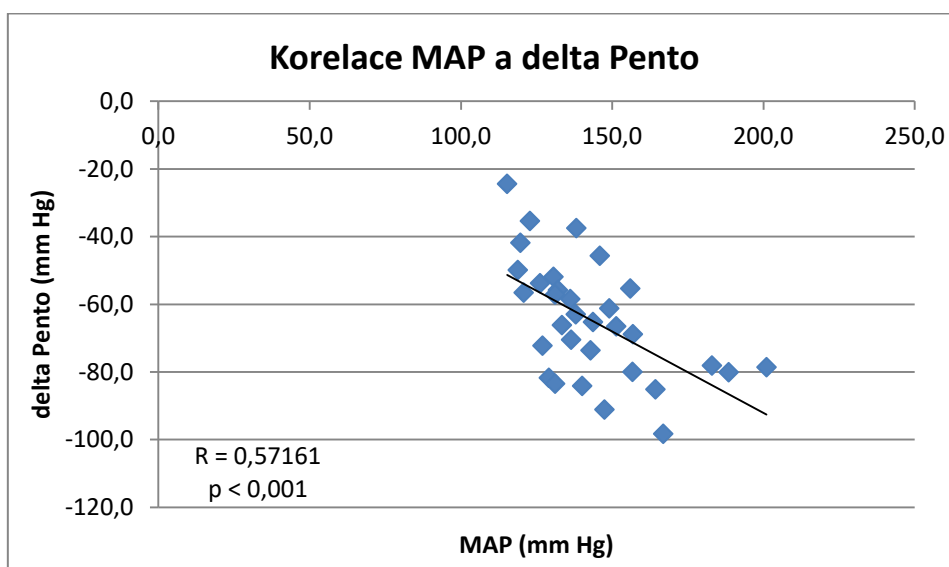
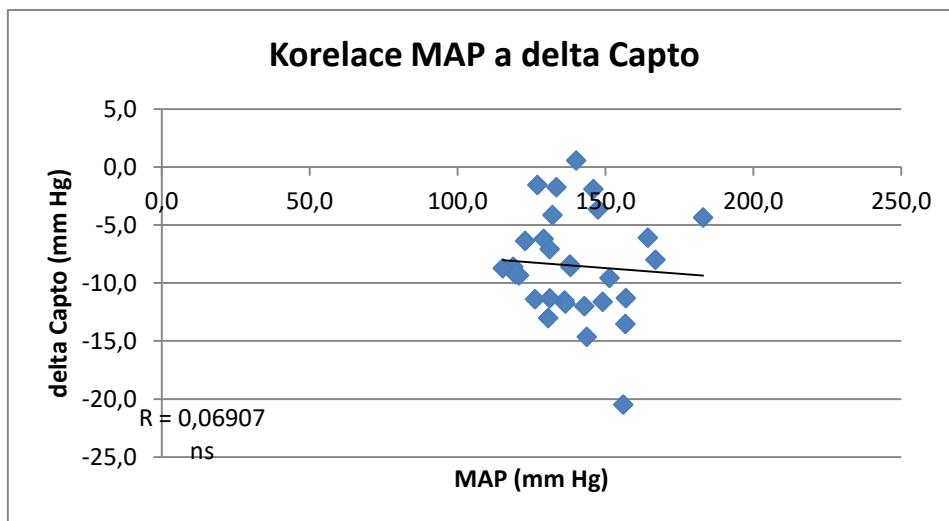


Graf 18: Podíl vazokonstriktorů a vazodilatátorů na udržování TK u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C. Vazokonstriktory: součet delta capto a delta pento.

Vazodilatátory: delta L-NAME.

Korelace středního arteriálního tlaku s RAS, SNS a NOS

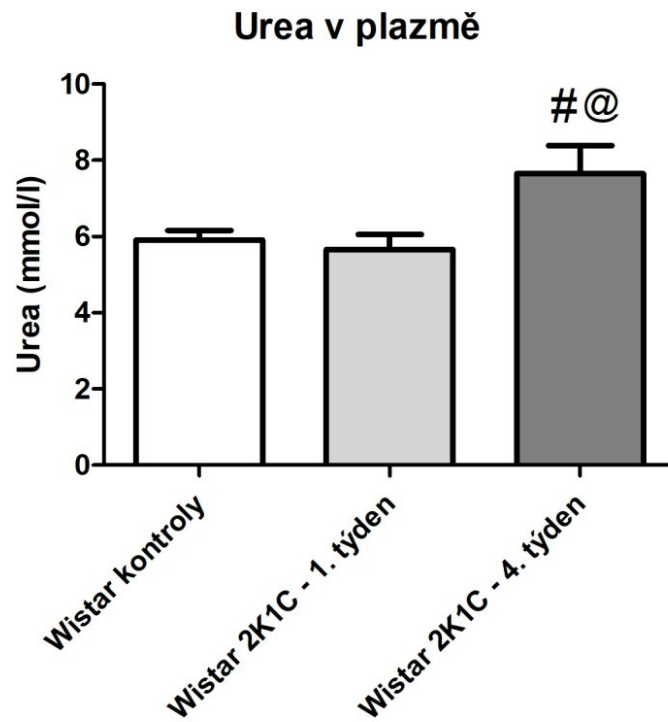
Na grafu 19 jsou vyneseny korelace bazálního arteriálního tlaku se změnami MAP po akutní bloádě RAS, SNS a NOS. Výše MAP koreluje významně s podílem SNS na udržení TK, zatímco korelace s RAS a NOS není významná.



Graf 19. Korelace středního arteriálního tlaku s RAS, SNS a NOS potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

Urea v plazmě

Plazmatická koncentrace močoviny (graf 20) je u kontrolních Wistar potkanů $5,9 \pm 0,3$ mmol/l. Po 1. týdnu od provedení 2K1C se tato hodnota téměř nemění, zatímco po 4. týdnu je koncentrace močoviny výrazně vyšší ($7,7 \pm 0,7$ mmol/l).



Graf 20: Množství močoviny v plazmě u potkanů kmene Wistar po provedení 2K1C.

#p < 0,05 proti kontrole v rámci skupiny

@p < 0,05 1. týden proti 4. týdnu

6 DISKUZE

Z našich výsledků vyplývá, že na udržování hypertenze 3-měsíčních TGR potkanů se uplatňuje jak renin-angiotenzinový systém (rozdíl 20 mm Hg oproti kontrolním HanSD potkanům), tak sympatický nervový systém (rozdíl 17 mm Hg oproti kontrolním HanSD potkanům). To je v souladu s výsledky Vaněčkové et al. (2012a), která uvádí, že RAS se na výši krevního tlaku podílí hlavně v rozvojové fázi hypertenze, zatímco později přebírá tuto funkci sympatický nervový systém. Ve zmíněné studii byl u mladých 2-měsíčních TGR potkanů naměřený významně vyšší pokles krevního tlaku po akutním podání captoprilu (ACE inhibitor) než u dospělých TGR potkanů. Naopak podání pentolinia (gangliový blokátor) způsobilo výraznější pokles TK u dospělých 5-měsíčních TGR potkanů (Vaněčková et al. 2012a).

Částečná nefrektomie u normotenzních HanSD potkanů vyvolala pouze mírné zvýšení krevního tlaku. To je v souladu se studií Bidani et al. (1990), ve které se ukázalo, že po provedení 5/6 nefrektomie zůstalo 75 % Wistar-Kyoto potkanů normotenzních a bez glomerulárního poškození. Pouze u 25 % potkanů se rozvinula hypertenze a glomerulární poškození. Nicméně tato studie byla provedena na jiném normotenzním kmeni potkanů (Bidani et al. 1990).

U TGR potkanů po 5/6 NX nebyl zaznamenán očekávaný vzestup TK, naopak ve čtvrtém týdnu po provedení 5/6 NX došlo dokonce k jeho významnému snížení, což neodpovídá výsledkům jiných studií. Kujal et al. (2010) udávají, že 5/6 NX způsobila u obou kmenů (HanSD i TGR) výrazný vzestup krevního tlaku. V jejich studii nefrektomovaní TGR potkani začali hynout až za 4 - 5 týdnů, 13 týdnů se nedožil žádný. V další studii (Kujal et al. 2014) u TGR potkanů po provedení 5/6 NX vzrůstal krevní tlak až do 8. týdne. Poté začali v 9. týdnu potkani hynout a 20. týdne se dožilo 25 %. Podobně i v další studii (Vaněčková et al. 2012b) se TGR potkanům po 5/6 NX výrazně zvýšil TK a jejich přežívání začalo klesat až po 8. týdnu.

Absence vzestupu TK u TGR potkanů po provedené částečné nefrektomii v naší studii je zřejmě způsobena úhynem potkanů s nejvyšším TK již v průběhu prvního týdne po zákroku, ať už v důsledku renálního nebo srdečního selhání. Příčinu úhynu zvířat jsme však v naší studii nezjišťovali. Nicméně z nepublikovaných výsledků Kujala a Vernerové vyplývá, že příčina úmrtí poloviny zvířat po 5/6 nefrektomii je důsledkem srdečního selhání.

Snížení TK u TGR potkanů po 4 týdnech od provedené 5/6 NX je pravděpodobně způsobeno špatným zdravotním stavem zvířat, která se už dostala do maligní fáze CKD. Tomu nasvědčuje i míra přežívání, která se snižuje již od prvního týdne, což je mnohem dříve než u výše uvedených studií. Také snižující se tělesná hmotnost a hmotnost srdce naznačuje špatné prospívání zvířat.

Na rozvoj CKD poukazuje i koncentrace močoviny v plazmě, která je u HanSD potkanů s 5/6 nefrektomií zvýšená oproti hodnotám uváděným u normotenzních HanSD potkanů (Zicha et al. 1990). Ještě větší zvýšení koncentrace močoviny v plazmě nastalo u TGR potkanů s 5/6 NX, což odpovídá jejich zhoršenému stavu a sníženému přežívání.

Význam úlohy renin-angiotenzinového systému u chronického onemocnění ledvin naznačují četné studie využívající při jeho léčbě blokátory RAS (kombinace ACE inhibitorů a blokátorů AT₁ receptorů), které výrazně snižují TK (Kujal et al. 2010; Vaněčková et al. 2012b; Kujal et al. 2014).

V rozporu s udávaným významem renin-angiotenzinového systému při rozvoji CKD jsme však v naší studii nezaznamenali jeho výraznější podíl na udržování TK ani v rozvojové, ani v udržovací fázi CKD po provedené částečné nefrektomii. Naopak významnější podíl měl sympatický nervový systém, a to jak v rozvojové, tak udržovací fázi CKD u obou studovaných kmenů. Neočekávané snížení krevního tlaku naměřené u TGR potkanů po 4 týdnech od provedené nefrektomie lze zřejmě připsat výraznému oslabení sympatické vazokonstrikce u těchto zvířat. Nicméně z grafů 9 a 18 vyplývá, že vliv vazokonstriktorů u obou typů CKD stoupá, a podílí se tak na vyšší úrovni TK. Naproti tomu u potkanů s CKD navozeným částečnou nefrektomií je vzestup TK dán zároveň poklesem podílu vazodilatátorů. Oba vazokonstrikční systémy (RAS i SNS) se významně podílejí na udržování TK u TGR s 5/6 NX, jak ukazuje také významná korelace změn TK po akutní blokádě RAS i SNS (graf 10). Naopak u modelu 2K1C koreluje významně výše TK pouze s podílem SNS (graf 19). To je v souladu s představou, že vysoká hladina cirkulujícího ANG II je významná pro 2K1C hypertenzi pouze v rozvojových stádiích.

Stenóza renální artérie (2K1C) u potkanů kmene Wistar vyvolala během prvního týdne (rozvojová fáze) významné zvýšení krevního tlaku, které přetrvalo na podobně zvýšené úrovni i po čtyřech týdnech od zaklipování (udržovací fáze). To částečně odpovídá výsledkům studie (Guan et al. 1992), ve které došlo po 7 dnech k významnému zvýšení systolického tlaku, který se na rozdíl od našich výsledků po 25 dnech dále zvyšoval. V jiné studii (Huang et al. 1981) bylo také dosaženo významného zvýšení krevního tlaku po 4 týdnech od provedení 2K1C. Naproti tomu Červenka et al. (2008) uvádějí maximální vzestup tlaku

v prvních dvou týdnech po 2K1C, zatímco po této době se již tlak dále nezvyšoval (Červenka et al. 2008). Ve studii Bürgelové et al. (2009) bylo u HanSD potkanů po 7 dnech od provedení 2K1C dosaženo zvýšeného krevního tlaku, který byl udržován na stejné úrovni až do 25. dne (Bürgelová et al. 2009), což odpovídá našim naměřeným hodnotám. Zvýšenému krevnímu tlaku odpovídá i zvýšená hmotnost srdce po 4. týdnu od provedení 2K1C. Zvýšená koncentrace močoviny naměřená v plazmě po 4 týdnech od zaklipování ukazuje na zhoršenou funkci ledvin u již rozvinutého chronického onemocnění ledvin.

Model Goldblattovy dvouledvinové jednosvorkové hypertenze je charakterizován zvýšenou aktivitou renin-angiotenzinového systému prostřednictvím aktivace AT₁ receptoru angiotenzinem II. Walkowska et al. (2010) udává zvýšené renální a plazmatické koncentrace angiotenzinu II za týden po zaklipování ledviny, tedy v rozvojové fázi hypertenze, zatímco po 4 týdnech (udržovací fáze) již nebyly zjištěny rozdíly mezi kontrolní a klipovanou skupinou (Walkowska et al. 2010). Avšak z našich výsledků vyplývá, že podíl renin-angiotenzinového systému na výši krevního tlaku je po prvním týdnu od provedení 2K1C jen mírně zvýšen a po 4. týdnu od provedení 2K1C je podíl RAS na podobné úrovni jako u kontrol.

Naproti tomu významnou úlohu při udržování této formy hypertenze hraje sympatický nervový systém, a to zejména ve 4. týdnu po zaklipování ledviny, zatímco v rozvojové fázi je jen mírně aktivován. Podíl vazodilatačního působení zprostředkovaného NO-syntázou zůstává v rozvojové i udržovací fázi hypertenze na stejné úrovni jako u kontrolních normotenzních potkanů.

Z našich výsledků tedy vyplývá, že 2K1C hypertenze je výsledkem kombinace mírně zvýšené aktivity renin-angiotenzinového systému v rozvojové fázi hypertenze a hyperaktivity sympatického nervového systému v její udržovací fázi.

7 ZÁVĚR

Naše studie ukázala, že na udržování hypertenze u TGR potkanů ve věku 3 měsíců se stejnou měrou podílí renin-angiotenzinový systém i sympatický nervový systém. 5/6 nefrektomie u HanSD potkanů nevyvolala významné zvýšení krevního tlaku. Ani u TGR potkanů s 5/6 nefrektomií se krevní tlak nezvýšil, naopak se významně snížil po 4 týdnech od provedení 5/6 NX. Toto snížení je pravděpodobně způsobeno maligní fází CKD, což potvrzuje i snížené přežívání zvířat a zvýšená plazmatická koncentrace močoviny.

Po stenóze renální artérie (2K1C) u Wistar potkanů dochází již po jednom týdnu od provedení zákroku k významnému zvýšení tlaku, které je dále udržováno na podobně zvýšené hodnotě.

Podíl renin-angiotenzinového systému na udržování krevního tlaku u obou modelů CKD nebyl významně zvýšen ani v rozvojové fázi, ani v udržovací fázi. Podle našich výsledků se tedy na udržování TK významnější měrou podílí sympatický nervový systém. Podíl vazokonstrikčních systémů na udržování TK u obou modelů v průběhu rozvoje CKD roste. Podíl vazodilatačního působení NO-syntázy u TGR s 5/6 NX v průběhu rozvoje CKD klesá, zatímco u 2K1C Wistar potkanů se drží na stejné úrovni.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adamczak M., Gross M-L, Krtil J., Koch A., Tyralla K, Amann K, Ritz E. 2003. „Reversal of Glomerulosclerosis after High-Dose Enalapril Treatment in Subtotally Nephrectomized Rats". *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (11): 2833–42.
- Anderson S., Rennke H. G., Brenner B. M. 1986. „Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat." *Journal of Clinical Investigation* 77 (6): 1993–2000.
- Appel D., Kershaw D. B., Smeets B, Yuan G., Fuss A., Frye B., Elger M., Kriz W., Floege J., Moeller M. J. 2009. „Recruitment of Podocytes from Glomerular Parietal Epithelial Cells". *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (2): 333–43.
- Basile D. P., Donohoe D., Roethe K., Osborn K. L. 2001. „Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function". *American Journal of Physiology Renal Physiology* 281 (5): F887–99.
- Basile D. P., Leonard E. C., Beal A. G., Schleuter D., Friedrich J. 2012. „Persistent oxidative stress following renal ischemia-reperfusion injury increases ANG II hemodynamic and fibrotic activity". *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 302 (11): F1494–1502.
- Bidani A. K., Mitchell K. D., Schwartz M. M., Navar L. G., Lewis E. J.. 1990. „Absence of Glomerular Injury or Nephron Loss in a Normotensive Rat Remnant Kidney Model". *Kidney International* 38 (1): 28–38.
- Bigazzi R., Kogosov E., Campese V. M.. 1994. „Altered Norepinephrine Turnover in the Brain of Rats with Chronic Renal Failure". *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 4 (11): 1901–7.
- Brooks D. P., Short B. G., Cyronak M. J., Contino L. C., DiCristo M., Wang Y. X., Ruffolo R. R.. 1993. „Comparison between Carvedilol and Captopril in Rats with Partial Ablation-Induced Chronic Renal Failure". *British Journal of Pharmacology* 109 (2): 581–86.
- Bürgelová M., Kramer H. J., Teplan V., Thumová M, Cervenka L. 2005. „Effects of Angiotensin-(1-7) Blockade on Renal Function in Rats with Enhanced Intrarenal Ang II Activity". *Kidney International* 67 (4): 1453–61.
- Bürgelová M., Vaňourková Z., Thumová M., Dvořák P., Opočenský M, Kramer H. J., Želízko M, Malý J., Bader M, Červenka L. 2009. „Impairment of the Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin-(1-7)-Mas Axis Contributes to the Acceleration of Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertension". *Journal of Hypertension* 27 (10): 1988–2000.
- Campese V. M., Kogosov E. 1995a. „Renal Afferent Denervation Prevents Hypertension in Rats with Chronic Renal Failure". *Hypertension* 25 (4 Pt 2): 878–82.
- Campese V. M., Kogosov E., Koss M. 1995b. „Renal Afferent Denervation Prevents the Progression of Renal Disease in the Renal Ablation Model of Chronic Renal Failure in the Rat". *American Journal of Kidney Diseases* 26 (5): 861–65.
- „CKD Evaluation and Management – KDIGO". b.r. Viděno 31. červenec 2019.
<https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/>.
- Červenka L., Kramer H. J., Malý J., Heller J. 2001. „Role of nNOS in Regulation of Renal Function in Angiotensin II-Induced Hypertension". *Hypertension* 38 (2): 280–85.
- Červenka L., Vaněčková I., Husková Z., Vaňourková Z., Erbanová M., Thumová M., Škaroupková P. 2008. „Pivotal Role of Angiotensin II Receptor Subtype 1A in the Development of Two-Kidney, One-Clip Hypertension: Study in Angiotensin II Receptor Subtype 1A Knockout Mice". *Journal of Hypertension* 26 (7): 1379–89.
- Dalla Vestra M., Masiero A., Roiter A. M., Saller A., Crepaldi G., Fioretto P. 2003. „Is Podocyte Injury Relevant in Diabetic Nephropathy? Studies in Patients with Type 2 Diabetes". *Diabetes* 52 (4): 1031–35.

- DiBona G. F. 2005. „Physiology in perspective: The Wisdom of the Body. Neural control of the kidney". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289 (3): R633–41.
- Drenjančević-Perić I., Jelaković B., Lombard J.H., Kunert M.P., Kibel A., Gros M. 2011. „High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System". *Kidney & Blood Pressure Research* 34 (1): 1–11.
- Durvasula R. V., Petermann A. T., Hiromura K., Blonski M., Pippin J, Mundel P., Pichler R., Griffin S., Couser W. G., Shankland S. J. 2004. „Activation of a Local Tissue Angiotensin System in Podocytes by Mechanical Strain". *Kidney International* 65 (1): 30–39.
- Dvořák P., Kramer H. J., Bäcker A., Malý J., Kopkan L., Vaněčková I., Vernerová Z. 2004. „Blockade of Endothelin Receptors Attenuates End-Organ Damage in Homozygous Hypertensive Ren-2 Transgenic Rats". *Kidney & Blood Pressure Research* 27 (4): 248–58.
- Eng E., Veniant M., Floege J., Fingerle J., Alpers C. E., Menard J., Clozel J. P., Johnson R. J. 1994. „Renal Proliferative and Phenotypic Changes in Rats with Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertension". *American Journal of Hypertension* 7 (2): 177–85.
- Goldblatt H., Kahn J. R., Hanzal R. F. 1939. „Studies on Experimental Hypertension: IX. The Effect on Blood Pressure of Constriction of the Abdominal Aorta above and below the Site of Origin of Both Main Renal Arteries". *The Journal of Experimental Medicine* 69 (5): 649–74.
- Goldstein R. S., Tarloff J. B., Hook J. B. 1988. „Age-Related Nephropathy in Laboratory Rats". *FASEB Journal* 2 (7): 2241–51.
- Gretz N., Meisinger E., Strauch M. 1988. „Partial Nephrectomy and Chronic Renal Failure: The ‚mature´ Rat Model". *Contributions to Nephrology* 60: 46–55.
- Guan S., Fox J., Mitchell K. D., Navar L. G. 1992. „Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats." *Hypertension* 20 (6): 763–67.
- Herath C. B., Grace J. A., Angus P. W. 2013. „Therapeutic potential of targeting the renin angiotensin system in portal hypertension". *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 4 (1): 1–11.
- Herzog C. A., Asinger R. W., Berger A. K., Charytan D. M., Díez J., Hart R. G., Eckardt K-U. 2011. „Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)". *Kidney International* 80 (6): 572–86.
- Huang W. C., Ploth D. W., Bell P. D., Work J., Navar L. G. 1981. „Bilateral Renal Function Responses to Converting Enzyme Inhibitor (SQ 20,881) in Two-Kidney, One Clip Goldblatt Hypertensive Rats". *Hypertension* 3 (3): 285–93.
- Chappell M. C. 2012. „Nonclassical Renin-Angiotensin System and Renal Function". *Comprehensive Physiology* 2 (4): 2733–52.
- Chevalier R. L., Forbes M. S., Thornhill B. A. 2009. „Ureteral Obstruction as a Model of Renal Interstitial Fibrosis and Obstructive Nephropathy". *Kidney International* 75 (11): 1145–52.
- Ishizaki M., Masuda Y., Fukuda Y., Sugisaki Y., Yamanaka N., Masugi Y. 1986. „Experimental Mesangioproliferative Glomerulonephritis in Rats Induced by Intravenous Administration of Anti-Thymocyte Serum". *Acta Pathologica Japonica* 36 (8): 1191–1203.
- Ito S., Sved A. F. 1996. „Blockade of Angiotensin Receptors in Rat Rostral Ventrolateral Medulla Removes Excitatory Vasomotor Tone". *American Journal of Physiology* 270 (6 Pt 2): R1317-1323.
- Izuhara Y., Nangaku M., Inagi R., Tominaga N., Aizawa T., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou Ch., Miyata T. 2005. „Renoprotective Properties of Angiotensin Receptor Blockers beyond Blood Pressure Lowering". *Journal of the American Society of Nephrology* 16 (12): 3631–41.
- Kakoki M., Zou A. P., Mattson D. L. 2001. „The Influence of Nitric Oxide Synthase 1 on Blood Flow and Interstitial Nitric Oxide in the Kidney". *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (1): R91-97.
- Kopkan L., Kramer H. J., Husková Z., Vaňourková Z., Bäcker A., Bader M., Ganten D., Červenka L. 2004. „Plasma and Kidney Angiotensin II Levels and Renal Functional Responses to AT1 Receptor Blockade in Hypertensive Ren-2 Transgenic Rats". *Journal of Hypertension* 22 (4): 819.

- Kopkan L., Kramer H. J., Husková Z., Vaňourková Z., Škaroupková P., Thurmová M., Červenka L. 2005. „The Role of Intrarenal Angiotensin II in the Development of Hypertension in Ren-2 Transgenic Rats". *Journal of Hypertension* 23 (8): 1531–39.
- Kriz W. 2003. „The Pathogenesis of ‚classic´ Focal Segmental Glomerulosclerosis-Lessons from Rat Models". *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 18 Suppl 6 (srpen): vi39-44.
- Kujal P., Vernerová Z. 2008. „[5/6 nephrectomy as an experimental model of chronic renal failure and adaptation to reduced nephron number]". *Ceskoslovenska Fysiologie* 57 (4): 104–9.
- Kujal P., Čertíková Chábová V., Škaroupková P., Husková Z., Vernerová Z., Kramer H. J., Walkowska A. 2014. „Inhibition of soluble epoxide hydrolase is renoprotective in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats". *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 41 (3): 227–37.
- Kujal P., Čertíková Chábová V., Vernerová Z., Walkowska A., Kompanowska-Jeziarska E., Sadowski J., Vaňourková Z. 2010. „Similar Renoprotection after Renin-Angiotensin-Dependent and -Independent Antihypertensive Therapy in 5/6-Nephrectomized Ren-2 Transgenic Rats: Are There Blood Pressure-Independent Effects?" *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 37 (12): 1159–69.
- Ljungqvist A., Ungerstedt U. 1972. „Sympathetic Innervation of the Juxtaglomerular Cells of the Kidney in Rats with Renal Hypertension". *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology* 80 (1): 38–46.
- Mills K. T., Xu Y., Zhang W., Bundy J. D., Chen Ch-S., Kelly T. N., Chen J., He J. 2015. „A systematic analysis of world-wide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010". *Kidney international* 88 (5): 950–57.
- Morrison A. B. 1962. „Experimentally Induced Chronic Renal Insufficiency in the Rat". *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 11 (duben): 321–32.
- Mullins J. J., Peters J., Ganten D. 1990. „Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene". *Nature* 344 (6266): 541–44.
- Murphy W. R., Coleman T. G., Smith T. L., Stanek K. A. 1984. „Effects of graded renal artery constriction on blood pressure, renal artery pressure, and plasma renin activity in Goldblatt hypertension." *Hypertension* 6 (1): 68–74.
- Oliveira-Sales, Elizabeth B., Toward M. A., Campos R. R., Paton J. F. R. 2014. „Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats". *Autonomic Neuroscience* 183 (červenec): 23–29.
- Olson J. L., Hostetter T. H., Rennke H. G., Brenner B. M., Venkatachalam M. A. 1982. „Altered Glomerular Permeability and Progressive Sclerosis Following Extreme Ablation of Renal Mass". *Kidney International* 22 (2): 112–26.
- Opočenský M., Kramer H. J., Bäcker A., Vernerová Z., Eis V., Červenka L., Čertíková Chábová V., Tesař V., Vaněčková I. 2006. „Late-Onset Endothelin-A Receptor Blockade Reduces Podocyte Injury in Homozygous Ren-2 Rats despite Severe Hypertension". *Hypertension* 48 (5): 965–71.
- Reckelhoff J. F., Zhang H., Granger J. P. 1997. „Decline in Renal Hemodynamic Function in Aging SHR: Role of Androgens". *Hypertension* 30 (3 Pt 2): 677–81.
- Robbins M. E., Bonsib S. M. 1995. „Radiation Nephropathy: A Review". *Scanning Microscopy* 9 (2): 535–60.
- Senanayake P. D., Moriguchi A., Kumagai H., Ganten D., Ferrario C. M., Brosnihan K. B. 1994. „Increased Expression of Angiotensin Peptides in the Brain of Transgenic Hypertensive Rats". *Peptides* 15 (5): 919–26.
- Shea S. M., Raskova J., Morrison A. B. 1978. „A Stereologic Study of Glomerular Hypertrophy in the Subtotally Nephrectomized Rat". *American Journal of Pathology* 90 (1): 201–10.
- Schmidt H. H., Lohmann S. M., Walter U. 1993. „The Nitric Oxide and CGMP Signal Transduction System: Regulation and Mechanism of Action". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1178 (2): 153–75.

- Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš J., Vernerová Z, Zicha J. 2015. „Endothelin A Receptor Blocker Atrasentan Lowers Blood Pressure by the Reduction of Nifedipine-Sensitive Calcium Influx in Ren-2 Transgenic Rats Fed a High-Salt Diet". *Journal of Hypertension* 33 (1): 161–69.
- Vaněčková I., Dobešová Z., Kuneš J., Zicha J. 2012a. „The Effects of Repeated Delivery of Angiotensin II AT₁ Receptor Antisense on Distinct Vasoactive Systems in Ren-2 Transgenic Rats: Young vs. Adult Animals". *Hypertension Research* 35 (7): 761.
- Vaněčková I., Kujal P., Husková Z., Vaňourková Z., Vernerová Z., Čertíková Chábová V., Škaroupková P., Kramer H. J., Tesař V., Červenka L. 2012b. „Effects of Combined Endothelin A Receptor and Renin-Angiotensin System Blockade on the Course of End-Organ Damage in 5/6 Nephrectomized Ren-2 Hypertensive Rats". *Kidney & Blood Pressure Research* 35 (5): 382–92.
- Vaněčková I., Husková Z., Vaňourková Z., Červenka L. 2011. „Castration Has Antihypertensive and Organoprotective Effects in Male but Not in Female Heterozygous Ren-2 Rats". *Kidney & Blood Pressure Research* 34 (1): 46–52.
- Walkowska A., Thumová M., Škaroupková P., Husková Z., Vaňourková Z., Čertíková Chábová V., Tesař V. 2010. „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 (3): 582–93.
- Wu F., Park F., Cowley A. W., Mattson D. L. 1999. „Quantification of Nitric Oxide Synthase Activity in Microdissected Segments of the Rat Kidney". *American Journal of Physiology* 276 (6): F874–881.
- Zicha J., Kronauer J., Duhm J. 1990. „Effects of a Chronic High Salt Intake on Blood Pressure and the Kinetics of Sodium and Potassium Transport in Erythrocytes of Young and Adult Subtotally Nephrectomized Sprague-Dawley Rats". *Journal of Hypertension* 8 (3): 207–17.