

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

INSTITUT KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY

Pracoviště experimentální medicíny

**Úloha intrarenální interakce renin-angiotenzinového systému,
oxidu dusnatého a oxidativního stresu v regulaci renálních funkcí
a krevního tlaku u experimentálních modelů hypertenze**

Dizertační práce

MVDr. Libor Kopkan

Praha 2008

Poděkování

Mé poděkování patří všem, kteří se mnou v průběhu mého postgraduálního studia spolupracovali a vycházeli mi vstříc. Hlavní poděkování patří mému školiteli Doc. MUDr. Lud'ku Červenkoví, CSc. za veškerou pomoc a podporu, a to jak odbornou tak i osobní. Velké díky patří spolupracovníkům z Tulane University Health Sciences Center, jmenovitě zejména Dr. Dewanu SA Majidovi a Dr. LG Navarovi za jejich vedení, podporu, pomoc a vytvořené zázemí v New Orleans. Poděkování patří i mé rodině za podporu a trpělivost.

Úvodní prohlášení

Všechny pokusy provedené v rámci následujících studií byly provedeny dle mezinárodních standardů Americké fyziologické společnosti a odborných komisí na ochranu zvířat proti týrání a jsou plně v souladu s legislativou na ochranu zvířat proti týrání. Pro každou studii byl vypracován vlastní projekt pokusu, který byl schválen odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání působící v dané instituci.

OBSAH

Úvod	1
Základní fyziologické mechanismy ledvin ovlivňující regulaci krevního tlaku	
Autoregulace v ledvinách.....	2
Tubuloglomerulární zpětná vazba.....	3
Mechanismus tlakové diurézy a natriurézy.....	4
Vybrané vazoaktivní systémy, které hrají důležitou fyziologickou a patofyziologickou úlohu v regulaci renálních funkcí a v rozvoji hypertenze	
Systém oxidu dusnatého a jeho biologické vlastnosti.....	7
Biosyntéza oxidu dusnatého.....	8
Fyziologická funkce NO.....	8
Patofyziologická funkce NO.....	9
Role NO v regulaci renálních funkcí.....	9
Významné experimentální modely pro výzkum NO systému.....	10
Renin-angiotenzinový systém a jeho biologické vlastnosti.....	12
Biosyntéza jednotlivých komponent RAS.....	12
Specifické receptory RAS.....	14
Role jednotlivých komponent RAS v regulaci renálních funkcí.....	15
Významné experimentální modely pro výzkum RAS.....	17
Volné kyslíkové radikály a oxidativní stres.....	20
Biosyntéza ROS a jejich vlastnosti.....	20
Role ROS v regulaci renálních funkcí.....	22
Významné experimentální modely pro výzkum oxidativního stresu	23
Význam funkční interakce vazoaktivních systémů v regulaci renálních funkcí.....	24

Vlastní cíle dizertační práce.....	25
Metodika renální funkční studie s aplikací látek přímo do renální artérie.....	25
Obecné schéma experimentálního protokolu.....	26
Úloha zvýšené produkce superoxidu v regulaci renálních funkcí u ANG II indukované hypertenze.....	27
Úloha zvýšené aktivity superoxidu v regulaci renálních funkcí u NO deficitní formy hypertenze.....	30
Úloha zvýšené produkce superoxidu a jeho interakce s NO v regulaci renálních funkcí u prehypertenzních Ren - 2 transgenních potkanů.....	33
Závěr.....	37

LITERATURA

PŘÍLOHY - odborné publikace

1. Kopkan et al. AJP Renal 2006; 290:F80-86
2. Kopkan a Majid, Hypertension 2006; 47:568-572
3. Kopkan et al. J Hypertens. 2007; 25:2257-2265

Seznam použitých zkratek

ACE	angiotenzin-konvertující enzym
ANF	atriální natriuretický faktor
ANG	angiotenzin
Aogen	angiotenzinogen
AT	receptor pro angiotenzin
ATP	adenozintrifosfát
cGMP	cyklický guanosin-monofosfát
DETC	diethyldithiokarbamát
EDRF	endoteliální relaxační faktor
FAD	flavin adenin dinucleotid
FMN	flavin mononucleotid
GF	glomerulární filtrace
Gpx	glutathionperoxidáza
JGA	juxtaglomerulární aparát
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEP	endopeptidáza N
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
Nox	NADPH oxidáza
OECT	objem extracelulární tekutiny
O ₂ ⁻	superoxid
PEP	endopeptidáza P
PKL	průtok krve ledvinou
RAS	renin-angiotenzinový systém
ROS	reaktivní formy kyslíku
PRA	plazmatická reninová aktivita
SOD	superoxid-dismutáza
TGR	transgenmní potkani s vloženým myším Ren-2 genem pro renin
TK	krevní tlak
XO	xantin oxidáza

Úvod

Ledviny jsou párovým orgánem plnícím řadu životně důležitých funkcí: udržují stálé vnitřní prostředí, stálou koncentraci minerálů, kyselost vnitřního prostředí, udržují objem celkové vody v organismu, ale vylučují také tři důležité hormony: renin, erythropoetin a kalcitriol. Udržováním vyrovnané koncentrace minerálů, především sodíku, a tím příslušného objemu vody v těle hrají ledviny velmi významnou roli v dlouhodobé regulaci krevního tlaku. Mechanismy ovlivňující regulaci krevního tlaku byly a jsou stále intenzivně studovány v mnoha laboratořích. Koncept navržený profesorem Guytonem, tzv. Guytonova teorie, se stal v renální fyziologii široce uznávaným a na tuto teorii navazuje řada nových poznatků prohlubující znalosti a chápání fyziologie ledvin a jejich výsadního postavení v regulaci krevního tlaku a rozvoji hypertenze (Guyton 1991, Hall et al. 1996, Navar 1997).

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jakou úlohu hrají hlavní vazoaktivní systémy a jejich vzájemné interakce v regulaci renálních funkcí, jež by se významně podílely na rozvoji hypertenze. Přestože existuje celá řada vazoaktivních systémů, které ovlivňují renální funkce a krevní tlak a přímo se zapojují do jejich regulace, byly pro tuto práci zvoleny dva významné vazoaktivní systémy, a to systém oxidu dusnatého a renin-angiotenzinový systém. Jelikož oba systémy vykazují protichůdný fyziologický význam, je nutné, aby tyto systémy byly v rovnováze, která pak významně ovlivňuje správnou funkci jednotlivých orgánů včetně ledvin (Navar et al. 2000, Patzak a Persson 2007). Jakákoliv nerovnováha vede k poruše orgánových funkcí, jež může hrát významnou roli v patogenezi kardiovaskulárních a renálních poruch. V těchto patofyziologických procesech se také potvrdila role oxidativního stresu, který významnou měrou zasahuje do biologických funkcí jednotlivých systémů (Romero a Reckelhoff 1999, Schulman et al. 2005). Proto bylo rovněž naším cílem studovat jeho úlohu v patogenezi hypertenze. Tato práce vychází s následující obecné hypotézy: interakce vazodilatačních a vasokonstrikčních systémů hraje významnou úlohu v regulaci funkcí ledvin a nerovnováha mezi těmito systémy vede k poruchám renálních funkcí a tím tak k narušení dlouhodobé regulace krevního tlaku vedoucí k rozvoji hypertenze.

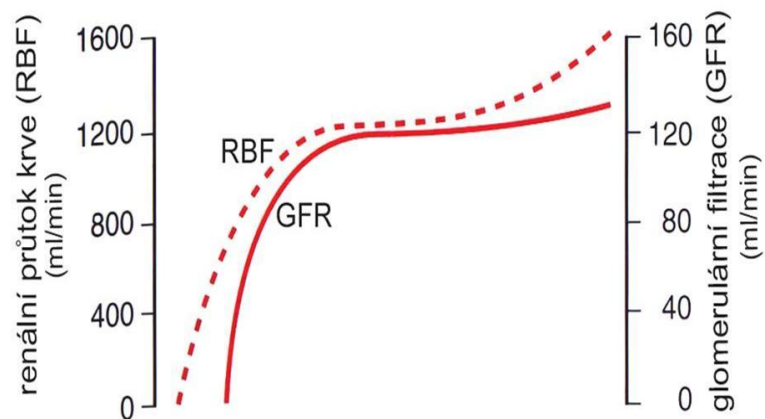
Základní fyziologické mechanismy ledvin ovlivňující regulaci krevního tlaku

Autoregulace v ledvinách

Glomerulární filtrace (GF) jako jedna ze základních funkcí ledvin je závislá na průtoku krve ledvinami (PKL). Hlavní hnací silou GF je hydrostatický tlak v glomerulu, který je ovlivňován dvěma základními mechanismy: krevním tlakem (TK) a vaskulárním tonusem glomerulárních arterioly (aferentní a eferentní). Preglomerulární vazodilatace umožní převod větší části systémového TK do glomerulu, čímž zvýší intraglomerulární tlak a následně i glomerulární filtraci. Za normálních okolností je před zvýšeným TK ledvina chráněna vazokonstrikcí preglomerulární

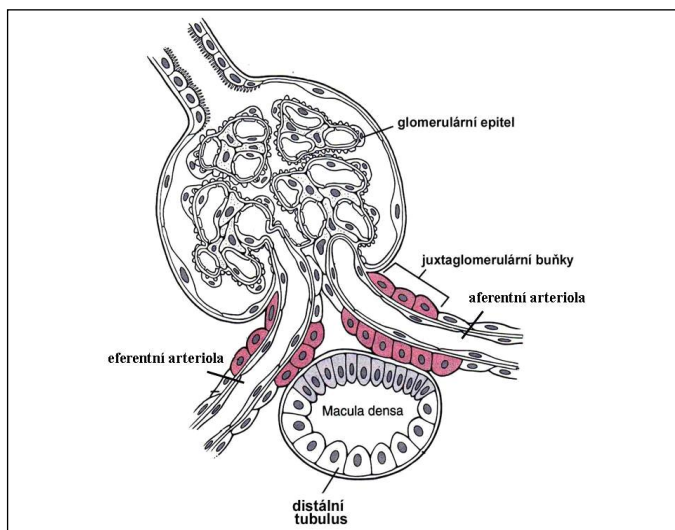
arterioly. Tato cévní reakce je součástí renální autoregulace, jež brání přenosu kolísajících či soustavných vysokých tlaků na citlivou síť glomerulárních kapilár (Rothe et al. 1971, Arendshorst et al. 1975, Heller a Horacek 1977). Regulační reakce se kombinovaně účastní jak aferentní tak eferentní arterioly, přitom dominantní je funkce aferentní arterioly (Just

a Arendshorst 2003). Základní mechanismus regulace průsvitu aferentní arterioly je myogenní (tzv. Baylissův efekt) a další představují vasoaktivní působky (Juncos et al. 1995). Při zvýšeném TK dochází ke konstrikci aferentní arterioly (Carmines et al. 1990). Tato konstrikce zabrání nadměrnému roztažení těchto cév a zvýšením vaskulární rezistence zároveň brání výraznému vzestupu PKL a vzestupu GF. Při poklesu TK dochází k dilataci aferentní arterioly tak, aby se zachovala příslušná GF. Jelikož v eferentní arteriole chybí myogenní reakce, je řízena především vasoaktivními látkami (Carmines a Navar 1989).



Tubuloglomerulární zpětná vazba

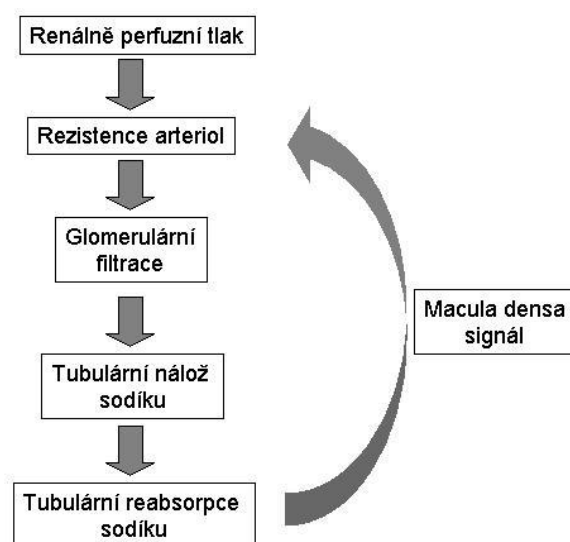
Mechanismus autoregulace krevního průtoku založený na funkci juxtaglomerulárního aparátu (JGA) se nazývá tubuloglomerulární zpětná vazba (Moore a Casellas 1990, Walker et al. 2000). JGA se nachází v místě, kde se začátek distálního tubulu obrací zpět a dotýká se aferentní arterioly a glomerulu téhož nefronu. Je tvořen tmavými kuboidními buňkami distálního tubulu (macula densa), granulárními buňkami aferentní arterioly, nazývanými též juxtaglomerulární buňky, a extraglomerulárními mezangiálními



buňkami (Navar et al. 1982). Princip tubuloglomerulární zpětné vazby je následující: zvýšený TK vede ke zvýšení glomerulárního tlaku, následně ke zvýšení GF a dodávky sodíkových iontů do oblasti macula densa. Macula densa reaguje na zvýšenou dodávku sodíkových iontů uvolněním vazokonstrikční látky, která způsobí zúžení aferentní arterioly, následně pokles

glomerulárního tlaku a návrat GF k původní hodnotě. Funkční tubuloglomerulární zpětná vazba udržuje konstantní koncentraci sodíkových iontů v distálním tubulu a tím konstantní množství moče. Bylo prokázáno, že přerušení této zpětné vazby zeslabuje účinnost GF a PKL (Briggs a Schnermann 1986).

Tubuloglomerulární zpětná vazba



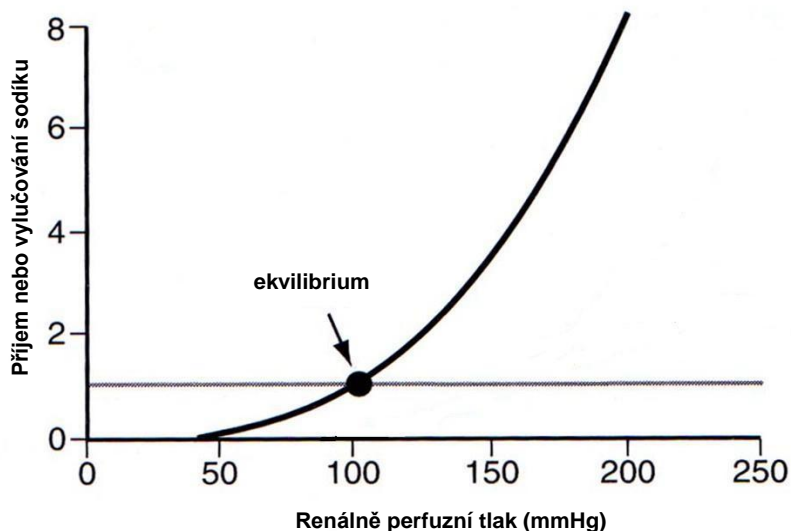
její mediátor. V první řadě by měl být mediátor uvolňován v juxtaglomerulárním aparátu tak, aby přímo ovlivňoval vaskulární rezistenci aferentní arterioly, čímž dojde ke snížení perfuzního tlaku a tím tak poklesu GF. Identita této vazokonstrikční látky - mediátoru

tubuloglomerulární zpětné vazby v JGA není zatím jasná. Hlavními kaidáty jsou adenosin a adenosintrifosfát (Navar 1998, Nishiyama et al. 2001, Schnermann a Levine 2003, Dobrowolski et al. 2007).

Mezi modulátory tubuloglomerulární zpětné vazby, jež mění její citlivost, můžeme počítat angiotensin II (ANG II) a oxid dusnatý (NO). ANG II zprostředkuje vazokonstrikci při úbytku iontů v distálním tubulu, a to vazokonstrikci aferentní i eferentní arterioly. Konstrikce eferentní arterioly udržuje stálost GF i při snížení přítoku krve do ledvin. Přítomnost Ang II zvyšuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby (Mitchell a Navar 1988). Zvýšená citlivost tohoto mechanismu způsobí, že GF zůstává nižší i při nižší dodávce sodíku k macula densa, což z dlouhodobého hlediska znamená pokles ve vylučování sodíku. Na druhou stranu NO snižuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby a jeho nedostatek způsobí stejný efekt jako přítomnost Ang II, a to snížení vylučování sodíku v delším časovém rozmezí (Navar 1998).

Mechanismus tlakové diurézy a natriurézy

Dlouhodobé mechanismy regulace TK přizpůsobují náplň cirkulace její kapacitě tak, že tyto mechanismy operují s regulací objemu tělesných tekutin. Objem extracelulární tekutiny (OECT) je v těle udržován na konstantní úrovni právě díky správné funkci ledvin (Guyton 1991). Tím je zajištěno optimální prostředí pro funkci buněk. Ionty jako jsou sodík, chlorid a bikarbonát představují hlavní osmotické síly v extracelulární tekutině. Protože



plazmatická osmolalita a plazmatická koncentrace sodíku jsou v úzkém rozmezí velmi přesně regulovány vazopresinem a mechanismem žízně, změny v celkové sodíkové rovnováze (rozdíl mezi příjmem a výdejem sodíku) musí být nutně doprovázeny změnou tekutin s cílem zachovat

stabilní osmolalitu tělesných tekutin (Cowley 1986). V případě poruchy schopnosti ledvin vyloučit potřebné množství sodíku dochází k rozvoji hypertenze (Osborn 1991).

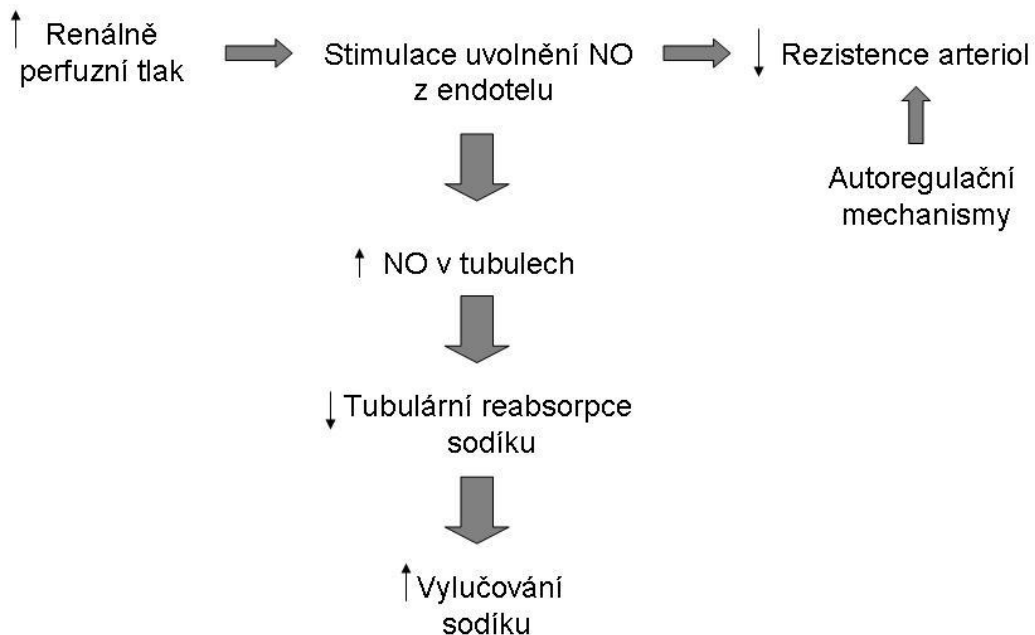
Způsob, jakým intaktní ledviny dlouhodobě kontrolují OECT byl popsán Guytonovou skupinou v 60. letech na základě pokusů na zvířatech i za přispění matematického a počítačového modelování (Guyton 1990a). Výsledkem počítačového modelu byla tzv. funkční renální křivka, popisující účinek TK na výdej moče - diurézu. Při poklesu TK pod 50 – 60 mm Hg diuréza ustane. Jak roste TK, roste i vylučování moče. Při TK 100 mm Hg je diuréza „normální“, při TK 200 mm Hg je zvýšena 6 - 8x. Kromě narůstání objemu moče v závislosti na výši TK také prakticky stejně narůstá vylučování sodíku - tzv. tlaková natriuréza (Guyton 1990b). Za normálních okolností je výchozí hodnota TK v equilibriu s příjmem a výdejem vody a soli. Zvýšený příjem vody a soli zvyšuje OECT a objem krve. TK pak roste a s ním renálně perfuzní tlak, což vede k vyloučení přebytku vody a soli z těla. Tento proces pokračuje, dokud se TK nevrátí k výchozí hodnotě, neboli dokud se nevyloučí nadbytek sodíkových iontů beze zbytku a není opět dosaženo ekvilibračního bodu. Návrat TK vždy přesně až do ekvilibračního bodu je označován jako nekonečná zpětná vazba (Hall et al. 1986). Jsou jen dvě cesty, jak změnit ekvilibrační bod a tak dlouhodobě změnit výši TK: změna sklonu tlakově natriuretické křivky (tzv. posun křivky), či změna příjmu soli a vody (Guyton 1990b). Přestože vzestup renálně perfuzního tlaku vede k progresivnímu vzestupu vylučování sodíku i beze změn v PKL a GF, kdy se filtrované množství sodíku nemění, musí být tento vzestup způsoben poklesem jeho reabsorpce v tubulech (Roman a Cowley 1985, Granger 1992). Při bezchybném fungování tohoto mechanismu v plně funkčních ledvinách hypertenze nevznikne. Tento mechanismus je vlastní ledvinám a může být demonstrován i v preparátech izolovaných ledvin (Kaloyanides et al. 1975, Vaněčková et al. 1999).

Přestože jde o poměrně jednoduchý mechanismus, je tlaková diuréza a natriuréza stále intenzivně studována a to zejména její regulace (Evans et al. 2005). Existuje celá řada neuro-humorálních látek působících parakrinně (přímo z ledvin) i endokrinně (vznik mimo ledviny), jež ovlivňují sklon tlakově natriuretické křivky, označované za modulátory tohoto mechanismu. Stav spojený s poklesem GF a se zvýšenou tubulární reabsorpcí jako jsou snížení OECT, zvýšená aktivita renin-angiotenzinového systému (RAS), zvýšená sympatická nervová aktivita či inhibice vazodilatačních prostaglandinů, posunují tlakově-natriuretickou křivku doprava, snižují její sklon (Persson et al. 1989, Granger 1992, Gross et al. 1999, Moreno et al. 2001). Naopak expanze OECT, inhibice RAS, snížení sekrece ADH, snížení exkrece aldosteronu, atriální natriuretický peptid (ANP), zvýšená aktivita kalikrein-kininového systému posunují tlakově natriuretickou křivku doleva (Paul et al. 1987, Majid et

al. 1993, Boric et al. 1998, Červenka et al. 1999a). Tyto výše uvedené faktory modulují tlakově-natriuretickou křivku a podobně jako u tubuloglomerulární zpětné vazby zvyšují či snižují citlivost daného mechanismu, aniž by rušily jeho celistvost. Ve výsledku tedy posun křivky doprava znamená dlouhodobé zvýšení, posun doleva naopak dlouhodobé snížení TK. Prokázalo se, že všechny dosud známé druhy hypertenze vykazují posun tlakově natriuretické křivky doprava, čímž se nadále potvrzuje zcela zásadní role ledvin v dlouhodobé regulaci TK (Granger a Schnackenberg 2000, Moreno et al. 2001).

Nicméně není zcela objasněno, jaká látka, která je zřejmě tvořená v ledvinách, by mohla být přímo odpovědná za změny tubulární reabsorpce v závislosti na změnách perfuzního tlaku v ledvinách. Takto fungující látka by byla přímým mediátorem tohoto mechanismu. Výsledky celé řady studií z posledních let poukazují na důležitou roli NO v regulaci renálních funkcí. Tato látka má široký rozsah biologických funkcí v těle. Navíc je produkována i lokálně v ledvinách a výrazně ovlivňuje jak renální hemodynamiku tak tubulární funkce ledvin, čímž splňuje předpoklad pro mediátor tlakově-natriuretického mechanismu (Majid a Navar 1997, Granger a Alexaer 2000).

NO jako mediátor tlakově-natriuretického mechanismu



Vybrané vazoaktivní systémy, které hrají důležitou fyziologickou a patofyziologickou úlohu v regulaci renálních funkcí a v rozvoji hypertenze

Systém oxidu dusnatého a jeho biologické vlastnosti

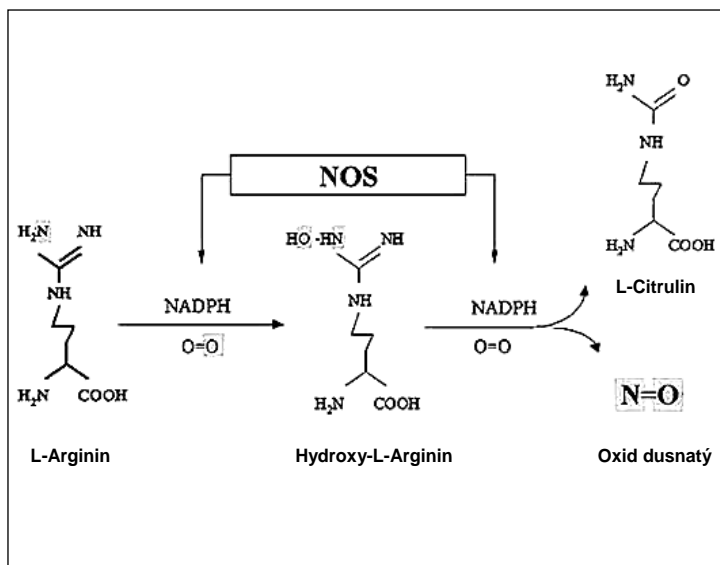
NO existuje především v plynné formě a je relativně stabilním radikálem označovaným též NO•. Díky tomu se dnes také používá pojem „reaktivní formy dusíku“ (reactive nitrogen species, RNS), což jsou sloučeniny primárně odvozené od NO (Wink a Mitchell 1998). V posledním desetiletí přibývá studií o NO jako endogenním mediátoru produkovaném téměř ve všech tkáních, jenž hraje celou řadu důležitých biologických úloh zejména v regulaci hemodynamiky, v procesech imunitního systému a v neurotransmisí (Pacher et al. 2007). Nejvýznamnější odlišností NO od jiných mediátorů je jeho schopnost volně a rychle difundovat přes membrány a tak působit na okolní buněčné elementy.

Přestože nitrovazodilatátory byly používány v klinické medicíně po desetiletí, mechanismus jakým působí v těle nebyl znám. Intenzivní studium biologické funkce NO zřejmě začalo rokem 1980, kdy Robert Furchgott objevil a popsal biologický účinek endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF) (Furchgott a Zawadzki 1980). V roce 1987 bylo postulováno, že NO by mohl být EDRF (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987). Jeho biochemickou tvorbu o pár let později objasnil Moncada (Moncada et al. 1989) a NO se stal jednou z nejsledovanějších molekul posledních desetiletí. Roku 1992 časopis *Science* vyhlásil NO molekulou roku (Koshla 1992), v roce 1998 Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad získali Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za klíčové objevy týkající se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému (Smith 1998).

Biosyntéza oxidu dusnatého

NO vzniká oxidací guanidinového dusíku aminokyseliny L-argininu působením NO syntázy (NOS) za vzniku L-citrulinu (Griffith a Stuehr 1995). NOS byla izolována v několika formách a to neuronální (nNOS nebo NOS I), indukovaná (iNOS nebo NOS II) a endoteliální (eNOS nebo-li NOS III), které se mezi sebou liší subcelulární lokalizací, kinetikou, způsobem aktivace, a tedy i funkcí (Xie et al. 1996). Přítomnost jednotlivých isoform NOS se liší v různých tkáních a orgánech a taktéž se významně liší jejich přítomnost v orgánových

kompartmentech, což má rozhodující vliv na fyziologické funkce regulované NO (Kone a Baylis 1997, Pacher et al. 2007). Nicméně všechny tři isoformy NOS obsahují v aktivním centru hem, jsou aktivní jako homodimery, jsou stereospecifické (D-arginin není substrátem), jako kofaktory vyžadují NADPH, tetrahydrobiopterin, FAD, FMN a kalmodulin (ten se k NOS typu I a III váže po navázání vápníku na kalmodulin, NOS II váže kalmodulin trvale) (Xie et al. 1996, Pacher et al. 2007).



Tabulka základních vlastností NOS

Isoforma	nNOS	iNOS	eNOS
Molekulová váha	~160 kDa	~130 kDa	~133 kDa
Vyžaduje Ca ²⁺	+	-	+
Lokalizace v buňce	cytosol	cytosol	buněčná mambrána
Výskyt	neurony, některé buňky epitelu a cévního hladkého svalu, kosterní sval; není v glii	makrofágy, glie, hepatocyty, endotel, epitel, srdeční myocyty, hladký sval	endotel, plicní a renální epitel, trombocyty, srdeční myocyty, hipokampus
Exprese proteinu	konstitutivní	většinou indukovaná	konstitutivní,
Regulace aktivity	Ca ²⁺ , fosforylace, zpětnovazebná inhibice NO	chybí zpětnovazebná inhibice NO	Ca ²⁺ , fosforylace, modulace exprese

Fyziologická funkce NO

Oxid dusnatý stimuluje aktivitu solubilní guanylátcyklazy a tím reguluje syntézu cyklického guanosin-monofosfátu (cGMP), který vyvolává prostřednictvím cGMP-dependentní proteinkinasy vazodilataci (Murad 1994). NO také inhibuje apoptotické fosforylační signály (geneticky programovaná smrt buněk) prostřednictvím cGMP a G kinasy. V imunitním systému se účastní nespecifické obrany organismu, indukuje tvorbu interferonu a zasahuje do procesů fagocytózy a zánětlivých reakcí (Guzik et al. 2003, Pacher et al. 2007).

V kardiovaskulárním systému se NO podílí na udržování tonu cév a krevního tlaku, inhibuje adhesi i agregaci trombocytů, tlumí aktivaci leukocytů a má antiproliferační účinek. NO významně ovlivňuje renální hemodynamiku a tubulární funkce ledvin. Indukcí vazodilatace v corpus cavernosum způsobuje NO erekci. NO relaxuje střevní hladkou svalovinu včetně svěračů a má klíčový význam pro obranné schopnosti mukózní vrstvy gastrointestinálního traktu NO. V centrálním nervovém systému hraje roli při morfogenezi mozku, reguluje tvorbu synapsí, výbojovou aktivitu neuronů a výdej neurotransmiterů. NO je považován za jeden z mediátorů bolesti (Moncada 1994, Ignarro 2001, Bishop 2005, Pacher et al. 2007).

Patofyziologická funkce NO

Oxid dusnatý se účastní septického šoku, může být klíčovou molekulou při migréně i jiných vaskulárně podmíněných bolestech hlavy (Thomsen a Olesen 1998, , Pacher et al. 2007). Snížená koncentrace NO je jedním z faktorů hypertenze a erektilní dysfunkce (Ignarro 2001). Inhibitory inducibilní NOS mají pozitivní vliv při tlumení zánětlivých procesů jako artritidy, bronchiální astma atd. NO může hrát roli při rozvoji Alzheimerovy choroby a epilepsie, kdy jeho přemíra a interakce se superoxidem může vyvolávat neurotoxické účinky (Dawson 1995). Autooxidací NO vzniklá nitrosylační činidla mohou poškozovat deaminací báze DNA, což může vést k mutacím (Caulfield et al. 2003). Některé autoimunitní reakce mohou být rovněž způsobeny interakcí antigen-specifickými protilátkami s reaktivními formami kyslíku a dusíku. NO je zapojen i v onemocněních gastrointestinálního traktu jako je porucha motility, vředová choroba nebo zánětlivá onemocnění střev (Guzik et al. 2003, Pacher et al. 2007).

Role NO v regulaci renálních funkcí

Systém NO hraje důležitou úlohu v regulaci kardiovaskulárních a renálních funkcí (Raj 2001, Majid a Navar 2001, Wilcox 2006). Jeho silný vazodilatační efekt, kterým ovlivňuje výši TK, ale také jeho vliv na transport sodíku v ledviných tubulech se sekundárně podílí na regulaci tlaku (Kone a Baylis 1997, Majid a Navar 2001, Wilcox 2005). Jak již bylo výše zmíněno, NO ovlivňuje základní funkční mechanismy ledvin a hraje tak důležitou a nepostradatelnou úlohu v regulaci TK. V ledvinách jsou přítomny všechny tři isoformy NOS, nicméně za hlavního producenta NO je považována endoteliální NOS. Ztráta nebo snížení produkce NO tímto enzymem stejně jako zvýšená degradace NO může být rozhodujícím

faktorem při poruše fyziologických mechanismů, a může tak přispívat k rozvoji renálních a kardiovaskulárních poruch včetně hypertenze (Massion a Balliga 2003, Ortiz a Garvin 2003).

Akutní systémová inhibice NOS vede ke zvýšení TK a zvýšení cévní rezistence (Chin et al. 1998, Vaněčková et al. 2005). I přes snížení PKL nedochází k výrazným změnám v GF díky větší resistenci postglomerulární arterioly ve srovnání s preglomerulární (Schnackenberg et al 1995, Kone a Baylis 1997, Vaněčková et al. 2005). Navíc systémová inhibice způsobuje zřejmě tlakovou diurézu a natriurézu i přesto, že tlakově natriuretický mechanismus by měl být oslaben (Chin et al. 1998, Vaněčková et al. 2005). Tento efekt není zcela objasněn a je možné, že akutní zvýšení tlaku stimuluje uvolnění dalších působků jako je ANP (Boric 1998). V případě, že NO systém je inhibován pouze lokálně a to přímo v ledvině bez výrazného ovlivnění systémového tlaku dochází opět k vzestupu renální vaskulární rezistence (RVR) a k poklesu PKL bez výrazných změn v GF (Majid et al. 2004, 2005), nicméně se plně projeví zeslabení tlakově natriuretického mechanismu potvrzující výsadní postavení NO v jeho regulaci (Majid et al. 1993). Jak již bylo zmíněno, v ledvině byly izolovány všechny tři isoformy NOS. Neselektivní blokáda všech tří isoform tedy neposkytuje údaje o úloze jednotlivých enzymů v regulaci renálních funkcí a faktorech, jež se podílejí na řízení jejich enzymatické aktivity. Studium úlohy nNOS pomocí selektivních inhibitorů prokázalo, že NO produkovaný touto isoformou akutně neovlivňuje basální vaskulární tonus a tak TK (Moore et al. 1993, Ollerstam et al. 1997). Nicméně byla prokázána role NO produkovaným nNOS v regulaci renálních funkcí (Ollerstam et al. 1997, Ichihara et al. 1998, Červenka et al. 2001, 2002) zvláště pak v regulaci glomerulárního perfuzního tlaku a v modulaci tubuloglomerulární zpětné vazby právě díky zvýšené aktivitě nNOS v buňkách JGA (Wilcox 1998, Ren et al. 2001, Vallon et al. 2001), čímž se může sekundárně uplatňovat v regulaci TK. Selektivní inhibice inducibilní NOS neprokázala významnou roli této isoformy za fyziologických podmínek i přes konstitutivní expresi v ledvinách (Mattson et al. 1998, Bagnall et al. 2005). Jak již bylo zmíněno, její aktivita silně vzrůstá při orgánovém poškození a zejména zánětlivých procesech, kde NO uplatňuje spíše svou patofyziologickou úlohu (Wink a Mitchell 1998, Pacher et al. 2007).

Významné experimentální modely pro výzkum NO systému

Chronická farmakologická inhibice produkce NO v těle vede k rozvoji sůl-senzitivní formy hypertenze (Tolins a Shultz 1994, Yamada et al. 1996, Kopkan a Majid 2005). Studium mechanismu rozvoje NO deficientní formy hypertenze bylo potvrzeno, že dochází nejen

k přímému nedostatku NO pro vaskulární funkce, tzv. endotelovou dysfunkci (Scrogin et al. 1998), ale také dochází k poruše renálních funkcí, což vede k následné retenci sodíku (Mattson et al. 1994, Kopkan a Majid 2006). Chronická selektivní blokáda nNOS nebo iNOS obvykle vede k mírnému vzestupu TK u zdravých kontrolních zvířat (Ollerstam et al. 1997, Mattson et al. 1998), nicméně to se projeví hlavně u experimentálních modelů chronických onemocnění, která mají obvykle vztah k ledvinám jako např. diabetická nefropatie nebo rozvinutá hypertenze (Komers et al. 2000). Antihypertenzní efekt NO je jedním z hlavních kompenzačních mechanismů proti zvýšené aktivitě vasokonstrikčních látek (Wilcox 2005, Patzak a Persson 2007). Interakcím jednotlivých systémů se v posledních letech věnuje značná pozornost, jelikož jakákoliv nerovnováha se podílí na rozvoji hypertenze a orgánovém poškození.

Rozvojem genového inženýrství jsou dnes dostupné kmeny myši, jimž chybí gen pro jednotlivé isoformy NOS (Massion a Balliga 2003, Ortiz a Garvin 2003). Studie na těchto myších prokázaly esenciální roli eNOS v produkci NO, jenž se podílí na regulaci TK (Massion a Balliga 2003, Ortiz a Garvin 2003). Kmen eNOS knock-out myši vykazuje významně vyšší TK a navíc byla u těchto myši potvrzena senzitivita k vysokému příjmu soli, což vede k dalšímu vzestupu tlaku (Leopard et al. 2006). Tyto poznatky poukazují na porušenou funkci ledvin, nicméně výsledky funkční studie zaměřené zejména na renální hemodynamiku tohoto kmene nejsou jednoznačné (Beierwaltes et al. 2002, Wang et al. 2004) a prozatím chybí komplexní studie, která by definovala i další renální parametry u tohoto kmene. Myši s deficientní nNOS nebo iNOS nevykazují žádný významný fenotyp ve fyziologii kardiovaskulárních nebo renálních funkcí (Ortiz a Garvin 2003), což vede k závěru, že jejich úloha není zcela podstatná v regulaci orgánových funkcí a je plně kompenzována NO produkovaným eNOS. Nicméně deficit dvou isoform NOS u myši se projevil výraznější mortalitou a poruchou vodní rovnováhy v těle a myši, které nemají žádný gen pro NOS, vykazují vysokou mortalitu zejména z důvodu selhávajícího kardiovaskulárního systému (Tsutsui et al. 2006).

I přes intenzivní studium systému NO dokazující jeho mimořádný význam v regulaci kardiovaskulárních a renálních funkcí s ohledem na regulaci TK existuje celá řada nejasností, jak je celý systém regulován a jaké jsou vzájemné interakce mezi jednotlivými vazoaktivními systémy, které se podílejí na fyziologii regulace orgánových funkcí a rovněž hrají důležitou úlohu v patofyziologii hypertenze a orgánového poškození.

Renin-angiotenzinový systém a jeho biologické vlastnosti

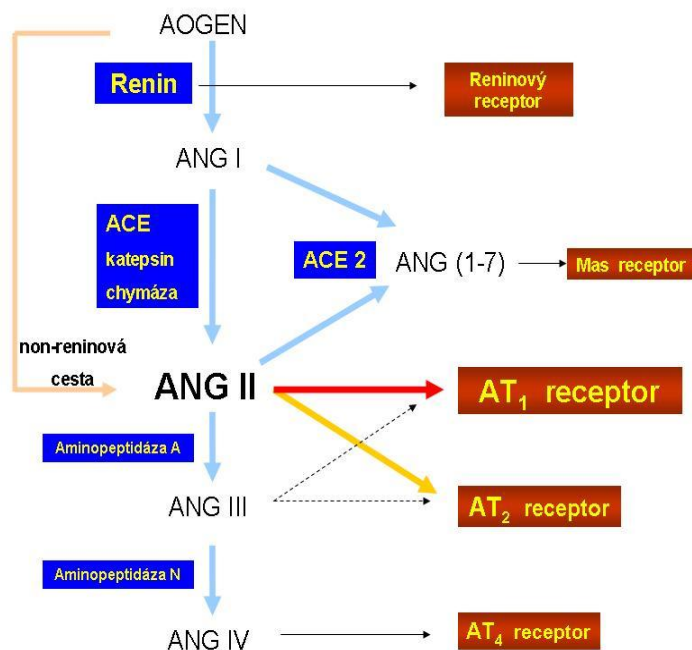
Renin-angiotenzinový systém (RAS) je jeden z klíčových fyziologických systémů, jenž hraje významnou úlohu v regulaci renálních funkcí, objemu extracelulární tekutiny, koncentraci elektolytů a arteriálního krevního tlaku. Nicméně je prokázáno, že zvýšení aktivity RAS významným způsobem přispívá k patofyziologii hypertenze (Navar et al. 2002).

Biosyntéza jednotlivých komponent RAS

Renin, objevený v roce 1898 fyziology R. Tigerstedtem a P. Bergmanem (Marks a, Maxwell 1979), je ledvinami produkovaná aspartylproteáza s molekulovou hmotností přibližně 44 kDa. Renin je syntetizován ve formě velkého preprohormonu preproreninu v juxtaglomerulárních (JG) buňkách ledvin, které obklopují aferentní arterioly v místech, kde tyto arterioly vstupují do glomerulů (Carey a Siragy 2003). V endoplazmatickém retikulu JG buněk je z preproreninu, který se skládá z 401 aminokyselinových zbytků, odštěpen 20-ti aminokyselinový signální peptid za vzniku proreninu, který je skladován v sekrečních granulích Golgiho aparátu JG buněk. Odštěpením 46-ti aminokyselinového peptidu z N-terminálního konce molekuly proreninu vzniká aktivní renin (Carey a Siragy 2003). Prorenin má relativně malou biologickou aktivitu. Část proreninu je v ledvinách přeměňována na aktivní renin a část je uvolňována do cirkulace, kde se již přeměňuje jen velmi málo. Prorenin může být přeměňován na aktivní renin také plazmatickým kalikreinem (Campbell 2003). Renin má poločas rozpadu v cirkulaci asi 80 minut. U většiny druhů je renin kódován pouze jedním genem (Ren-1c), avšak některé kmeny myši mají dva geny pro renin (Ren-1d a Ren-2) (Campbell 2003). Sekrece reninu z ledvin do cirkulace je kontrolována nervově, intrarenálními baroreceptory a množstvím sodíku v macula densa a touto stimulací je aktivní renin uvolňován z JG buněk exocytózou.

Jediným substrátem pro renin je glykoprotein angiotenzinogen (Aogen) syntetizovaný primárně v játrech, ale také ze srdeční, cévní, ledvinné a tukové tkáně (Carey a Siragy 2003). Aogen je uvolňován do cirkulace, kde je jeho koncentrace v cirkulaci přibližně 1000x větší než koncentrace volného cirkulujícího ANG I a ANG II a kde je štěpen reninem za vzniku ANG I. Rychlost tvorby ANG I závisí na plazmatické reninové aktivitě (PRA), která je regulována tempem uvolňování reninu z JG buněk ledvin (Zou et al. 1996). Biologicky málo účinný deka-peptid ANG I je dále štěpen různými enzymy na více či méně aktivní metabolity. Dipeptidylkarboxypeptidáza, angiotenzin-konvertující enzym (ACE), odštěpuje 2 aminokyselinové zbytky z C-terminálního konce řetězce deka-peptidu ANG I, a tak vzniká

hlavní produkt tohoto systému - oktapeptid ANG II. Tato zinková metaloproteáza má dvě aktivní C-terminální domény, které jsou inhibovány ACE inhibitory. ACE existuje ve dvou



formách – solubilní a na membráně vázané formě (Carey a Siragy 2003, Fleming 2006). Většina ACE je vázána na plazmatickou membránu různých typů buněk (endoteliální buňky, mikroklky kartáčového lemu, neuroepiteliální buňky, atd) (Defendini et al. 1983, Sibony et al. 1993). Díky rozšířené lokalizaci ACE v krevním

řečišti a v různých tkáních může být ANG I konvertován lokálně na ANG II přímo v tkáních (Carey a Siragy 2003). ANG II, stále považovaný za nejúčinnější peptid RAS, je degradován peptidázami během několika sekund, na rozdíl od reninu, Aogenu a ANG I, které mají relativně dlouhý poločas rozpadu. ANG II může být metabolizován enzymy, které se souhrnně nazývají angiotenzinázy. Aminopeptidáza A odstraňuje jeden aminokyselinový zbytek z N-terminálního konce řetězce ANG II za vzniku heptapeptidu ANG III, který je štěpen další aminopeptidázou N na hexapeptid ANG IV (Campbell 2003, Padia et al. 2007).

ANG (1-7) je tvořen přímo z ANG I účinkem endopeptidáz (NEP, PEP) nebo z ANG II působením vysoce účinného enzymu ACE 2 (Ferrario et al. 2005). Takto syntetizovaný ANG (1-7) je poté štěpen pomocí ACE na biologicky neaktivní metabolity. V plicích je ANG (1-7) metabolizován především pomocí ACE. Naopak neprilysin, který je hlavním enzymem v syntéze ANG (1-7), hraje důležitou roli také v degradaci tohoto heptapeptidu v ledvinách. Hlavními zdroji pro produkci ANG (1-7) jsou srdce, mozek a ledviny, dále je tento heptapeptid produkován v uteroplacentární tkáni a ve vaječnicích (Ferrario et al. 2005).

Specifické receptory RAS

Biologický účinek jednotlivých komponent RAS je zprostředkován prostřednictvím specifických receptorů. Reninový receptor je tvořen 350-ti aminokyselinami a má jednu transmembránovou doménu, na kterou se specificky váže renin a prorenin (Nguyen 2007). Receptory pro renin se nacházejí v srdci, v mozku, v placentě, v játrech, ale také v ledvinách, kde jsou tyto receptory lokalizovány v glomerulárním mesangiu a subendoteliální vrstvě renálních artérií. Nicméně významný fyziologický význam těchto receptorů v regulaci krevního tlaku nebyl prokázán (Nguyen 2007).

Hlavní fyziologický význam receptorů, jež se podílejí přímo na regulaci krevního tlaku mají receptory pro ANG II (Brown a Sernia 1994, Navar et al. 2002, Carey a Siragy 2003). Existují dva hlavní typy těchto receptorů – AT₁ a AT₂ receptory, oba mají proteinovou povahu a patří mezi tzv. serpentinové s G proteinem-spřážené receptory. AT₁ receptory zprostředkovávají hlavní fyziologické účinky ANG II. Funkce AT₂ receptorů jsou stále předmětem zkoumání, nicméně se předpokládá, že zprostředkují opačný fyziologický efekt než AT₁ receptory. Zatímco AT₁ receptory stimulují reabsorpci sodíku, AT₂ receptory zvyšují exkreci sodíku. AT₁ receptory podporují buněčný růst, naopak AT₂ receptory vyvolávají antiproliferaci a diferenciaci buněk. Stimulací AT₁ receptorů způsobuje ANG II vazokonstrikci cév, kdežto AT₂ receptory zprostředkovávají pomocí stimulace NO cévní vazodilataci (Dinh et al. 2001, Mehta a Griendling 2007).

Myši a potkani, na rozdíl od člověka, mají dvě formy těchto receptorů označované jako AT_{1A} a AT_{1B} receptory (Campbell 2003). V ledvinách jsou AT₁ receptory lokalizovány na buňkách hladké svaloviny renálních cév, včetně aferentní i eferentní arterioly a glomerulárních mesangiálních buněk, dále na kartáčovém lemu a na bazolaterálních membránách buněk proximálního tubulu, na buňkách epitelia tlustého vzestupného raménka Henleho kličky, distálního tubulu, korové i dřevné části sběracího kanálku, macula densa a na glomerulárních podocytech (Harrison-Bernard et al. 1997, Miyata et al. 1999). Podobně AT₁ mRNA byla nalezena v proximálním tubulu, v tlustém vzestupném raménku Henleho kličky, v buňkách korové i dřevné části sběracího kanálku, v glomerulu, v cévách, ve vasa recta a JG buňkách (Meister et al 1993, Navar et al. 2002). Kromě ledvin se AT₁ receptory vyskytují také v řadě dalších orgánů včetně srdce (zprostředkování pozitivních ionotropních a chronotropních účinků Ang II na kardiomyocyty), mozku (uvolňování vazopresinu, žízeň, sláný apetit, aktivace sympatiku, regulace krevního tlaku), plic, jater (metabolismus glykogenu), kůry nadledvin (uvolňování sůl-zadržujícího hormonu aldosteronu), ale také v

cévních hladkosvalových buňkách (podpora vazokonstrikce) (Brown a Sernia 1994, Mehta a Griendling 2007). Selektivními antagonisty AT₁ receptorů jsou bifenyylimidazoly (losartan, caesartan atd.) způsobující signifikantní snížení krevního tlaku (Navar et al. 2002, Carey a Siragy 2003).

AT₂ receptory jsou výrazně exprimovány ve fetálních ledvinách, ale během neonatálního vývoje dochází k jejich značnému poklesu (Ozono et al. 1997). V dospělých ledvinách jsou AT₂ receptory syntetizovány v aferentní arteriole, v glomerulárních endoteliálních a mesangiálních buňkách, v buňkách proximálního tubulu a v intersticiálních buňkách (Miyata et al. 1999, Ozono et al. 1997). AT₂ receptory byly také detekovány v srdci, v nadledvinách, v reprodukční tkáni a v mozku (Dinh et al. 2001). Kromě vazodilatačních účinků inhibují AT₂ receptory syntézu reninu (Siragy et al. 2005). Mezi selektivní ligay AT₂ receptorů patří tetrahydroimidazolpyridiny – označované jako PD123319, PD123177 nebo CGP42112 (Dinh et al. 2001). Výsledky studií biologické funkce AT₂ receptorů pomocí farmakologické blokády jsou často kontroverzní patrně proto, že exprese AT₂ receptorů se mění s věkem a navíc účinnost a selektivita inhibice těchto receptorů není rovněž totožná. Tím je průkaznost antihypertenzního biologického účinku ANG II velice problematická a zůstává stále neobjasněna.

Prostřednictvím AT₁, AT₂ a specifických ANG III receptorů působí také ANG III (Campbell 2003, Padia et al. 2007). Účinky ANG IV jsou zprostředkovány pomocí AT₄ receptorů, které patří mezi inzulínem-regulované aminopeptidázy (Harding et al. 1994, Chai et al. 2004), ANG (1-7) působí přes Mas receptor (Ferrario et al. 2005).

Role jednotlivých komponent RAS v regulaci renálních funkcí

Přímý efekt reninu se neustále zkoumá a předpokládá se, že by renin mohl mít podíl na hypertrofii, fibróze a apoptóze buněk, čím by se podílel na tkáňovém poškození, které je pozorováno při zvýšené aktivitě RAS (Nguyen 2007). Renin by také mohl mít přímý stimulační efekt na produkci aldosteronu v nadledvinkách, což by se sekundárně projevilo v regulaci TK. I přes biologický vazokonstrikční efekt, plní ANG I především roli jako pohotovový zdroj pro tvorbu ANG II (Carey a Siragy 2003). ANG II vyvolává cévní vazokonstrikci, stimuluje uvolňování aldosteronu, uvolňování katecholaminů z dřeně nadledvin a ze zakončení sympatických nervů, pocit žízně a chuť na slané, zvyšuje kontraktilitu myokardu a ovlivňuje epiteliální reabsorpci soli a vody ve střevě a v ledvinách (Stock et al. 1995, Dinh et al. 2001, Carey a Siragy 2003, Mehta a Griendling 2007). Mezi

přímé intrarenální účinky ANG II patří renální arteriální vazokonstrikce, konstrikce aferentní i eferentní arterioly a stimuluje kontrakce mesangiálních buněk, čímž je snížena PKL, rychlost GF a tím nálož filtrovaného sodíku do tubulu (Granger a Schnackenberg 2000, Navar et al. 2002). Dále pak je to zvyšování citlivosti tubuloglomerulární zpětné vazby, stimulace tubulární reabsorpci sodíku a zeslabení tlakové natriurézy (Mitchell a Navar 1988, Evans et al. 2005). V proximálním tubulu ANG II zvyšuje aktivitu $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměny, $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotransportu a Na^+/K^+ ATPázy v bazolaterální membráně. V distálním tubulu ANG II reguluje $\text{Na}^+\text{-H}^+$ výměnu a k amiloridu senzitivní sodíkový kanál (Garvin 1991, Wang a Giebisch 1996). Intrarenální blokáda AT_1 receptorů za podmínek minimálního snížení arteriálního tlaku vyvolá signifikantní zvýšení GF, průtoku krve ledvinou, celkové i frakční exkrece sodíku (Červenka et al. 1999b, Navar et al. 1999, Kopkan et al. 2004). ANG II také vykazuje významné proliferační účinky, přispívá k zánětu a fibróze ledvin, což má za následek změny v renálních funkcích a sekundárně se projeví na výši TK (Navar et al. 2002). Tyto účinky jsou zprostředkovány zejména aktivací celé řady cytokinů a rovněž stimulací oxidativního stresu (Romero a Reckelhoff 1999, Wilcox 2005, Ruiz-Ortega et al. 2006). Proto je ANG II klíčovým faktorem v patofyziologii a v rozvoji hypertenze, onemocnění ledvin a kardiovaskulárního systému.

Intrarenální RAS byl prvním popsáním funkčním tkáňovým RAS na základě *in vivo* pokusů, u kterých měla intrarenální inhibice RAS za následek významné zvýšení renální hemodynamiky a exkrece sodíku a vody. Později byla v ledvinách prokázána přítomnost všech komponent RAS (Navar et al. 2002, Carey a Siragy 2003). Renin je produkován JGA buňkami, ale i buňkami proximálních tubulů. Aogen produkováný v buňkách proximálního tubulu slouží jako základ pro intratubulární a intersticiální ANG I a ANG II. Je také sekretován přímo do lumen tubulů, kde je poté štěpen přítomným reninem na ANG I. Na kartáčovém lemu buněk proximálních tubulů je ANG I konvertován pomocí ACE na ANG II (Carey a Siragy 2003). Hladiny mRNA pro Aogen i samotného proteinu jsou stimulovány ANG II a tato pozitivní zpětná vazba vede k lokální produkci substrátu, jež je zvyšována jeho vlastním produktem, což pravděpodobně přispívá ke zvyšování intrarenální produkce ANG II během hypertenze (Navar et al. 2002). Koncentrace ANG II, jakož i ANG I, v intersticiální i v proximální tubulární tekutině jsou mnohem vyšší než plazmatické koncentrace (Nishiyama et al. 2002, Carey a Siragy 2003). Na zvýšených intrarenálních koncentracích ANG II se podílí jak intrarenálně vyprodukovaný ANG II, tak ANG II internalizovaný pomocí AT_1 receptory-zprostředkované endocytózy. ANG II se nachází v renálních endozómech spolu s

ANG I, AT₁ receptory a ACE, což přispívá k celkovým koncentracím ANG II měřeným v ledvinných homogenátech (Navar et al. 2002).

V posledních letech přibývají studie prokazující biologickou funkci dalších angiotenzinů, dříve považovány pouze za málo aktivní metabolity ANG II. Nicméně bylo zjištěno, že některé funkce původně připisované účinku ANG II, jako je uvolňování vazopresinu v mozku, mohou být řízené ANG III (Reaux et al. 2001). Přestože ANG III stimuluje vazokonstrikci a reabsorpci sodíku, nedávné studie ukazují na ANG III indukovaný natriuretický efekt, který se projeví při inhibici AT₁ receptorů a je zprostředkován přes AT₂ receptory (Padia et al. 2007). U ANG IV byly rovněž prokázány vazokonstrikční vlastnosti, ale několikanásobně nižší než u ostatních angiotenzinů a s velmi slabou afinitou k AT₁ receptorům. Nicméně, stimulací AT₄ receptorů pro ANG IV byl popsán vasodilatační efekt v mozku a ledvinách, který je zřejmě zprostředkovaný NO produkovaným zvýšenou aktivitou eNOS, která je stimulována právě ANG IV (Harding et al. 1994, Chai et al. 2004). V souvislosti s funkcí těchto látek se hovoří o tzv. duálním efektu a přesné mechanismy působení těchto relativně nových komponent RAS jsou stále studovány.

Biologická aktivita ANG (1-7) byla poprvé prokázána v roce 1988 (Schivavone et al. 1988). Obecně ANG (1-7) působí proti účinkům ANG II a to tak, že stimuluje NO a vazodilatační prostaglandiny (Carey a Siragy 2003, Ferrari et al. 2005). Účinky ANG (1-7) v ledvinách jsou závislé na rovnováze sodíku a vody, na renální nervové aktivitě a na aktivaci RAS. Již velmi nízké koncentrace ANG (1-7) mohou ovlivnit renální funkce v proximálním i v distálním tubulu (Chappell et al. 1998, Santos et al. 2000) vedoucí k natriuríze a k diuréze, které jsou výsledkem aktivace řady transportérů účastnících se absorpce vody a elektrolytů v renálních tubulech a sběracích kanálcích. ANG (1-7) také může regulovat účinky tubulárního vazopresinu (Ferrario et al. 2002, Magaldi et al. 2003). Navíc může inhibovat oxidativní stres, stimuluje agregaci destiček a funguje jako protizánětlivý činitel. Deficit v syntéze či aktivitě ANG (1-7) může přispívat k rozvoji hypertenze s porušenou regulací vnitřních kontrolních mechanismů (Ferrario et al. 2005).

Významné experimentální modely pro výzkum RAS

Intenzivní studium RAS v patofyziologii hypertenze podnítilo vznik řady experimentálních hypertenzních modelů, které umožnily další výzkum úlohy a regulace RAS. Nejjednodušším modelem je pomalá chronická infuze nízké dávky ANG II, která nemusí mít akutní presorický efekt, pomocí osmotických pumpiček, které jsou implantovány podkožně

nebo do břišní dutiny. U tohoto modelu dochází přes pouze mírné zvýšení plazmatických hladin ANG II k postupné akumulaci ANG II v ledvinách, čímž je narušena jejich schopnost vyloučit příslušné množství sodíku (Zou et al. 1996, Navar et al. 1995, 2002). Tento model pomohl pochopit důležitost lokálního RAS v ledvinách a jeho funkci.

Patofyziologické procesy následující po vzniku stenózy renální artérie byly poprvé popsány Goldblattem v roce 1934 na základě experimentů na psech a jsou známy jako Goldblattovské typy hypertenze (Goldblatt et al. 1934). U modelu dvouledvinové jednosvorkové hypertenze (2K1C - two-kidney one-clip) svorka naložená na renální artérii snižuje renální perfuzní tlak, důsledkem čehož se zvýší syntéza a uvolnění reninu z této ledviny. Zvýšením aktivity RAS se zvýší hladiny cirkulujícího ANG II a v důsledku jeho účinku vzroste periferní cévní rezistence a TK. Kontralaterální nestenotická ledvina je vystavena zvýšenému TK, snižuje se v ní syntéza reninu a očekávalo by se, že se díky mechanismu tlakové natriurézy zvýší vylučování sodíku (Goldblatt 1958, Plath 1983, Navar et al. 1995, 1998). Je však známo, že byt' jen jedna, ale funkční ledvina, je schopna zajistit vodní a sodíkovou rovnováhu za podmínek normotenze. Navíc jakmile je perfuzní tlak ve stenotické ledvině zvýšen, plazmatická reninová aktivita a cirkulující ANG II se vrátí k normě, TK však zůstane zvýšen. Důvodem je vysoká intrarenální koncentrace ANG II v nestenotické ledvině (Navar et al. 1995). Intrarenální hladiny ANG II jsou natolik vysoké, že je nepravděpodobný jejich původ pouze z „vychytávání“ ze systémové cirkulace. Je zde tedy patrný nesoulad mezi systémovou a intrarenální hladinou ANG II. Výsledky experimentů svědčí pro vznik zvýšené hladiny ANG II non-reninovou cestou (Navar et al. 1995, Červenka et al. 1999b). Přímý vaskulární a tubulární účinek ANG II intrarenálně hraje v tomto případě důležitou roli ve vývoji a udržení hypertenze. Navíc zvýšení hladiny aldosteronu způsobené ANG II se spoluúčastní na regulaci transportních mechanismů v distálním nefronu vedoucí k retenci sodíku (Liard et al. 1974, Navar et al. 1998).

V roce 1990 vytvořila skupina profesora Mullinse první transgenní model potkanů (TGR) ve výzkumu hypertenze (Mullins et al. 1990). Tento model představuje monogenní formu hypertenze, neboť do genomu normotenzních Hannover Sprague-Dawley potkanů byl zaveden myší reninový gen (Ren-2); označení kmene TGR(mRen2)27. Přesto, že jde o zdánlivě jednoduchý model, u kterého je hyperaktivován RAS, mechanismy patogeneze hypertenze u těchto zvířat se zabývala celá řada studií (Bader et al. 1992, Saer et al. 1992, Mitchell a Mullins 1995, Kopkan et al. 2004, 2005). Současné studie prokazují (Dvořák et al. 2004, Husková et al. 2006), že jde čistě o ANG II - dependentní formu hypertenze jejíž rozvoj a stupeň závisí na počtu alel myšího reninového genu. Rozvoj hypertenze u homozygotních

transgenních potkanů je prudký a krevní tlak dosahuje až k 300 mmHg. Tato zvířata vykazují menší váhový přírůstek a pokud nejsou léčena antihypertenzivy, umírají v raném věku za známek maligní hypertenze (Dvorak et al. 2004). Nicméně léčba inhibitory ACE a antagonisty ANG II receptorů zamezí rozvoji hypertenze nebo významně sníží hladiny TK i u zvířat s rozvinutou hypertenzí (Mullins et al. 1990). U heterozygotních transgenních potkanů, kteří vzniknou křížením transgen-positivního potkana s transgen-negativním potkanem opačného pohlaví se hypertenze začíná rozvíjet přibližně ve 4–5 týdnu věku, rozvoj hypertenze však není tak dramatický ve srovnání s homozygoty a krevní tlak dosahuje maxima okolo 240 mmHg v 9–10 týdnu věku zvířat. Tato zvířata poměrně dobře prospívají, aniž by musela být léčena antihypertenzivy (Mullins et al. 1990, Husková et al. 2006). U TGR byl také potvrzen sexuální dimorfismus v rozvoji a stupni hypertenze (Opočenský et al. 2004). Výše krevního tlaku samců a samic se liší, samice mají v průměru o 30–40 mmHg nižší krevní tlak. Tlak heterozygotních TGR samic se ve stáří spontánně vrací až k normotenzním hodnotám. U TGR samců dochází k vážnějším, hypertenzí vyvolaným, orgánovým poškozením než u TGR samic, což podporuje teorii, že arogeny mají stimulační účinky na RAS (Engler et al. 1998).

Relativně nový model rovněž monogenní ANG II dependentní formy hypertenze, opět vytvořený skupinou Prof. Mullinse (Kantachuvesiri et al. 2001), je kmen inbredních transgenních potkanů [označení kmene TGR(Cyp1a1Ren-2)], u kterých je indukována exprese myšího reninového genu (Ren-2) pomocí přírodních xenobiotik jako je indol-3-carbinol (I3C). Tento gen je řízen Cyp1a1 promotorem, který není za normálních podmínek aktivní, a proto myší reninový gen není exprimován. Podáním I3C v dietě lze však tento promotor aktivovat a tak navodit expresi myšího reninového genu v játrech a produkovaný renin je uvolňován do cirkulace. Zvýšením plazmatické reninové aktivity se spouští celá kaskáda RAS s následným zvýšením koncentrace ANG II vedoucím k rozvoji ANG II dependentní hypertenze (Vaňourková et al. 2006). Zvláštností tohoto modelu je, že aktivace Cyp1a1 promotoru je závislá na dávce I3C a je rovněž reverzibilní, což z něj činí zcela mimořádný model pro studium RAS v rozvoji hypertenze a orgánového poškození (Mitchell et al. 2006).

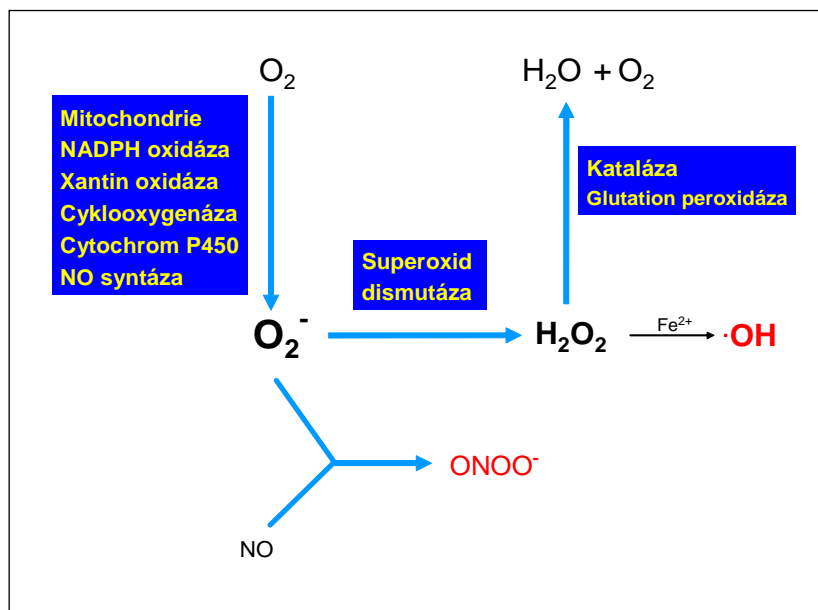
Jak klasické tak i nové modely ANG II dependentní formy hypertenze dopomohly k pochopení mechanismů RAS v regulaci TK a renálních funkcí. Nicméně úloha zejména lokálního RAS ještě není zcela objasněna. Dále je pak nutné pochopit vzájemné mezisystémové interakce s ostatními vazoaktivními působky, jež se uplatňují ve fyziologii funkce orgánů včetně ledvin a v patofyziologii hypertenze.

Volné kyslíkové radikály a oxidativní stres

Oxidativní stres může být zjednodušeně definován jako zvyšování tvorby oxidantů, snížení účinnosti antioxidační ochrany a neschopnost opravit oxidační poškození. Mezi hlavní oxidanty patří reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS), což mohou být volné radikály, reaktivní anionty obsahující atom kyslíku nebo molekuly s kyslíkem, které buď mohou vytvořit volné radikály nebo jsou volnými radikály aktivovány. Tyto vysoce reaktivní substance mohou přímo či nepřímo ovlivňovat fyziologické a patofyziologické mechanismy v těle (Touyz 2004, Wilcox 2006).

Biosyntéza ROS a jejich vlastnosti

Zdrojem volných radikálů v biologických systémech je molekulární kyslík, který přijme volný elektron za vzniku superoxidu (O_2^-). Hlavním zdrojem O_2^- je aerobní metabolismus zejména v mitochondriích, autooxidační reakce a reakce katalyzované celou řadou oxidáz jako je xantin oxidáza (XO), NADPH oxidáza (Nox), cyklooxygenáza,



lipoxygenáza, cytochrom P450, ale také za určitých podmínek NOS (Cai a Harrison 2000, Wilcox 2005, Wolin et al. 2005). Tento radikál je jedinečný, protože z něho mohou vznikat jiné volné radikály, a stal se jedním z nejvíce studovaných radikálů. Jako značně reaktivní oxidant musí být O_2^- účinně

degradován dismutací a to spontánní nebo katalyzovanou enzymem superoxid-dismutázou (SOD) (Wilcox 2005). SOD můžeme rozdělit podle toho, který kov obsahuje, nebo podle buněčné lokalizace – Cu/Zn SOD neboli extracelulární a Mn SOD neboli intracelulární (Zelko et al. 2002, Paravicini a Touyz 2006). Tento enzym je široce distribuován ve tkáních, aby tak minimalizoval negativní účinky nadměrné produkce O_2^- . Nicméně reakční rychlost dismutace O_2^- katalyzované SOD je asi třikrát nižší než reakce O_2^- s NO, která dává vznik dalšímu

radikálu peroxynitritu (Cai a Harrison 2000, Reckelhoff a Romero 2003, Pacher et al. 2007). Produktem dismutace O_2^- je peroxid vodíku, který není pokládán za volný radikál. Nicméně patří mezi biologicky významné i když méně škodlivé oxidanty, snadno proniká přes buněčné membrány a má delší poločas trvání než volné radikály. Rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík je katalyzován především dvěma enzymy a to katalázou a glutathionperoxidázou (Gpx) (Wilcox 2005). Tento rozklad je přímo úměrný koncentraci enzymu a koncentraci substrátu. Hlavním rizikem zvýšené koncentrace peroxidu vodíku je reakce s přechodnými kovy (Fentonova reakce) nebo interakce O_2^- s peroxidem vodíku (Haber-Weissova reakce) za vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu, který je potenciálně nejsilnější oxidant vyskytující se v biologických systémech (Koppenol 2001, Pacher et al. 2007).

Tyto nestabilní molekuly snadno oxidují makromolekuly jako jsou polynenasycené mastné kyseliny v membránových lipidech, esenciální proteiny a nukleové kyseliny; projevy oxidativního stresu. Při jejich řetězových reakcích mohou vznikat neradikálové molekuly s kovalentní vazbou, ale také jiné radikálové produkty. Bylo prokázáno, že ROS významně přispívají ke vzniku a průběhu řady onemocnění, podporují stárnutí, vznik zánětů, nádorů, neurodegenerativních chorob a kardiovaskulárních poruch (Cai a Harrison 2000, Droge 2002, Paravicini a Touyz 2006, Wilcox 2006, Pacher et al. 2007).

Jelikož jsou ale ROS produkovány v organismu v podstatě nepřetržitě bez poškození buněk, bylo prokázáno, že hrají úlohu v řadě biologických procesů regulujících orgánové funkce. Např. krvinky bílé řady tvoří značné množství ROS, jimiž zabíjejí mikroorganismy, kvasinky, parazity; T-buňky jejich pomocí ničí nádorové buňky, osteoklasty remodelují kost. ROS se uplatňují i při oplodnění vajíčka a v angiogenezi (Reddy 2004, Williams a Kwon 2004, Paravicini a Touyz 2006). V organismu je totiž produkce i účinek ROS udržována v takových mezích, ve kterých není narušena fyziologická činnost zdravých buněk. Tento mechanismus se nazývá integrovaný antioxidační systém a zahrnuje preventivní antioxidanty, které brání vzniku nových reaktivních forem (Berry a Kohen 1999). Jsou to látky vážící přechodné kovy, jako jsou ceruloplasmin, metalothionein, albumin, transferin, ferritin a myoglobin. Hlavní složkou antioxidačního mechanismu jsou odstraňující antioxidanty, které zneškodňují již vytvořené ROS, a tím blokují řetězovou reakci navozenou volnými radikály. Jsou to již zmíněné antioxidační enzymy SOD, kataláza, Gpx, glutathionreduktáza a některé metaloenzymy, ale také redukující sloučeniny jako je vitamin C a E, karotenoidy, glutathion, kyselina močová, bilirubin, flavonoidy. Do tohoto systému lze zahrnout i reparační enzymy, které opravují poškození makromolekul zejména DNA (Sies 1997, Kitiyakara a Wilcox 1998, Bourdon a Blache 2001, Zelko et al. 2002, Paravicini a Touyz 2006).

Role ROS v regulaci renálních funkcí

ROS se všeobecně přičítal významný podíl na tkáňovém poškození zejména při chronických procesech (Rodriguez-Iturbe et al. 2004). Jelikož jsou ROS tvořeny v metabolicky aktivní tkáni takřka nepřetržitě, začala se studovat úloha ROS v regulaci orgánových funkcí. V ledvinách se prokázal vazokonstrikční efekt ROS, ale také jejich vliv na tubulární reabsorpci sodíku, čímž se mohou dlouhodobě uplatnit v regulaci krevního tlaku (Majid a Nishiyama 2002, Lopez et al. 2003, Garvin a Ortiz 2003, Wilcox 2005). Jak již bylo řečeno, nejvíce studovaným ROS je O_2^- , který významně ovlivňuje regulaci renálních funkcí ať už přímým účinkem, jímž způsobuje renální vazokonstrikci (Just et al. 2007) a stimulaci reabsorpce sodíku v tubulech (čímž se podílí na modulaci tubuloglomerulární zpětné vazby) anebo nepřímo jeho interakcí s NO, čímž se snižuje biologická dostupnost NO ve tkáni (Wilcox a Welch 2000, Liu et al. 2004). Bylo prokázáno, že NO hraje důležitou protektivní úlohu proti patofyziologickým účinkům zvýšené aktivity RAS a ROS nejen v ledvinách (Chin et al. 1998, Romero a Reckelhoff 1999, Lopez et al. 2003, Wilcox 2005). Důkazem této důležité interakce je, že inhibice produkce NO v ledvinách zvyšuje aktivitu O_2^- , jenž potencuje vazokonstrikční a antinatriuretický efekt ANG II (Majid et al. 2005). Přestože ANG II stimuluje expresi a aktivitu NOS podněcuje rovněž zvýšenou produkci O_2^- aktivací NADPH oxidázy a zároveň potlačením exprese SOD (Wilcox 2005). Tímto se O_2^- podílí na prohloubení patofyziologických účinků RAS vedoucí k rozvoji hypertenze (Reckelhoff a Romero 2003, Schulman et al. 2005). Nicméně přesné fyziologické a patofyziologické mechanismy těchto interakcí NO, ROS a ANG II v regulaci kardiovaskulárních a renálních funkcí a rozvoji hypertenze nejsou zcela objasněné.

Peroxidu vodíku jakožto přímému produktu degradace O_2^- je věnována také značná pozornost. Studie poukazují na jeho vazokonstrikční a antinatriuretický účinek zejména ve dření ledvin (Chen et al. 2003, Makino et al. 2003). Navíc chronická infuze peroxidu vodíku do ledvinné dřeně zvýšila TK u potkanů (Makino et al. 2003, Taylor a Cowley 2005). Výsledky in vitro studií na izolovaných cévách prokázaly tzv. duální efekt peroxidu vodíku na tonus cév v závislosti na koncentraci a typu cév (Paravicini a Sobey 2003, Thakali et al. 2006, Kang et al. 2007). Problematické nicméně zůstává jak definovat podmínky in vivo, za kterých by peroxid vodíku stimuloval vasodilataci a za kterých vazokonstrikci (Wilcox 2005). Peroxid vodíku se podílí na tkáňovém poškození, funkční přestavbě cév, buněčné apoptóze a zánětu (Paravicini a Touyz 2006), ale navíc bylo prokázáno, že peroxid vodíku může stimulovat expresi NOS a tak zvýšení biologické dostupnosti NO (Drummond et al. 2000, Thomas et al.

2002). Tyto mechanismy, které by mohly plnit jakousi kompenzační úlohu proti zvýšené aktivitě ROS nebo by vedly k patofyziologickému účinku NO při zánětlivých procesech, nejsou stále objasněné.

Studium dalších ROS v regulaci renálních funkcí je problematické vzhledem k jejich nestabilitě, měření tkáňových koncentrací anebo nespecificitě látek umožňujících jejich degradaci. Intenzivnější výzkum probíhá v oblasti regulace vaskulárních a tubulárních funkcí in vitro, jenž se snaží charakterizovat účinky ROS na jednotlivé kompartmenty ledvin (Garvin a Ortiz 2003, Wu a Johns 2004, Abe et al. 2006). Nicméně interpretace výsledků, jež by pak hrály významnou roli v regulaci orgánových funkcí, může být velmi komplikovaná.

Významné experimentální modely pro výzkum oxidativního stresu

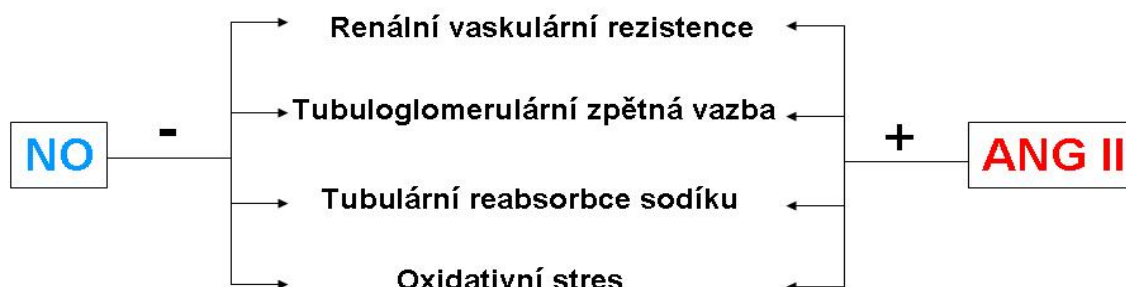
Jelikož aktivita ROS je za fyziologických podmínek udržována na minimální úrovni, je nutné pro studium oxidativního stresu stimulovat produkci ROS nebo zamezit jejich degradaci. Jak již bylo zmíněno, ANG II stimuluje produkci O_2^- a akutní studie prokázaly podíl O_2^- na vazokonstrikční a antinatriuretický efektu ANG II v ledvinách. Zvýšená aktivita O_2^- byla také prokázána při inhibici produkce NO. Přestože přesný mechanismus není zcela objasněn, tyto studie potvrzují ochranný účinek NO proti ROS. Tento mechanismus byl rovněž prokázán ve studiích, ve kterých byla inhibována degradace ROS pomocí diethyldithiokarbamát (DETC), který blokuje funkci SOD. Inhibice SOD v ledvinách vede k renální vazokonstrikci a k antinatriuretickému účinku a tyto účinky jsou potencovány inhibicí NO systému (Majid a Nishiyama 2002, Makino et al. 2003).

U většiny chronických onemocnění byla prokázána zvýšená aktivita ROS. Rovněž ve výzkumu hypertenze a to jak u lidí, tak u experimentálních modelů hypertenze (Touyz 2004). Úloha oxidativního stresu v patogenezi hypertenze byla prokázána celou řadou studií. Navíc se prokázalo, že ROS mohou hypertenzi přímo způsobit. Proto se řada experimentálních modelů využívá ke studiu mechanismů, jimiž ROS ovlivňují regulaci orgánových funkcí vedoucí k rozvoji hypertenze. Navíc se prokazuje benefiční efekt antioxidantů na výši krevního tlaku a orgánového poškození u různých experimentálních modelů hypertenze jako jsou spontánně hypertenzní kmen potkanů, sůl-senzitivní Dahlův kmen a DOCA indukovaný model hypertenze nebo ANG II - dependentních forem hypertenze (Reckelhoff a Romero 2003, Manning et al. 2005, Vaněčková et al. 2005, Wilcox 2005, Kopkan et al. 2006).

Významným modelem pro studium oxidativního stresu je rovněž relativně nový kmen myši, jimž byl vyjmut gen pro extracelulární SOD. Tento model je charakterizován vyšší aktivitou ROS způsobující nižší biologickou dostupnost NO, což se projevuje endotelovou dysfunkcí, mírně zvýšeným TK a tím vyšší vaskulární rezistencí (Jung et al. 2003, Gongora et al. 2006). U těchto myši je rovněž prudší rozvoj ANG II indukované hypertenze (Gongora et al. 2006, Welch et al. 2006).

Význam funkční interakce vazoaktivních systémů v regulaci renálních funkcí

Výše zmíněné vazoaktivní systémy nepůsobí na regulaci orgánových funkcí jednotlivě, nýbrž ve vzájemné interakci k udržení rovnovážného stavu a stálého vnitřního prostředí, jež je optimální pro funkci buněk (Droge 2002). Jak již bylo řečeno, nerovnováha mezi jednotlivými systémy a narušení těchto interakcí vede k rozvoji orgánového poškození (Cai a Harrison 2000, Paravicini a Touyz 2006, Wilcox 2006, Pacher et al. 2007). Jelikož



výše uvedené systémy se významně podílejí na regulaci renálních funkcí, porucha jejich rovnováhy vede k porušení funkce ledvin a k neadekvátnímu vylučování solutů zejména sodíku. Dochází tak k sodíkové retenci a tím i zadržení vody v těle zvyšující TK (Wilcox 2005, Schulman et al. 2005, Majid et al. 2005, Kopkan a Majid 2006). Proto studium fyziologie a patofyziologie jednotlivých systémů a rovněž jejich interakcí může pomoci v pochopení patogeneze kardiovaskulárních a renálních poruch a onemocnění včetně hypertenze.

Vlastní cíle dizertační práce

Z klíčové úlohy ledvin v dlouhodobé regulaci krevního tlaku a tedy i v rozvoji hypertenze je zřejmá nutnost prohloubení znalostí možných mechanismů probíhajících v ledvinách, které se uplatňují v regulaci renálních funkcí a tudíž i krevního tlaku. Hlavním cílem této práce proto bylo zaměřením se na výše zmíněné důležité systémy, které se významně podílejí v regulaci renálních funkcí u různých modelů experimentální hypertenze jako je ANG II indukovaná hypertenze, model hypertenze s deficitem oxidu dusnatého a transgenní model ANG II dependentní hypertenze v prehypertenzní fázi. Tyto studie mají přinést nové poznatky o úloze vazoaktivních působků a jejich možných funkčních interakcích, které ovlivňují jak fyziologické tak patofyziologické procesy v ledvinách, a mohou se tak uplatňovat v regulaci krevního tlaku.

Metodika renální funkční studie s aplikací látek přímo do renální artérie

Studie jsou prováděny podle platných postupů schválených příslušnou institucí podle mezinárodních i národních zákonů v akreditovaných laboratořích. Zvířata v celkové barbiturátové anestézii (pentobarbital, thiopental; 50-60 mg/kg, aplikovaný intraperitoneálně) jsou umístěna na vyhřívaný operační stůl udržující tělesnou teplotu 37-38°C. Je provedena tracheotomie a k tracheální kanyli je přiváděna směs kyslíku a oxidu uhličitého (95/5 %) ke zlepšení dýchání a větší stabilitě krevního tlaku zvířat v anestézii během pokusu (Červenka et al. 1998, Kopkan et al. 2004). Do pravé jugulární žíly je zavedena kanyla (PE-50) umožňující kontinuální infuzi roztoků a přidávání anestetik. Pravá femorální artérie je zakanylována pro kontinuální měření krevního tlaku pomocí systému sběru dat (data-acquisition). Přístup k levé ledvině je přes boční řez břišní stěnou. Ledvina se uvolní z okolní tkáně tak, aby renální cévy byly dobře přístupné, a umístí se do vhodné pozice v plastickém kalíšku. Pomocí katetru PE-10 se zakanyluje levý ureter pro kontinuální sběr moče. Poté se přes levou femorální tepnu a abdominální aortu zavádí ztenčený katetr PE-10, který se pod kontrolou zraku zavádí do levé renální artérie cca 1,5-2 mm tak, aby významně neomezoval průtok krve a umožňoval přímou aplikaci látek do ledviny (Kopkan et al. 2004). Jako doplněk lze na izolovanou renální artérii nasadit ultrazvukovou sondu (Transonic, Ithaca, USA), která slouží k měření aktuálního průtoku krve přiváděné do ledviny.

Po ukončení chirurgické přípravy se začne systémově podávat polyfruktosan inulin a paraaminohipurát sodný v izotonickém roztoku. Z plazmatických a močových koncentrací jsou pak vypočteny clearance těchto látek podle příslušné diurézy, z nichž jsou odvozeny základní hemodynamické parametry jako rychlost glomerulární filtrace a průtok plasmy ledvinou (Červenka et al. 1998). Dále jsou měřeny koncentrace sodíku a draslíku, popřípadě další sloučenin jako je 8-isoprostan jako produkt oxidace kyseliny arachidonové, který je využíván jako ukazatel oxidativního stresu (Romero a Reckelhoff 1999, Kopkan a Majid 2005). Po dosažení rovnovážného stavu a stabilizaci sledovaných funkcí jsou sledovány jednotlivé parametry, ze kterých jsou stanoveny bazální hodnoty renálních funkcí. S těmi jsou následně porovnávány funkční změny navozené farmakologickou intervencí použitou v příslušné studii.

Hlavní výhodou těchto studií je přímá farmakologická intervence danou látkou v ledvině umožňující rychlé dosažení efektivní dávky. Takto zaznamenané funkční změny mohou být především přičteny efektu podané látky. Přestože dochází k vyplavení dané látky z ledviny do oběhu, je vliv dané látky v systémové cirkulaci minimalizován. V našich studiích byly použity látky ovlivňující výši krevního tlaku, nicméně přímá aplikace efektivní dávky do renální artérie neměla významný vliv na krevní tlak. Podávání těchto látek do systémového oběhu by vyžadovalo výrazné zvýšení koncentrací k dosažení efektivní dávky v ledvinách s tím, že daná látka by pak významně ovlivnila systémový krevní tlak. Tyto systémové změny by potom samozřejmě hrály významnou roli v modulaci pozorovaných renálních parametrů.

Hlavní limitací následujících funkčních studií je především anestézie, která může ovlivnit řadu fyziologických procesů v těle. Navíc jsou zvířata zatěžována stresem vycházejícím z chirurgické přípravy na tyto studie. Nicméně tento postup je uniformní pro všechny skupiny zvířat a za těchto podmínek po dosažení rovnovážného stavu a stabilizaci sledovaných funkcí jsou sledovány jednotlivé parametry, ze kterých jsou stanoveny bazální hodnoty renálních funkcí. S těmito parametry jsou následně porovnávány funkční změny navozené farmakologickou intervencí použitou v příslušné studii.

Obecné schéma experimentálního protokolu

Po ukončení ekvilibrační periody (45-50 minut), po kterou jsou stabilizovány monitorované parametry, jsou provedeny dvě kontrolní periody odběru vzorku moče (2x 30 minut), mezi kterými se odebere vzorek arteriální krve. Z těchto vzorků moče a plasmy lze stanovit bazální hodnoty měřených renálních parametrů jako podíl koncentrace dané látky

v moči a v plasmě při zjištěné diuréze za daný časový úsek. Poté je zahájena kontinuální aplikace látek přímo do renální artérie. Po uplynutí vymezeného času (15-20 minut), kdy látka dosáhne renálního řečiště, jsou zahájeny dvě experimentální periody (2x 30 minut), ve kterých se zaznamenávají funkční změny na podávanou látku. Na konci pokusu se opět odebere vzorek krve, poté se provede eutanázie pokusného zvířete velkou dávkou anestetik a ledvina je nakonec vyjmuta a zvážena.

Úloha zvýšené produkce superoxidu v regulaci renálních funkcí u ANG II indukované hypertenze

Důležitá úloha RAS v regulaci renálních funkcí a objemu extracelulární tekutiny je dnes poměrně dobře známa. Navíc bylo potvrzeno, že nepřiměřená aktivace tohoto systému hraje klíčovou úlohu v patofyziologii vzniku hypertenze (Cervenka et al. 1998, Navar et al. 2002, Carey a Siragy 2003). Přestože ANG II není jedinou biologicky aktivní složkou RAS, jeho významné vazomotorické účinky a podíl v regulaci renálních funkcí si stále zasluhují značnou pozornost. Odhalení mechanismů účinku ANG II ať už přímých nebo jeho interakcí s dalšími systémy je důležité pro pochopení nejen fyziologie RAS v těle, ale také patofyziologie rozvoje kardiovaskulárních poruch včetně hypertenze. Pomalá chronická infuze ANG II vede k postupnému rozvoji hypertenze u experimentálních zvířat (Navar et al. 1995). Přestože je tento poměrně jednoduchý model studován už řadu let, všechny patofyziologické mechanismy rozvoje ANG II indukované hypertenze nejsou dodnes zcela objasněné. Podobně jako u jiných experimentálních modelů hypertenze i u tohoto modelu ANG II indukované hypertenze byl prokázán oxidativní stres, který hraje významnou úlohu v patogenezi řady kardiovaskulárních poruch včetně hypertenze (Reckelhoff a Romero 2003). Dnes již není pochyb, že ANG II přímo stimuluje produkci O_2^- zejména aktivací NADPH oxidázy (Paravicini a Sobey 2003). Tento enzym byl izolován z většiny tkání v těle včetně ledvin. Navíc přibývají důkazy o tom, že dochází k poklesu aktivity superoxid dismutázy (SOD), enzymu zodpovědným za degradaci O_2^- na méně reaktivní H_2O_2 , který je štěpen katalázou a glutathion peroxidázou (Cai a Harrison 2000, Reckelhoff a Romero 2003, Wilcox 2005).

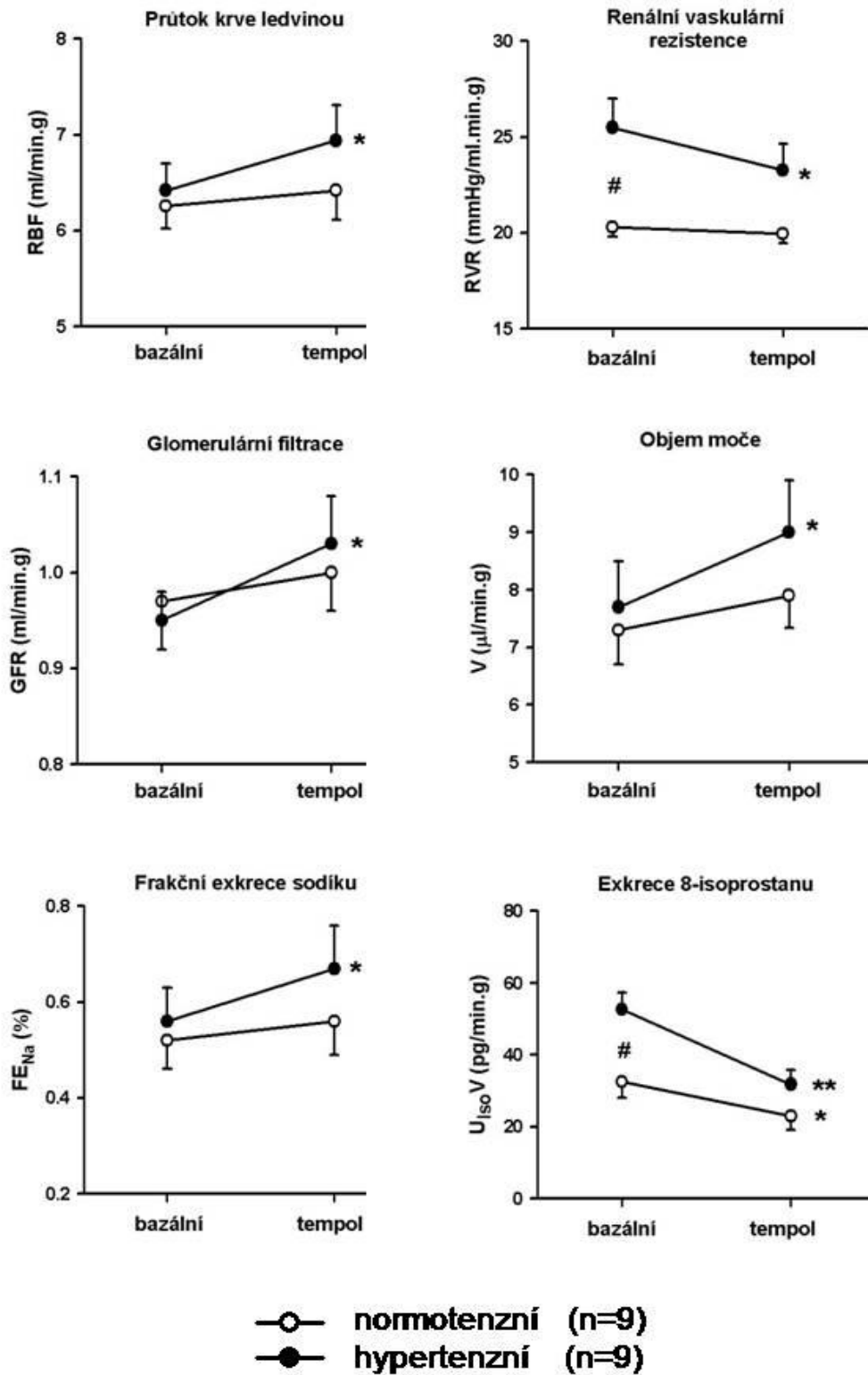
Obecně jsou ROS, a zejména pak O_2^- , součástí buněčného metabolismu, nicméně za podmínek zvýšené produkce a nedostatečné degradace mohou ovlivňovat řadu fyziologických

a také patofyziologických procesů v těle (Cai a Harrison 2000, Pacher et al. 2007). V ledvinách byl prokázán přímý vazokonstrikční a antinatriuretický efekt O_2^- (Majid a Nishiyama 2002). Navíc bylo prokázáno, že O_2^- je alespoň částečně zodpovědný za účinek ANG II, a tím se může významně podílet v patofyziologii ANG II indukované hypertenze (Lopez et al. 2003, Majid et al 2005).

Cílem této studie bylo ověřit hypotézu, zda zvýšený O_2^- ovlivňuje renální hemodynamiku a tubulární funkce vedoucí k retenci sodíku, a tím tak může hrát úlohu v patogenezi ANG II indukované hypertenze. K ověření naší hypotézy byla použita látka zvaná tempol (4-hydroxy-tetramethylpiperidime-1-oxyl), která vykazuje antioxidační vlastnosti. Výhodou této sloučeniny je její nízká molekulová hmotnost, snadná rozpustnost ve vodě, nízká cytotoxicita a dobrá prostupnost přes buněčné membrány (Majid et al. 2004). V této studii byl tempol aplikován kontinuálně v průběhu akutní renální studie v dávce 0,5 mg/min/kg hmotnosti po dobu cca 70 minut potkanům kmene Sprague-Dawley s ANG II indukovanou hypertenzí (pomocí podkožních osmotickým minipump dávkujících 65 ng/min ANG II po 2 týdny) a normotenzním kontrolním potkanů, a to přímo do renální artérie tak aby byl omezen jeho vliv v systémové cirkulaci. Jelikož je tempol označován také jako SOD mimetikum, mohlo by být nevýhodou této látky možné hromadění H_2O_2 ve tkáni díky zvýšené degradaci O_2^- , což by mohlo ovlivnit sledované renální funkce. Proto v další skupině zvířat byl podáván tempol s katalázou (15,000 U/min/kg) tak, aby se rovněž ověřil možný vliv H_2O_2 v regulaci renálních funkcí. Zvolená technika přímé aplikace látek přímo do renální artérie nám umožňuje stanovení renálních funkcí a jejich odpovědi na podanou látku bez významné změny krevního tlaku, jež by mohla ovlivnit sledované renální parametry.

V této studii (Obr. 1) tempol nevykazoval významné funkční změny v ledvině normotenzních kontrolních potkanů což vede k závěru, že u těchto zvířat je O_2^- udržován na minimální úrovni, a tak výrazně neovlivňuje bazální renální funkce. Přestože hodnoty bazálních renálních funkcí kromě renální vaskulární rezistence se u hypertenzních potkanů (střední arteriální tlak 156 ± 5 mmHg) nelišily od normotenzních kontrol (střední arteriální tlak 125 ± 2 mmHg), tempol u nich vyvolal signifikantní zvýšení celkového průtoku krve ledvinou o $9 \pm 2\%$ a snížení renální vaskulární rezistence o $8 \pm 1\%$ bez významného ovlivnění systémového tlaku. Tempol u hypertenzních potkanů rovněž vyvolal zvýšení glomerulární filtrace o $9 \pm 2\%$, tvorbu moče o $17 \pm 4\%$, absolutní sodíkové exkrece o $26 \pm 5\%$ a rovněž frakční exkreci sodíku o $19 \pm 4\%$. Navíc tempol snížil vylučování 8-isoprostanu o $39 \pm 6\%$, které bylo signifikantně zvýšené u hypertenzních zvířat v porovnání s normotenzními. Tento výsledek

Obr. 1: Změny renálních funkcí na podání tempolu u normotenzních a hypertenzních potkanů, jimž byl aplikován ANG II po dobu 2 týdnů.



* $p < 0,05$ vs. bazální hodnoty; # $p < 0,05$ vs. normotenzní skupina

potvrdil vliv zvýšeného O_2^- na regulaci renální hemodynamických a exkrečních funkcí u potkanů s ANG II indukovanou hypertenzí, čímž se může podílet v patogenezi hypertenze u tohoto modelu. Výsledky této studie navíc neprokázaly významnou roli H_2O_2 v regulaci renálních funkcí u tohoto modelu hypertenze, protože kombinace tempolu a katalázy neměla rozdílný renální efekt ve srovnání se změnami vyvolané podáním samotného tempolu i přes významné snížení exkrece H_2O_2 .

O_2^- jako představitel vysoce reaktivních forem kyslíku reaguje s celou řadou endogenních látek často za vzniku dalších radikálů. Jednou z důležitých reakcí je rychlá vazba s NO, čímž se snižuje jejich biologická dostupnost ve tkáních (Cai a Harrison 2000, Wilcox 2005). Přestože jsme v této studii neověřili, zda O_2^- vykazuje přímý vaskulární a tubulární efekt v ledvinách, nebo zda tyto změny byly navozeny zvýšenou dostupností NO v ledvinné tkáni, lze podle předchozích studií usuzovat na sdružený efekt tempolu v ledvinách (Schnackenberg et al 1998, Lopez et al. 2003). Tyto předešlé studie prokázaly jak přímý účinek O_2^- v ledvinách tak jeho vliv na biologickou dostupnost NO ve tkáních, což dokazuje důležité interakce probíhající mezi těmito systémy a ovlivňující regulaci renálních funkcí, což může hrát významnou úlohu v patogenezi hypertenze.

Úloha zvýšené aktivity superoxidu v regulaci renálních funkcí u NO deficitní formy hypertenze

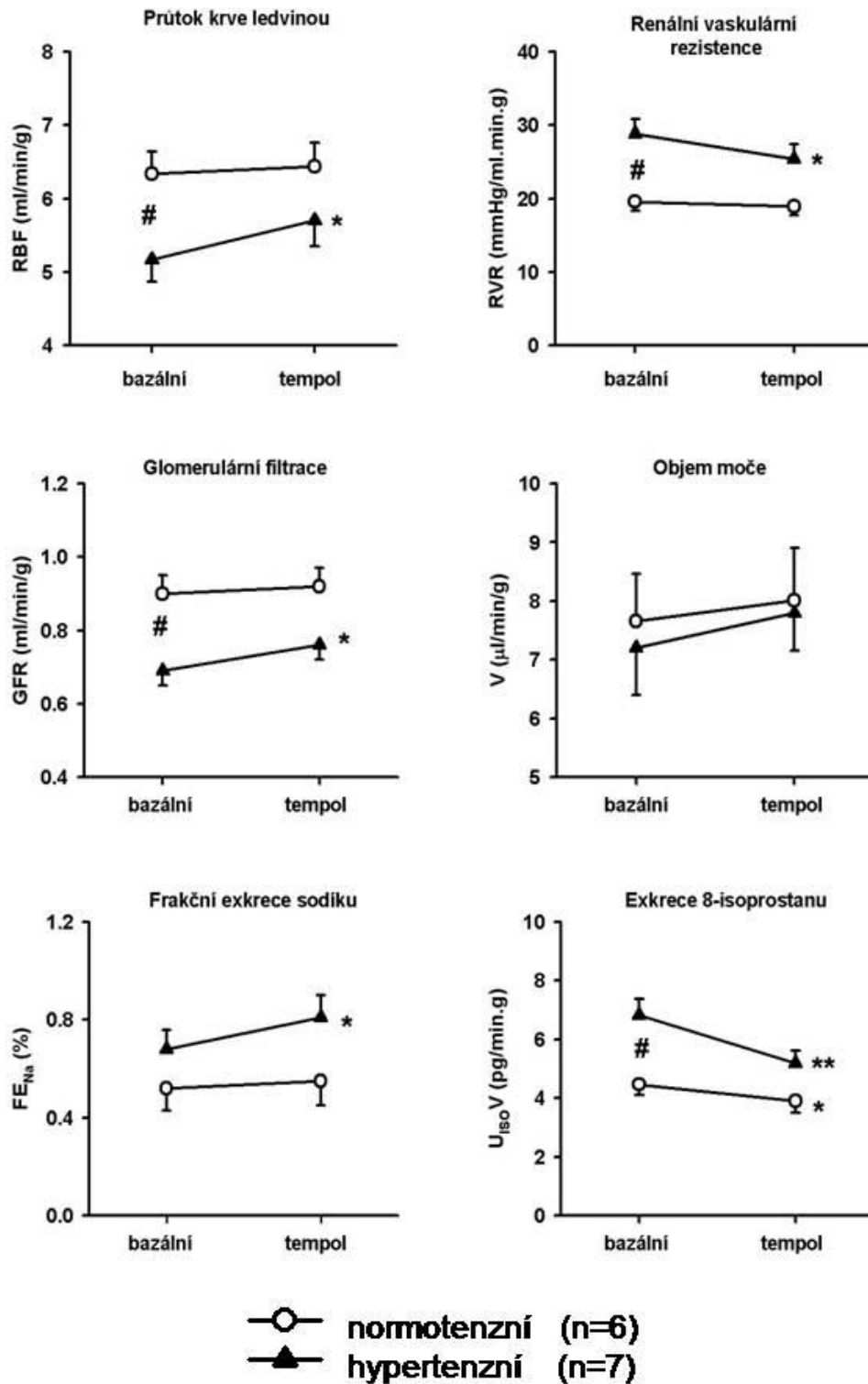
Současná literatura odhaluje zvýšený zájem o významnou úlohu interakce mezi O_2^- a NO v živé tkáni (Cai a Harrison 2000, Reckelhoff a Romero 2003, Wilcox 2005, Majid a Kopkan 2007). Oba tyto nestabilní radikály jsou v metabolicky aktivní tkáni produkovány kontinuálně a jejich protichůdný účinek napovídá významu v regulaci orgánových funkcí, přičemž interakce těchto radikálů vede ke snížení jejich biologické aktivity (Wilcox 2005, Majid a Kopkan 2007). Z toho plyne, že udržování rovnováhy mezi těmito radikály hraje významnou fyziologickou roli v těle a případná nerovnováha může vést k rozvoji orgánových poruch. Řada studií prokázala kritickou spojitost nedostatku NO s poruchou funkce ledvin, ve které se významně uplatňuje oxidativní stres (Wilcox 2005, Kopkan a Majid 2005). K prohloubení poznatků o důležitosti interakce O_2^- a NO v regulaci funkcí ledvin a pochopení možných patofyziologických mechanismů v rozvoji hypertenze byl použit model hypertenze

indukovaný chronickou inhibicí NO syntázy. Tato neselektivní farmakologická inhibice pomocí nitro-L-arginine methylesteru (L-NAME) vede k rozvoji hypertenze a oxidativního stresu (Kopkan a Majid 2005). V této studii byla testována následující hypotéza: zvýšení O_2^- v důsledku deficitu NO ovlivňuje renální hemodynamické a tubulární funkce, čímž dochází k omezení schopnosti ledvin vyloučit příslušné množství soli, a tak hraje úlohu v patogenezi NO deficitní formy hypertenze. Opět byli použiti potkani kmene Sprague-Dawley, kterým byl podáván neselektivní inhibitor NO syntázy L-NAME (15 mg/kg/den) v pitné vodě po dobu čtyř týdnů. Po čtyřech týdnech byly studovány bazální parametry funkce ledvin a renální funkční změny na podání tempolu (0,5 mg/min/kg) po dobu cca 70 minut přímo do renální artérie u těchto hypertenzních zvířat a normotenzních kontrolních potkanů.

Výsledky této studie ukazují, že chronická blokáda produkce NO vede nejen k rozvoji hypertenze (střední arteriální tlak 146 ± 3 mmHg), ale i ke významnému narušení renální hemodynamiky (Obr. 2), což potvrzuje esenciální úlohu NO v regulaci vaskulárního tonu a krevního tlaku (Tolins a Shultz 1994). Nevýznamný vliv tempolu na renální funkce u normotenzních potkanů opět nasvědčuje tomu, že bazální renální funkce jsou jen minimálně ovlivněny O_2^- , tedy za podmínek kde NO systém je plně funkční. Nicméně tempol podávaný do renálního řečiště bez významného vlivu na systémový krevní tlak částečně zlepšil měřené renální parametry u NO deficitních hypertenzních potkanů. Došlo ke zvýšení průtoku krve ledvinou o $10 \pm 2\%$ a snížení renální vaskulární rezistence o $12 \pm 2\%$. Rovněž glomerulární filtrace se zvýšila po podání tempolu o $11 \pm 2\%$. Přestože tvorba moči nedosáhla signifikantního zvýšení ($9 \pm 4\%$), tak absolutní exkrece sodíku se zvýšila o $19 \pm 5\%$ a frakční exkrece sodíku o $11 \pm 4\%$. Tempol také snížil u těchto potkanů vylučování 8-isoprostanu o $24 \pm 4\%$. V průběhu podávání tempolu nedošlo k významným změnám v systémovém arteriálním tlaku u obou skupin - jak normotenzní skupiny (ze 124 ± 2 na 122 ± 3 mmHg), tak u hypertenzní skupiny potkanů (ze 146 ± 2 na 143 ± 3 mmHg), což znamená, že pozorované funkční změny mohou být připsány hlavně podávání tempolu do renálního řečiště. Z těchto výsledků vyplývá, že zvýšená aktivita O_2^- v důsledku inhibice produkce NO významně ovlivňuje renální hemodynamiku a exkreční funkce, čímž může přispívat k omezené schopnosti ledvin vyloučit příslušné množství soli a tím tak hrát úlohu v patogenezi NO deficitní formy hypertenze. Navíc tyto výsledky dokazují důležitou protektivní funkci NO proti oxidativnímu stresu, která je nezbytná pro fyziologickou funkci orgánů včetně ledvin.

Tato studie dále potvrzuje přímý vliv O_2^- na renální funkce, který se výrazně projevuje za nedostatečné produkce NO (Majid a Nishiyama 2002, Majid et al. 2004), což by mohl být

Obr. 2: Změny renálních funkcí na podání tempolu u normotenzních a hypertenzních potkanů, jimž byl podáván L-NAME po dobu 4 týdnů.



*p<0,05 vs. bazální hodnoty; #p<0,05 vs. normotenzní skupina

možný mechanismus podílející se na rozvoji NO deficitní formy hypertenze (Kopkan a Majid 2005). Navíc tato studie dále potvrzuje důležitou úlohu NO v regulaci renálních funkcí a krevního tlaku, který vykazuje významnou organoprotektivní funkci proti vazokonstrikčním agens včetně O_2^- (Chin et al. 1998, López et al. 2003, Vaněčková et al. 2005, Majid et al. 2005). Tyto poznatky podtrhují důležitou roli vazoaktivních systémů ovlivňujících regulaci krevního tlaku a uplatňujících se v rozvoji hypertenze (Kopkan a Majid 2005). Nicméně v této studii nebyla ověřena úloha RAS, který by mohl rovněž hrát významnou úlohu v patogenezi hypertenze u tohoto modelu, což vyplývá ze studií (Scrogin et al. 1998, Okazaki et al. 2006), ve kterých inhibice RAS zmírnila jak rozvoj NO deficitní formy hypertenze tak orgánové poškození.

Úloha zvýšené produkce superoxidu a jeho interakce s NO v regulaci renálních funkcí u prehypertenčních Ren - 2 transgenních potkanů.

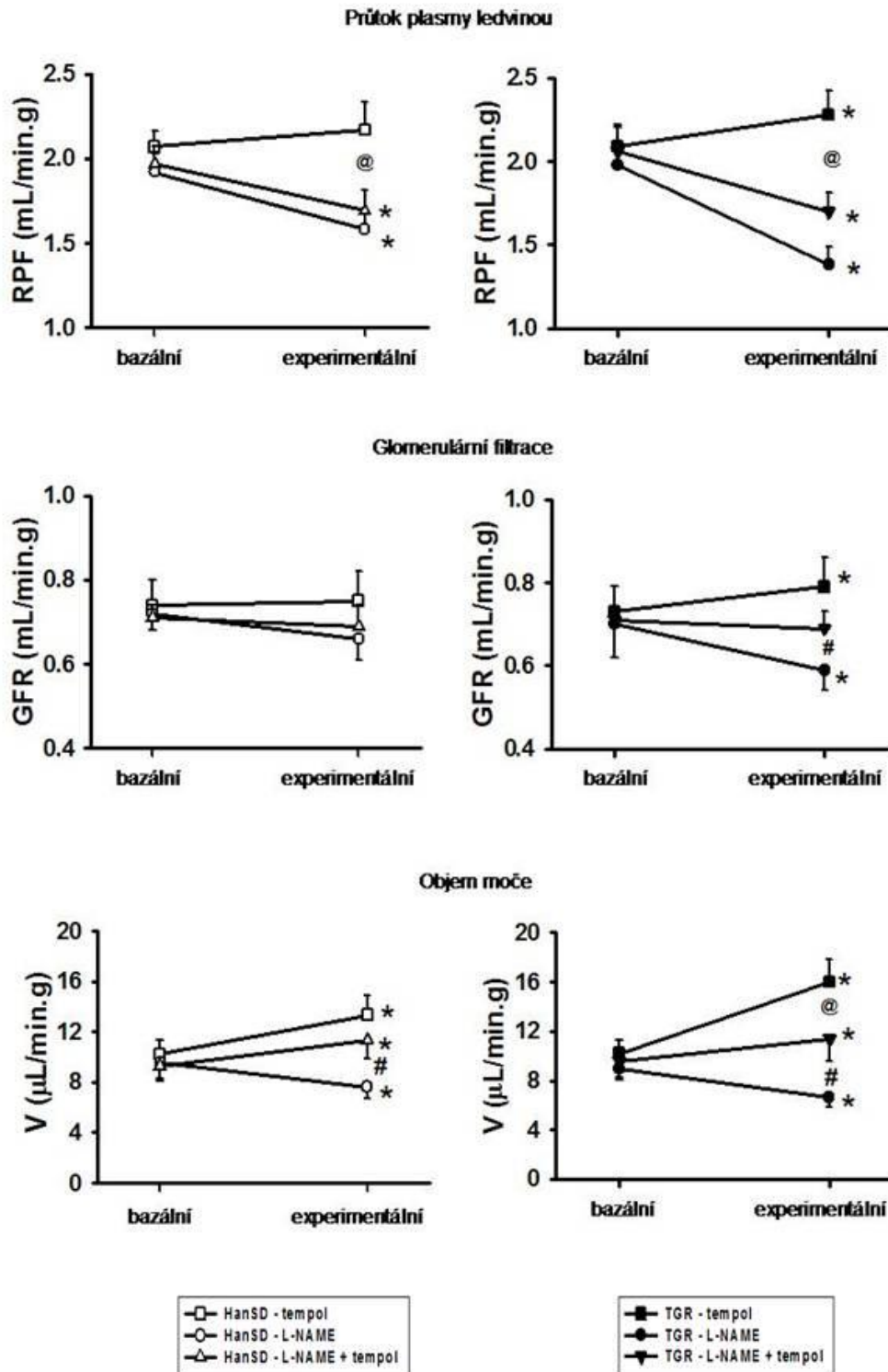
Jako vhodný model k ověření významu interakcí RAS, oxidativního stresu a NO systému ovlivňujících regulaci renálních funkcí byl zvolen kmen transgenních potkanů (TGR), kterým byl do genomu vložen myší reninový gen, označovaný TGR(mRen2)²⁷. Transgen negativní kmen Hannover Sprague-Dawley (HanSD) slouží jako kontrola. U TGR, modelu monogenní hypertenze, dochází k postupnému zvyšování krevního tlaku od 40. dne věku zvířat (Mullins et al. 1990). Navíc bylo potvrzeno, že tato zvířata vykazují zvýšenou hladinu ANG II ještě před vzestupem krevního tlaku, který se uplatňuje jako hlavní činitel v patogenezi této ANG II - dependentní formy hypertenze (Husková et al 2006). Nicméně zvýšený ANG II u TGR indukuje oxidativní stres a zřejmě vede i ke zvýšené produkci NO jako kompenzačního systému proti zvýšené aktivitě vazokonstrikčních agens (Navar et al. 2000, Vaněčková et al. 2005). To naznačuje, že dochází k významným interakcím mezi těmito systémy, jež ovlivňují regulaci renálních funkcí a mohou se tak podílet v rozvoji hypertenze u tohoto modelu. Cílem této studie tedy bylo ověřit hypotézu, zda zvýšená produkce O_2^- indukovaná zvýšeným ANG II ovlivňuje renální hemodynamické a tubulární funkce ať už přímo nebo nepřímo snížením biologické dostupnosti NO ve tkáních u TGR v prehypertenční fázi, a tak může hrát důležitou úlohu v rozvoji hypertenze u toho modelu.

U heterozygotní linie tohoto kmene dochází obvykle k rozvoji hypertenze po 40. dnu věku. V této studii byla proto studována zvířata ve věku 35-36 dnů, to znamená v prehypertenční fázi (střední arteriální tlak 122 ± 3 mmHg). Při srovnání bazálních renálních parametrů nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi TGR a HanSD až na signifikantně zvýšené koncentrace 8-isoprostanu v moči (Obr. 3). V průběhu těchto akutních renálních pokusů byl porovnán funkční účinek aplikovaného tempolu ($1,5$ mg/min/kg) po dobu cca 70 minut přímo do renální artérie s efektem L-NAME (50 μ g/min/kg) a s kombinací L-NAME a tempolu u TGR a HanSD (Obr. 3). Zvolené koncentrace látek podaných do renálního řečiště neměly významný vliv na systémový krevní tlak jak u TGR tak u HanSD potkanů. To znamená, že zjištěné funkční renální změny mohly být přičteny účinku podané látky do renálního řečiště. Samotný tempol nevyvolal významné hemodynamické změny u HanSD, nicméně zvýšil průtok plasmy ledvinou o $10 \pm 3\%$ a glomerulární filtraci o $8 \pm 2\%$ u TGR. Navíc jak diuretický účinek tempolu byl signifikantně výraznější u TGR (zvýšení o $59 \pm 10\%$) ve srovnání s HanSD ($31 \pm 7\%$), tak natriuretický účinek a to na absolutní sodíkovou exkreci ($112 \pm 16\%$ versus $43 \pm 7\%$) i na frakční sodíkovou exkreci ($89 \pm 14\%$ versus $31 \pm 8\%$). Dále pak tempol u TGR významně snížil vylučování 8-isoprostanu o $40 \pm 3\%$. Tyto výsledky potvrzují, že TGR vykazují známky oxidativního stresu a zvýšený O_2^- významně ovlivňuje renální hemodynamické a exkreční funkce u těchto zvířat.

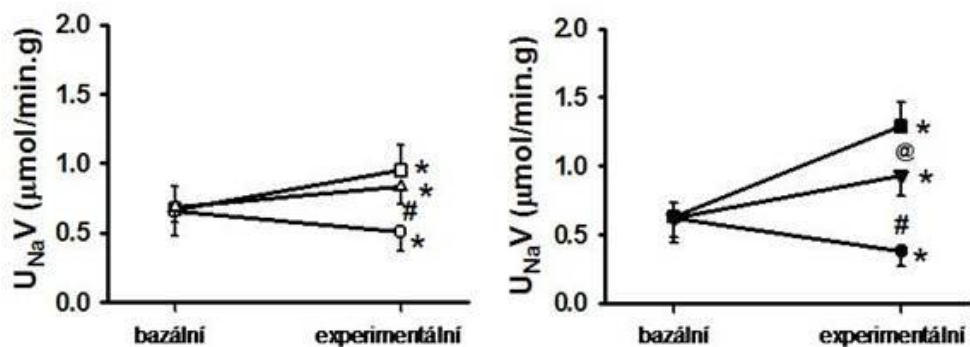
Podle očekávání vyvolalo podání L-NAME renální vazokonstrikci, antidiurézu a antinatriurézu (Majid et al. 1993). L-NAME významně snížilo renální průtok jak u TGR tak u HanSD potkanů, nicméně odpověď na L-NAME byla výrazně větší u TGR ve srovnání s HanSD ($-31 \pm 4\%$ versus $-18 \pm 3\%$). Navíc L-NAME u TGR snížilo glomerulární filtraci o $16 \pm 4\%$, ale u HanSD potkanů nemělo na filtraci významný vliv. Antidiuretický účinek L-NAME byl opět výraznější u TGR než u HanSD potkanů ($-24 \pm 4\%$ versus $-16 \pm 5\%$). Přestože pokles v absolutní exkreci sodíku po podání L-NAME byl rovněž větší u TGR ve srovnání s HanSD potkany ($-39 \pm 6\%$ versus $-21 \pm 4\%$), snížení frakční sodíkové exkrece bylo srovnatelné ($-30 \pm 4\%$ a $-27 \pm 5\%$) právě díky významnému poklesu glomerulární filtrace u TGR. Tyto výsledky ukazují, že NO je nezbytný k udržení normálních renálních funkcí a navíc hraje kompenzační úlohu proti zvýšení vazokonstrikčních faktorů u TGR tak, aby došlo k udržení normálních hodnot renálních funkcí.

K dalšímu ověření funkčních interakcí O_2^- a NO byla zvolena kombinace tempolu a L-NAME. Přestože tempol signifikantně nezmírnil účinek L-NAME na celkový průtok plasmy ledvinou ani u TGR či HanSD potkanů, tempol významně zmírnil pokles glomerulární filtrace

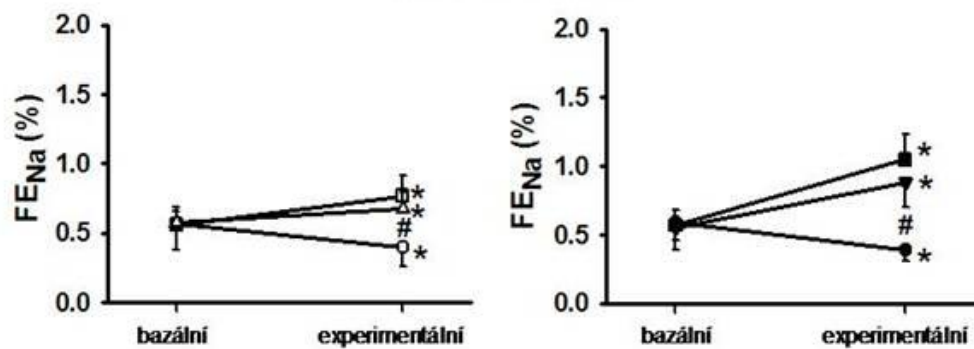
Obr. 3: Změny renálních funkcí na podání tempolu a L-NAME u normotezních transgen-negativních a prehypertenzních transgenických Ren-2 potkanů



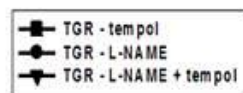
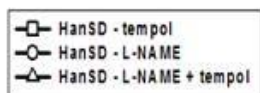
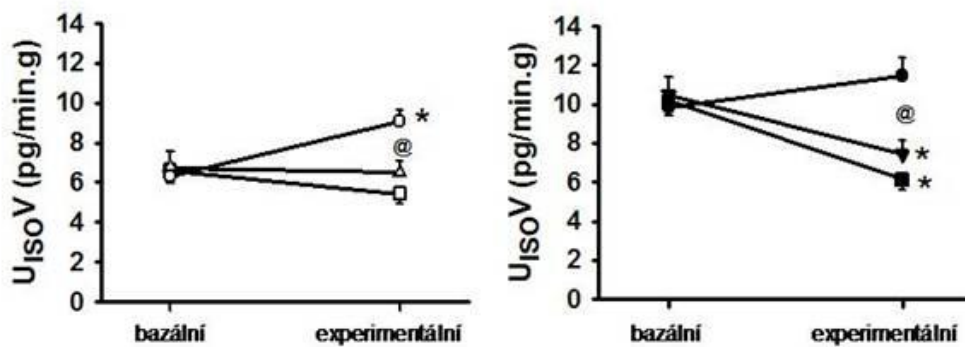
Absolutní exkrece sodíku



Frakční exkrece sodíku



Exkrece 8-isoprostanu



*p<0,05 vs. bazální hodnoty; #p<0,05 vs. L-NAME skupina; @p<0,05 vs. tempol skupina

způsobené L-NAME u TGR ($-2 \pm 3\%$). Navíc tempol zvrátil antidiuretické a antinatriuretické účinky L-NAME u obou skupin potkanů. Tempol také snížil u TGR vylučování 8-isoprostanu o $29 \pm 4\%$ a zabránil vzestupu vylučování 8-isoprostanu u HanSD potkanů v reakci na podávání L-NAME.

Výsledky této studie potvrdily významnou úlohu O_2^- v regulaci renálních funkcí, zejména vliv na tubulární reabsorpci sodíku (Majid a Nishiyama 2002, Majid et al. 2004). Tímto mechanismem by se mohl O_2^- uplatňovat v rozvoji hypertenze. Nicméně zůstává nejasné ve kterém úseku nefronu O_2^- významně ovlivňuje transportní pochody. Dále pak byla opět prokázána esenciální a protektivní úloha NO, který je nezbytný pro udržení normálních renálních funkcí. Navíc ze vzájemné funkční interakce O_2^- a NO lze pochopit její význam v regulaci renálních funkcí s možnými důsledky na dlouhodobou regulaci krevního tlaku. Přestože byla potvrzena důležitá role vzájemné funkční interakce O_2^- a NO uplatňující se v regulaci renálních funkcí, z výsledků této studie nelze určit přesný podíl vlivu těchto radikálů na pozorovaných funkčních změnách. To zůstává významným limitujícím faktorem v přesnější interpretaci dosažených výsledků našich „in vivo“ studiích.

Závěr

Studiem úlohy RAS, systému NO a oxidativního stresu v patogenezi celé řady kardiovaskulárních a renálních poruch se zabývají přední vědecké skupiny na celém světě již řadu let (Cai a Harrison 2000, Navar et al. 2000, Lopez et al 2003, Reckelhoff a Romero 2003, Wilcox 2005, Majid a Kopkan 2007). Přestože bylo zjištěno mnoho nových mechanismů, které významně ovlivňují řadu fyziologických a patofyziologických procesů a uplatňují se jak v jednotlivých systémech, tak v jejich vzájemných interakcích, není tato oblast stále zcela objasněna.

Výsledky našich studií ukazují významný vliv oxidativního stresu, zejména pak O_2^- , v regulaci renálních funkcí, čímž se může uplatňovat v patogenezi různých forem hypertenze ať už to je za podmínek zvýšené aktivity RAS nebo nedostatečné produkce NO. Navíc potvrzují význam funkčních interakcí mezi jednotlivými vazoaktivními systémy, které při vzájemné rovnováze udržují správnou funkci orgánů. Proto pochopení těchto fyziologických a patofyziologických mechanismů nachází uplatnění nejen v dalším studiu patogeneze kardiovaskulární a renálních poruch včetně hypertenze.

Samozřejmě že tato práce neobsáhla další důležité vazoaktivní systémy, které se rovněž významně podílejí na regulaci orgánových funkcí s úzkým vztahem k fyziologii a patofyziologii kardiovaskulárních a renálních poruch. Rovněž celá řada dalších systémů je v přímé interakci se systémy zmiňovanými v této práci, a proto jim bude věnována pozornost v dalších studiích.

Literatura

1. Abe M, O'Connor P, Kaldunski M, Liang M, Roman RJ, Cowley AW Jr. Effect of sodium delivery on superoxide and nitric oxide in the medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291:F350-7.
2. Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW. Autoregulation of blood flow in the rat kidney. *Am J Physiol*. 1975; 228:127-133.
3. Bader M, Zhao Y, Sander M, Lee MA, Bachmann J, Bohm M, Djavidani B, Peters J, Mullins JJ, Ganten D. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. *Hypertension*. 1992; 19:681-6.
4. Bagnall NM, Dent PC, Walkowska A, Sadowski J, Johns EJ. Nitric oxide inhibition and the impact on renal nerve-mediated antinatriuresis and antidiuresis in the anaesthetized rat. *J Physiol*. 2005; 569:849-56.
5. Beierwaltes WH, Potter DL, Shesely EG. Renal baroreceptor-stimulated renin in the eNOS knockout mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 282:F59-64.
6. Berry EM, Kohen R. Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Med Hypotheses*. 1999; 53:397-401.
7. Bishop A, Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*. 2005; 208:193-205.
8. Boric MP, Bravo JA, Corbalan M, Vergara C, Roblero JS. Interactions between bradykinin and ANP in rat kidney in vitro: inhibition of natriuresis and modulation of medullary cyclic GMP. *Biol Res*. 1998; 31:281-9.
9. Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2001; 3:293-311.
10. Briggs JP, Schnermann J. Macula densa control of renin secretion and glomerular vascular tone: evidence for common cellular mechanisms. *Ren Physiol*. 1986; 9:193-203.
11. Brown L, Sernia C. Angiotensin receptors in cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994;21:811-8.
12. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000; 87:840-4.
13. Campbell DJ. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35:784-91.
14. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003; 24:261-71.
15. Carmines PK, Navar LG. Disparate effects of Ca channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to ANG II. *Am J Physiol*. 1989; 256:F1015-20.

16. Carmines, PK, Inscho EW, and Gensure RC. Arterial pressure effects on preglomerular microvasculature of juxtamedullary nephrons. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1990; 258: F94-F102.
17. Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Nitric oxide-induced interstrand cross-links in DNA. *Chem Res Toxicol*. 2003; 16:571-4.
18. Cervenka L, Kramer HJ, Maly J, Heller J. Role of nNOS in regulation of renal function in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2001; 38:280-5.
19. Cervenka L, Kramer HJ, Maly J, Vaneckova I, Backer A, Bokemeyer D, Bader M, Ganten D, Mitchell KD. Role of nNOS in regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res*. 2002; 51:571-80.
20. Cervenka L, Mitchell KD, Navar LG. Renal function in mice: effects of volume expansion and angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*. 1999a; 10:2631-6.
21. Cervenka L, Wang CT, Mitchell KD, Navar LG. Proximal tubular angiotensin II levels and renal functional responses to AT1 receptor blockade in nonclipped kidneys of Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*. 1999b; 33:102-7.
22. Cervenka L, Wang CT, Navar LG. Effects of acute AT1 receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats. *Am J Physiol*. 1998; 274:F940-5.
23. Cowley AW Jr, Skelton MM, Merrill DC. Osmoregulation during high salt intake: relative importance of drinking and vasopressin secretion. *Am J Physiol*. 1986; 251:R878-86.
24. Dawson VL. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995; 22:305-8.
25. Defendini R, Zimmerman EA, Weare JA, Alhenc-Gelas F, Erdos EG. Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. *Neuroendocrinology*. 1983; 37:32-40.
26. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci*. 2001; 100:481-92.
27. Dobrowolski L, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Kuczeriszka M, Sadowski J. Effects of ATP on rat renal haemodynamics and excretion: role of sodium intake, nitric oxide and cytochrome P450. *Acta Physiol*. 2007; 189:77-85.
28. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82:47-95.
29. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*. 2000; 86:347-54.
30. Dvorak P, Kramer HJ, Backer A, Maly J, Kopkan L, Vaneckova I, Vernerova Z, Opocensky M, Tesar V, Bader M, Ganten D, Janda J, Cervenka L. Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res*. 2004; 27:248-58.

31. Engler S, Paul M, Pinto YM. The TGR(mRen2)²⁷ transgenic rat model of hypertension. *Regul Pept.* 1998; 77:3-8.
32. Evans RG, Majid DS, Eppel GA. Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32:400-9.
33. Ferrario CM, Averill DB, Brosnihan KB, Chappell MC, Iskandar SS, Dean RH, Diz DI. Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int.* 2002; 62:1349-57.
34. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289:H2281-90.
35. Fleming I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res.* 2006; 98:887-96.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:373-6.
37. Garvin JL. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat proximal straight tubules. *J Am Soc Nephrol.* 1991; 1:1146-52.
38. Garvin JL, Ortiz PA. The role of reactive oxygen species in the regulation of tubular function. *Acta Physiol Scand.* 2003; 179:225-32.
39. Goldblatt H. Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. *Circulation.* 1958; 17:642-7.
40. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.* 1934; 59:347-79.
41. Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* 2006; 48:473-81.
42. Granger JP. Pressure natriuresis. Role of renal interstitial hydrostatic pressure. *Hypertension.* 1992; 19:19-17.
43. Granger JP, Alexander BT. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168:161-8.
44. Granger JP, Schnackenberg CG. Renal mechanisms of angiotensin II-induced hypertension. *Semin Nephrol.* 2000; 20:417-25.
45. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57:707-36.
46. Gross JM, Dwyer JE, Knox FG. Natriuretic response to increased pressure is preserved with COX-2 inhibitors. *Hypertension.* 1999; 34:1163-7.
47. Guyton AC. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol.* 1990a; 259:R865-77.

48. Guyton AC. Renal function curves and control of body fluids and arterial pressure. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1990b; 591:107-13.
49. Guyton AC. Blood pressure control - special role of the kidneys and body fluids. *Science.* 1991; 252:1813-6.
50. Guzik TJ, Korbit R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003; 54: 469-87.
51. Hall JE, Brands MW, Shek EW. Central role of the kidney and abnormal fluid volume control in hypertension. *J Hum Hypertens.* 1996; 10:633-9.
52. Hall JE, Guyton AC, Coleman TG, Mizelle HL, Woods LL. Regulation of arterial pressure: role of pressure natriuresis and diuresis. *Fed Proc.* 1986; 45:2897-903.
53. Harding JW, Wright JW, Swanson GN, Hanesworth JM, Krebs LT. AT₄ receptors: specificity and distribution. *Kidney Int.* 1994; 46:1510-2.
54. Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS. Immunohistochemical localization of ANG II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol.* 1997; 273:F170-7.
55. Heller J, Horacek V. Autoregulation of renal blood flow in the rat. *Pflugers Arch.* 1977; 370:81-5.
56. Huskova Z, Kramer HJ, Vanourkova Z, Cervenka L. Effects of changes in sodium balance on plasma and kidney angiotensin II levels in anesthetized and conscious Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens.* 2006; 24:517-27.
57. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61:2728-37.
58. Chappell MC, Diz DI, Yunis C, Ferrario CM. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl.* 1998; 68:S3-6.
59. Chen YF, Cowley AW Jr, Zou AP. Increased H₂O₂ counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285:R827-33.
60. Chin SY, Wang CT, Majid DS, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol.* 1998; 274: F876-82.
61. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84:9265-9.
62. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53:503-14.
63. Ichihara A, Inscho EW, Imig JD, Navar LG. Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. *Am J Physiol.* 1998; 274: F516–F524.

64. Juncos LA, Garvin J, Carretero OA, and Ito S. Flow modulates myogenic responses in isolated microperfused rabbit afferent arterioles via endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 95:2741-2748.
65. Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2003; 93: 622–629.
66. Just A, Arendshorst WJ. Dynamics and contribution of mechanisms mediating renal blood flow autoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285:R619-31.
67. Just A, Olson AJ, Whitten CL, Arendshorst WJ. Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:H83-92.
68. Kaloyanides GJ, Dibona GF, Bastron RD. Effect of blood volume expansion on tubule sodium transport in the isolated dog kidney. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975; 148:765-73.
69. Kang KT, Sullivan JC, Sasser JM, Imig JD, Pollock JS. Novel nitric oxide synthase-dependent mechanism of vasorelaxation in small arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 2007 ; 49:893-901.
70. Kantachavesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I, Kotelevtsev Y, Mullins JJ. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem.* 2001; 276:36727-33.
71. Kitiyakara C, Wilcox CS. Antioxidants for hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998;7:531-8.
72. Komers R, Oyama TT, Chapman JG, Allison KM, Anderson S. Effects of systemic inhibition of neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Hypertension.* 2000; 35:655-61.
73. Kone, BC, and Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997; 272: F561-F578.
74. Kopkan L, Castillo A, Navar LG, Majid DS. Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290:F80-6.
75. Kopkan L, Kramer HJ, Huskova Z, Vanourkova Z, Backer A, Bader M, Ganten D, Cervenka L. Plasma and kidney angiotensin II levels and renal functional responses to AT(1) receptor blockade in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens.* 2004; 22:819-25.
76. Kopkan L, Kramer HJ, Huskova Z, Vanourkova Z, Skaroupkova P, Thurmova M, Cervenka L. The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens.* 2005; 23:1531-9.
77. Kopkan L, Majid DS. Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension.* 2005; 46:1026-31.
78. Kopkan L, Majid DS. Enhanced superoxide activity modulates renal function in NO-deficient hypertensive rats. *Hypertension.* 2006; 47:568-72.

79. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep.* 2001; 6:229-34.
80. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science.* 1992; 258:1861.
81. Leonard AM, Chafe LL, Montani JP, Van Vliet BN. Increased salt-sensitivity in endothelial nitric oxide synthase-knockout mice. *Am J Hypertens.* 2006; 19:1264-9.
82. Liard JF, Cowley AW Jr, McCaa RE, McCaa CS, Guyton AC. Renin, aldosterone, body fluid volumes, and the baroreceptor reflex in the development and reversal of Goldblatt hypertension in conscious dogs. *Circ Res.* 1974; 34:549-60.
83. López B, Salom MG, Arregui B, Valero F, Fenoy FJ. Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension.* 2003; 42:1150-6.
84. Liu R, Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole. *Kidney Int.* 2004; 66:268-74.
85. Magaldi AJ, Cesar KR, de Araujo M, Simoes e Silva AC, Santos RA. Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch.* 2003; 447:223-30.
86. Majid DS, Kopkan L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34:946-52.
87. Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the mediation of pressure natriuresis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24:595-9.
88. Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens.* 2001; 14:74S-82S.
89. Majid DS, Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension.* 2002; 39:293-7.
90. Majid DSA, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287: R27-32.
91. Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric oxide synthase inhibition in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288: F412-419.
92. Majid DS, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. *Am J Physiol.* 1993; 264:F79-87.
93. Makino A, Skelton MM, Zou AP, Cowley AW Jr. Increased renal medullary H₂O₂ leads to hypertension. *Hypertension.* 2003; 42:25-30.
94. Makino A, Skelton MM, Zou AP, Roman RJ, Cowley AW Jr. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension.* 2002; 39:667-72.
95. Manning RD Jr, Tian N, Meng S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. *Am J Nephrol.* 2005; 25:311-7.

96. Marks LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension*. 1979; 1:384-8.
97. Massion PB, Balligand JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol*. 2003; 546:63-75.
98. Mattson DL, Lu S, Nakanishi K, Papanek PE, Cowley AW Jr. Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure. *Am J Physiol*. 1994; 266:H1918-26.
99. Mattson DL, Maeda CY, Bachman TD, Cowley AW Jr. Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. *Hypertension*. 1998; 31:15-20.
100. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292:C82-97.
101. Meister B, Lippoldt A, Bunnemann B, Inagami T, Ganten D, Fuxe K. Cellular expression of angiotensin type-1 receptor mRNA in the kidney. *Kidney Int*. 1993; 44:331-6.
102. Mitchell KD, Bagatell SJ, Miller CS, Mouton CR, Seth DM, Mullins JJ. Genetic clamping of renin gene expression induces hypertension and elevation of intrarenal Ang II levels of graded severity in Cyp11a1-Ren2 transgenic rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006; 7:74-86.
103. Mitchell KD, Mullins JJ. ANG II dependence of tubuloglomerular feedback responsiveness in hypertensive ren-2 transgenic rats. *Am J Physiol*. 1995; 268:F821-8.
104. Mitchell KD, Navar LG. Enhanced tubuloglomerular feedback during peritubular infusions of angiotensins I and II. *Am J Physiol*. 1988; 255:F383-90.
105. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*. 1999; 277:F437-46.
106. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans*. 1989; 17:642-4.
107. Moncada S. Nitric oxide. *J Hypertens Suppl*. 1994; 12:S35-9.
108. Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, Gaffen ZA, Hart SL. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol*. 1993;108:296-7.
109. Moore LC, Casellas D. Tubuloglomerular feedback dependence of autoregulation in rat juxtamedullary afferent arterioles. *Kidney Int* 1990; 37:1402-1408.
110. Moreno C, Maier KG, Hoagland KM, Yu M, Roman RJ. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Am J Hypertens*. 2001; 14:90S-97S.
111. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*. 1990; 344:541-4.
112. Murad F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol*. 1994; 26:19-33.

113. Navar LG. The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am.* 1997; 81:1165-98.
114. Navar LG. Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics. *Am J Physiol.* 1998; 274:F433-44.
115. Navar, LG, Bell PD, and Burke TJ. Role of a macula densa feedback mechanism as a mediator of renal autoregulation. *Kidney Int Suppl* 1982; 12: S157-S164.
116. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD. Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10 Suppl 12:S266-72.
117. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension.* 2002; 39:316-22.
118. Navar LG, Ichihara A, Chin SY, Imig JD. Nitric oxide-angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168:139-47.
119. Navar LG, Von Thun AM, Zou L, el-Dahr SS, Mitchell KD. Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension. *Blood Press Suppl.* 1995; 2:88-92.
120. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol Sci.* 1998; 13:170-176.
121. Nguyen G. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007; 16:129-33.
122. Nishiyama A, Majid DS, Walker M 3rd, Miyatake A, Navar LG. Renal interstitial atp responses to changes in arterial pressure during alterations in tubuloglomerular feedback activity. *Hypertension.* 2001; 37:753-9.
123. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension.* 2002; 39:129-34.
124. Okazaki H, Minamino T, Tsukamoto O, Kim J, Okada K, Myoishi M, Wakeno M, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Angiotensin II type 1 receptor blocker prevents atrial structural remodeling in rats with hypertension induced by chronic nitric oxide inhibition. *Hypertens Res.* 2006; 29:277-84.
125. Ollerstam A, Pittner J, Persson AE, Thorup C. Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1997; 99:2212-8.
126. Opocensky M, Dvorak P, Maly J, Kramer HJ, Backer A, Kopkan L, Vernerova Z, Tesar V, Zima T, Bader M, Ganten D, Janda J, Vaneckova I. Chronic endothelin receptor blockade reduces end-organ damage independently of blood pressure effects in salt-loaded heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res.* 2004; 53:581-93.
127. Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284:R628-38.

128. Osborn JL. Relation between sodium intake, renal function, and the regulation of arterial pressure. *Hypertension*. 1991; 17:191-6.
129. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. 1997; 30:1238-46.
130. Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Siragy HM, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Carey RM. Intrarenal aminopeptidase N inhibition augments natriuretic responses to angiotensin III in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. *Hypertension*. 2007; 49:625-30.
131. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007; 87:315-424.
132. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524-6.
133. Paravicini TM, Sobey CG. Cerebral vascular effects of reactive oxygen species: recent evidence for a role of NADPH-oxidase. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30:855-9.
134. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006; 71:247-58.
135. Patzak A, Persson AE. Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007; 16:46-51.
136. Paul RV, Kirk KA, Navar LG. Renal autoregulation and pressure natriuresis during ANF-induced diuresis. *Am J Physiol*. 1987; 253:F424-31.
137. Persson PB, Ehmke H, Kogler U, Kirchheim H. Modulation of natriuresis by sympathetic nerves and angiotensin II in conscious dogs. *Am J Physiol*. 1989; 256:F485-9.
138. Ploth DW. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension. *Am J Physiol*. 1983; 245:F131-41.
139. Raij L. Workshop: hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. *Hypertension*. 2001; 37:767-73.
140. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12:157-62.
141. Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284:R893-912.
142. Reddy SV. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004; 14:255-70
143. Ren YL, Garvin JL, Ito S, Carretero OA. Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney Int*. 2001; 60:1676-83.
144. Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 286:F606-16.
145. Roman RJ, Cowley AW Jr. Characterization of a new model for the study of pressure-natriuresis in the rat. *Am J Physiol*. 1985; 248:F190-8.

146. Romero JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 1999; 34:943-9.
147. Rothe CF, Nash FD, Thompson DE. Patterns in autoregulation of renal blood flow in the dog. *Am J Physiol*. 1971; 220:1621-6.
148. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruperez M, Sanchez-Lopez E, Rodriguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15:159-66.
149. Sander M, Bader M, Djavidani B, Maser-Gluth C, Vecsei P, Mullins J, Ganten D, Peters J. The role of the adrenal gland in hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27. *Endocrinology*. 1992; 131:807-14.
150. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 2000; 91:45-62.
151. Scrogin KE, Hatton DC, Chi Y, Luft FC. Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. *Am J Physiol*. 1998; 274:R367-74.
152. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:4095-8.
153. Schnackenberg CG, Wilkins FC, Granger JP. Role of nitric oxide in modulating the vasoconstrictor actions of angiotensin II in preglomerular and postglomerular vessels in dogs. *Hypertension*. 1995; 26:1024-9.
154. Schnermann J, Levine DZ. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65:501-29.
155. Schulman IH, Zhou MS, Raj L. Nitric oxide, angiotensin II, and reactive oxygen species in hypertension and atherogenesis. *Curr Hypertens Rep*. 2005; 7:61-7.
156. Sibony M, Gasc JM, Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Corvol P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension*. 1993; 21:827-35.
157. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997; 82:291-5.
158. Siragy HM, Xue C, Abadir P, Carey RM. Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation. *Hypertension*. 2005; 45:133-7.
159. Smith O. Nobel Prize for NO research. *Nat Med*. 1998; 4:1215.
160. Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology*. 1995; 86 Suppl 1:2-8.
161. Taylor NE, Cowley AW Jr. Effect of renal medullary H₂O₂ on salt-induced hypertension and renal injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289:R1573-9.
162. Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2006; 47:482-7.

163. Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277:6017-24.
164. Thomsen LL, Olesen J. Nitric oxide theory of migraine. *Clin Neurosci.* 1998; 5:28-33.
165. Tolins JP, Shultz PJ. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int.* 1994; 46:230-6.
166. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44:248-52.
167. Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci.* 2006; 102:147-54.
168. Vallon V, Traynor T, Barajas L, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:1599-606.
169. Vaneckova I, Kramer HJ, Novotna J, Kazdova L, Opocensky M, Bader M, Ganten D, Cervenka L. Roles of nitric oxide and oxidative stress in the regulation of blood pressure and renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res.* 2005; 28:117-26.
170. Vaneckova I, Kunes J, Jelinek J. Function of the isolated perfused kidneys from young or adult rats with post-DOCA-salt hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1999; 21:407-21.
171. Vanourkova Z, Kramer HJ, Huskova Z, Vaneckova I, Opocensky M, Chabova VC, Tesar V, Skaroupkova P, Thumova M, Dohnalova M, Mullins JJ, Cervenka L. AT1 receptor blockade is superior to conventional triple therapy in protecting against end-organ damage in Cyp1a1-Ren-2 transgenic rats with inducible hypertension. *J Hypertens.* 2006; 24:2465-72.
172. Walker M 3rd, Harrison-Bernard LM, Cook AK, Navar LG. Dynamic interaction between myogenic and TGF mechanisms in afferent arteriolar blood flow autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279:F858-65.
173. Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol.* 1996; 271:F143-9.
174. Wang W, Mitra A, Poole B, Falk S, Lucia MS, Tayal S, Schrier R. Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice exhibit increased susceptibility to endotoxin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 287:F1044-8.
175. Welch WJ, Chabrashvili T, Solis G, Chen Y, Gill PS, Aslam S, Wang X, Ji H, Sandberg K, Jose P, Wilcox CS. Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response. *Hypertension.* 2006; 48:934-41.
176. Wilcox CS. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1998; 7:443-9.

177. Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289:R913-35.
178. Wilcox CS. Special feature: cardiovascular-kidney interactions in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290:R34-6.
179. Wilcox CS, Welch WJ. Interaction between nitric oxide and oxygen radicals in regulation of tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168:119-24.
180. Williams MS, Kwon J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37:1144-51.
181. Wink DA, Mitchell JB: Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
182. Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA. The sources of oxidative stress in the vessel wall. *Kidney Int.* 2005; 67:1659-61.
183. Wu XC, Johns EJ. Interactions between nitric oxide and superoxide on the neural regulation of proximal fluid reabsorption in hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2004; 89:255-61.
184. Xie QW, Leung M, Fuortes M, Sassa S, Nathan C. Complement analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:4891-6.
185. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension.* 1996; 27:1165-72.
186. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:337-49.
187. Zou LX, Imig JD, von Thun AM, Hymel A, Ono H, Navar LG. Receptor-mediated intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II-infused rats. *Hypertension.* 1996; 28:669-77.

PŘÍLOHY – odborné publikace

1. **Kopkan L**, Castillo A, Navar LG, Majid DS. Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290:F80-86.
2. **Kopkan L**, Majid DS. Enhanced superoxide activity modulates renal function in NO-deficient hypertensive rats. *Hypertension*. 2006; 47:568-572.
3. **Kopkan L**, Husková Z, Vanourková Z, Thumová M, Skaroupková P, Cervenka L, Majid DS. Superoxide and its interaction with nitric oxide modulates renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens*. 2007; 25:2257-2265.

Libor Kopkan, Alexander Castillo, L. Gabriel Navar and Dewan S. A. Majid

Am J Physiol Renal Physiol 290:80-86, 2006. First published Aug 16, 2005;

doi:10.1152/ajprenal.00090.2005

You might find this additional information useful...

This article cites 37 articles, 30 of which you can access free at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/290/1/F80#BIBL>

This article has been cited by 1 other HighWire hosted article:

Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide

A. Just, A. J. M. Olson, C. L. Whitten and W. J. Arendshorst

Am J Physiol Heart Circ Physiol, January 1, 2007; 292 (1): H83-H92.

[Abstract] [Full Text] [PDF]

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/290/1/F80>

Additional material and information about *AJP - Renal Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajprenal>

This information is current as of December 7, 2007 .

Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats

Libor Kopkan, Alexander Castillo, L. Gabriel Navar, and Dewan S. A. Majid

Department of Physiology, Tulane Hypertension and Renal Center of Excellence,
Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana

Submitted 7 March 2005; accepted in final form 8 August 2005

Kopkan, Libor, Alexander Castillo, L. Gabriel Navar, and Dewan S. A. Majid. Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F80–F86, 2006. First published August 16, 2005; doi:10.1152/ajprenal.00090.2005.—This study was performed to examine the role of superoxide formation in the regulation of renal hemodynamic and excretory function and to assess its contribution in the pathogenesis of ANG II-dependent hypertension. Renal responses to acute intra-arterial infusion of the O_2^- scavenger tempol ($50 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100 \text{ g body wt}^{-1}$) with or without catalase ($1,500 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$; both native and polyethylene glycol-catalase), which reduces H_2O_2 , were evaluated in anesthetized male Sprague-Dawley rats treated chronically with ANG II (65 ng/min) for 2 wk and compared with nontreated control rats. In ANG II-treated hypertensive rats, tempol caused increases in medullary ($13 \pm 2\%$), cortical ($5 \pm 2\%$), and total renal blood flow ($9 \pm 2\%$) without altering systemic arterial pressure. There were also increases in glomerular filtration rate ($9 \pm 2\%$), urine flow ($17 \pm 4\%$), and sodium excretion ($26 \pm 5\%$). However, tempol infusion in nontreated normotensive rats did not cause significant changes in any of these renal parameters. Coinfusion of catalase with tempol did not alter the responses observed with tempol alone, indicating that the observed renal responses to tempol in ANG II-treated rats were attributed to its O_2^- scavenging effects without the involvement of H_2O_2 . Tempol infusion also significantly decreased 8-isoprostane excretion in ANG II-treated rats ($39 \pm 6\%$) without changes in H_2O_2 excretion. However, coinfusion of catalase reduced H_2O_2 excretion in both ANG II-treated ($41 \pm 6\%$) and nontreated rats ($28 \pm 5\%$). These data demonstrate that enhanced generation of O_2^- modulates renal hemodynamic and tubular reabsorptive function, possibly leading to sodium retention and thus contributing to the pathogenesis of ANG II-induced hypertension.

superoxide; angiotensin II

ANG II IS A powerful vasoconstrictor and biological hypertensive agent contributing importantly to the regulation of renal function and blood pressure (21, 27, 34). Chronic administration of a low dose of ANG II, which does not cause increases in blood pressure acutely, leads to the progressive development of hypertension (5, 9, 33) and an increase in oxidative stress (27, 34). Elevated intrarenal ANG II levels cause alterations in renal function, leading to sodium retention and thus contributing to the development and maintenance of hypertension (9, 33, 38). It has been proposed that the vasoconstrictor and hypertensive effects of ANG II are due, in part, to increases in the production of superoxide (O_2^-) via activation

of NADPH oxidase, which is an important enzymatic source of O_2^- in the body (2, 26).

As a highly reactive agent, O_2^- interacts with many endogenous substances, in particular with nitric oxide (NO), which acts as an antioxidant by reducing O_2^- levels (17). It is also degraded by superoxide dismutase (SOD) enzyme to form H_2O_2 (25). O_2^- oxidizes arachidonic acid nonenzymatically to generate free isoprostanes that are recognized as markers for increased endogenous O_2^- activity (6, 10, 17, 28). One of them, 8-isoprostane was demonstrated to be higher in both plasma and urine samples from hypertensive rats induced by ANG II (2, 28) or endothelin (31), as well as spontaneously hypertensive rats (SHR; see Ref. 30), compared with normotensive control rats. Generally, O_2^- is involved in cellular signaling in a variety of tissues under normal and in pathological conditions, where its inappropriate generation may contribute to the pathophysiology of hypertension. Recent reports support a direct renal vasoconstrictor and antinatriuretic effect of O_2^- in vivo (15, 16, 18) as well as an effect on sodium transport in vitro (23). These results suggest an integral role of O_2^- in regulation of kidney function in hypertension associated with elevated levels of ANG II.

In the present study, we examined the hypothesis that ANG II-induced O_2^- generation influences renal vascular and tubular function, leading to sodium retention, and thus plays a role in the pathogenesis of hypertension. We evaluated the renal functional responses to a O_2^- scavenger, tempol (4-hydroxy-tetramethylpiperidime-1-oxyl), infused directly in the left renal artery of anesthetized male Sprague-Dawley rats treated chronically with ANG II. Normal Sprague-Dawley rats served as control animals. Tempol is a low-molecular-weight nitroxide compound that is membrane permeable and that reduces endogenous O_2^- levels, as shown by many in vitro and in vivo studies (3, 15, 17, 18, 29). Because it has been suggested that administration of tempol may enhance the H_2O_2 level in the kidney (4, 19), we also evaluated the responses to coinfusion of catalase with tempol to delineate between the effects resulting from scavenging of O_2^- from those due to possible enhancement of H_2O_2 during administration of tempol. In these experiments, native catalase, which is poorly cell permeable, and the more cell-permeable polyethylene glycol (PEG) catalase were used to readily reduce H_2O_2 to water and thus minimize the action of H_2O_2 in the tissue (25). Intra-arterial administration of drugs was made directly in the kidney, allowing determination of their direct renal effects without alterations in blood pressure (12).

Address for reprint requests and other correspondence: D. S. A. Majid, Dept. of Physiology, SL 39, Tulane Univ. Health Sciences Center, 1430 Tulane Ave., New Orleans, LA 70112 (e-mail: majid@tulane.edu).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

METHODS

Animal preparation. The study was performed in male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) in accordance with the guidelines and practices established by the Tulane University Animal Care and Use Committee. After 3 days acclimation, rats (220–250 g) were randomly divided into nontreated groups and ANG II-treated groups. ANG II-treated rats were implanted with osmotic minipumps (model 2002; Alzet, Cupertino, CA) subcutaneously under anesthesia (pentobarbital sodium, 50 mg/kg ip; Sigma, St. Louis, MO). The osmotic minipumps were employed for chronic continuous infusion of a low dose of synthetic ANG II (Sigma) at a rate of 65 ng/min, which leads to the progressive development of hypertension during the course of 2 wk (2, 5, 34). In the present study, nontreated control groups were not implanted with the minipumps, since previous studies have reported that sham-operated (implanted minipump with saline) control rats do not show any differences in systemic and renal parameters compared with nonimplanted control groups (5, 36). Systolic blood pressure (SBP) was measured one time every 2–3 days by tail-cuff plethysmography to monitor blood pressure changes during a 2-wk period before acute experiments.

At the end of 2 wk of chronic ANG II treatment, acute clearance experiments were performed to determine renal responses to tempol and catalase in anesthetized (pentobarbital sodium, 50 mg/kg ip) ANG II-infused hypertensive and nontreated normotensive rats. The right jugular vein was catheterized for intravenous administration of solutions. The right femoral artery was cannulated to allow continuous monitoring of arterial blood pressure (AcqKnowledge data acquisition system; Biopac) and blood sampling. The left kidney was exposed via a flank incision and placed in a Lucite cup, and the ureter was cannulated with a PE-10 catheter for urine collection. A tapered PE-10 catheter was inserted in the renal artery via the left femoral artery to allow intra-arterial administration of drugs directly in the kidney (12). This catheter was kept patent by a continuous infusion of heparinized isotonic saline at a rate of 5 μ l/min throughout the experiment.

An ultrasonic flow probe (Transonic System) was placed on the left renal artery to measure total renal blood flow (RBF). Laser-Doppler needle flow probes (500 μ m OD; Periflex 4001; Perimed) were used to measure the relative changes in cortical (CBF) and medullary (MBF) blood flow, as reported earlier (5). Zero flow was determined when the renal artery was completely occluded at the end of the experiment.

Experimental protocol. Acute experiments were conducted in the following groups of rats: A) a nontreated normotensive group with 1) vehicle (saline) infusion ($n = 8$); 2) tempol infusion ($n = 9$); and 3) tempol + native catalase coinfusion ($n = 6$) or B) ANG II-treated hypertensive groups receiving 4) vehicle infusion ($n = 9$); 5) tempol infusion ($n = 9$); 6) tempol + native catalase coinfusion ($n = 6$); and 7) tempol + PEG-catalase coinfusion ($n = 4$).

After 60-min stabilization, the experimental protocol was started with a 30-min control clearance period to assess baseline control values of renal hemodynamic and excretory parameters. Next the intra-arterial infusion of tempol was given for 75 min to determine renal functional responses during drug administration. After the initiation of tempol infusion, an equilibration 15-min period was allowed before two 30-min clearance experimental periods in these experiments. Tempol (Sigma Chemical) was infused at a dose 50 μ g \cdot min⁻¹ \cdot 100 g body wt⁻¹. This dose of tempol was selected based on findings in our earlier acute studies in dogs (17, 18) that showed significant reductions in urinary 8-isoprostane excretion rate (U_{IsoV} ; marker for endogenous O_2^- activity). Catalase (both native and PEG form; Sigma Chemical) was coinfused with tempol at a rate of 1500 U \cdot min⁻¹ \cdot 100 g body wt⁻¹ (11, 24). At the midpoint of the clearance collection period, an arterial blood sample was collected from the femoral arterial cannula to measure plasma inulin and sodium concentrations.

Urine volume was measured gravimetrically. Plasma and urine sodium and potassium concentrations were determined by flame photometry, and inulin concentrations were measured colorimetrically to determine glomerular filtration rate (GFR). Renal vascular resistance (RVR) and fractional sodium excretion (FE_{Na}) were calculated according to standard formulas. The enzyme immunoassay kit was used to measure urinary 8-isoprostane concentration (Assay Design, Ann Arbor, MI; see Refs. 17 and 18). Urinary H_2O_2 concentration was measured by colorimetric assay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI; see Refs. 13 and 18).

Data are expressed as means \pm SE. Statistical comparisons between control and experimental values in the same group were conducted by paired Student's *t*-test. Statistical comparisons among the groups were conducted by two-way ANOVA for repeated measurements, followed by the Newman-Keuls test. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Chronic infusion of a prolonged low dose of ANG II caused a slow progressive increase of SBP from 132 ± 7 to 188 ± 9 mmHg ($n = 28$; $P < 0.001$) during the 2-wk period of ANG II administration compared with normotensive nontreated rats in which SBP was not changed (134 ± 6 to 137 ± 7 mmHg; $n = 23$). These results are similar to those reported in previous studies (5, 33, 38).

In acute experiments in anesthetized animals, baseline values of mean arterial pressure (MAP), renal hemodynamics, and excretory parameters were assessed in all groups during the control period. Baseline MAP and RVR were significantly higher in ANG II-treated hypertensive rats and than in normotensive rats (156 ± 5 vs. 125 ± 2 mmHg and 25 ± 2 vs. 20 ± 1 mmHg \cdot ml⁻¹ \cdot min \cdot g, respectively). However, there were no significant differences in other renal parameters in either hypertensive or normotensive rats. Intra-arterial infusion of vehicle (saline) did not change MAP and renal function in either time control normotensive or hypertensive rats.

Renal hemodynamic and excretory responses to intra-arterial infusion of tempol. In normotensive rats, tempol infusion did not cause significant changes in RBF and RVR (Fig. 1). In contrast, tempol significantly increased RBF ($\Delta 9 \pm 2\%$; $P < 0.05$) and decreased RVR ($\Delta 8 \pm 1\%$; $P < 0.05$) in the ANG II-infused hypertensive groups (Fig. 1). As shown in Fig. 2, CBF and MBF were not changed significantly during infusion of tempol in normotensive rats. In hypertensive rats, tempol did not cause many changes in CBF [$\Delta 5 \pm 2\%$; $P =$ not significant (NS); Fig. 2A] but caused a significant increase in MBF ($\Delta 13 \pm 2\%$; $P < 0.05$; Fig. 2B). As shown in Fig. 3A, GFR was not significantly altered by tempol in normotensive rats; however, it was significantly increased ($\Delta 9 \pm 2\%$; $P < 0.05$) in the hypertensive rats during tempol infusion. Likewise, urine flow (V) responses to tempol were increased significantly ($\Delta 17 \pm 4\%$; $P < 0.05$) only in the hypertensive rats but not in normotensive rats (Fig. 3B). Similar responses were also observed for sodium excretion (U_{NaV} ; Fig. 4). In normotensive rats, tempol did not significantly affect absolute or FE_{Na} . However, in hypertensive rats, there were significant increases in both U_{NaV} ($\Delta 26 \pm 5\%$; $P < 0.05$) and FE_{Na} ($\Delta 19 \pm 4\%$; $P < 0.05$) during tempol infusion.

During administration of tempol in the renal artery, it was possible that some degree of spillover in the systemic circulation occurred. We did not measure other parameters, indicating extrarenal actions of tempol; however, there was minimal

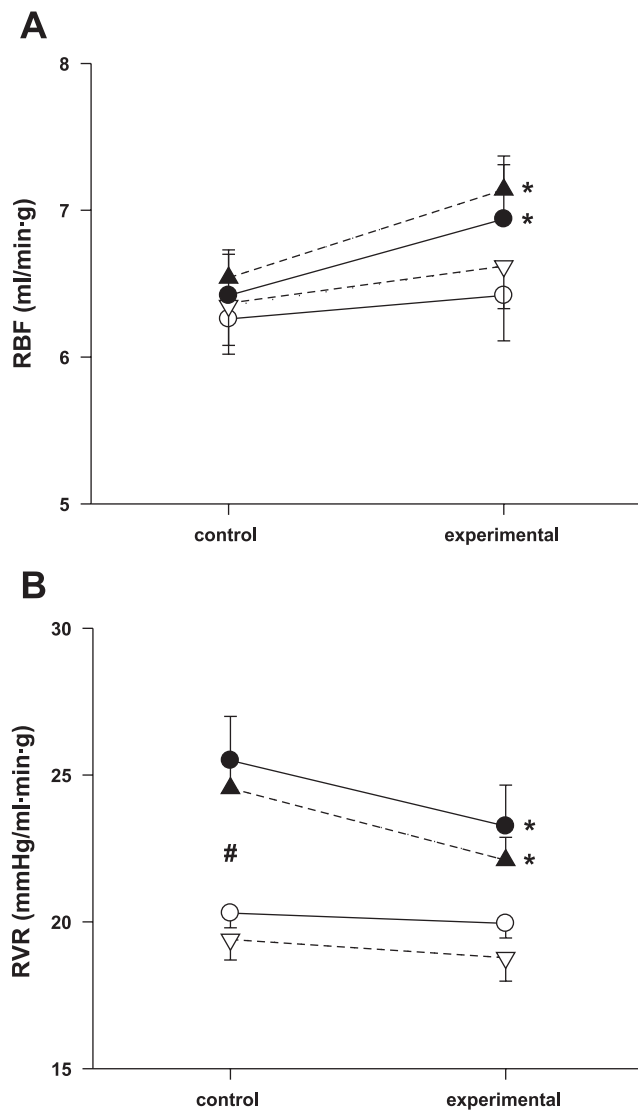


Fig. 1. Renal blood flow (RBF; A) and renal vascular resistance (RVR; B) responses to intra-arterial infusion of tempol in normotensive (○; $n = 9$) and ANG II-treated hypertensive (●; $n = 9$) rats and coinfusion of tempol + catalase in normotensive (▽; $n = 6$) and hypertensive (▲; $n = 10$) rats. $P < 0.05$ vs. corresponding control values (*) and vs. values in normotensive rats (#).

effect of intrarenal tempol administration on systemic arterial pressure either in normotensive control (126 ± 2 to 124 ± 3 mmHg; $P = \text{NS}$) or in ANG II-induced hypertensive (157 ± 5 to 152 ± 5 mmHg; $P = \text{NS}$) rats in the present study.

Renal hemodynamic and excretory responses to intra-arterial infusion of tempol + catalase. The observed renal responses to tempol infusion alone in both hypertensive and normotensive rats were not significantly altered by coadministration of catalase in these rats (Figs. 1–4). Renal hemodynamic and excretory responses to coinfusion of native catalase with tempol were similar to those observed during PEG-catalase with tempol in the experiments conducted in hypertensive rats. Table 1 provides the comparison of the responses to native catalase and PEG-catalase given with tempol in ANG II-induced hypertensive rats. These responses were not significantly different from each other; therefore, data were com-

pared for the presentations in Figs. 1–5. In ANG II-infused rats, there were decreases in RVR (Fig. 1B) and increases in RBF (Fig. 1A), MBF (Fig. 2B), GFR (Fig. 3A), V (Fig. 3B), $U_{\text{Na}}V$, and FE_{Na} (Fig. 4) during coadministration of tempol and catalase. CBF was not significantly increased in response to coadministration of tempol and catalase. MAP also remained unaltered during intra-arterial infusion of tempol + catalase in normotensive (123 ± 2 to 122 ± 2 mmHg; $P = \text{NS}$) and in hypertensive (154 ± 3 to 151 ± 2 mmHg; $P = \text{NS}$) animals.

Urinary excretion rate of 8-isoprostane and H_2O_2 responses to tempol and tempol + catalase coinfusion. As shown in Fig. 5A, basal control values of the $U_{\text{Iso}}V$ were significantly higher in hypertensive rats compared with normotensive rats. Tempol infusion decreased $U_{\text{Iso}}V$ significantly ($\Delta -39 \pm 6\%$; $P < 0.01$) in hypertensive rats, and the similar reductions were observed during coinfusion of tempol and catalase in hypertensive rats. There were also decreases in $U_{\text{Iso}}V$ ($\Delta -24 \pm 5\%$; $P < 0.05$) in normotensive rats during tempol administration; however, the magnitude was smaller than that in hypertensive rats. Basal control urinary H_2O_2 excretion rates ($U_{H_2O_2}V$) were not different between normotensive and hypertensive groups of rats (Fig. 5B). In both hypertensive and normotensive rats, infusion of tempol alone did not cause any significant changes

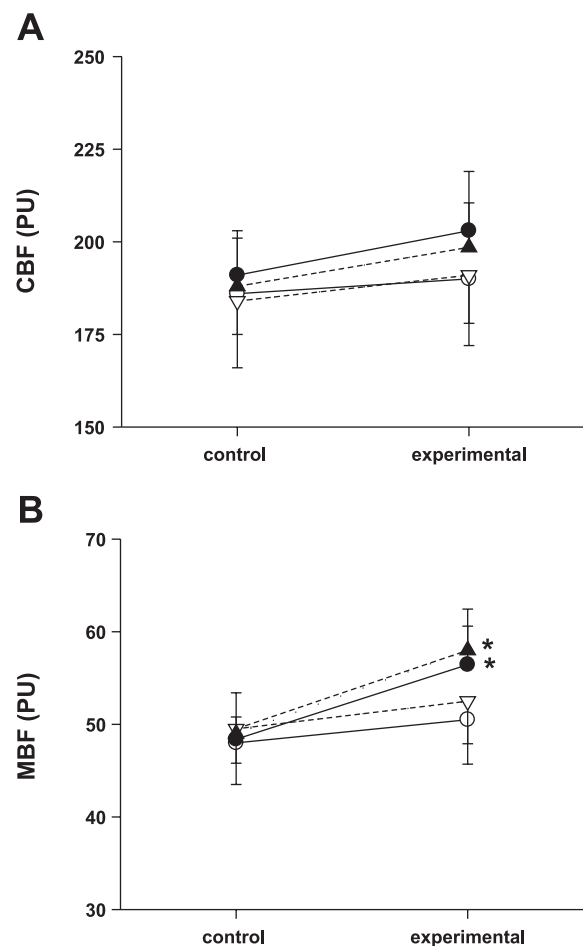


Fig. 2. Cortical blood flow (CBF; A) and medullary blood flow (MBF; B) responses to intra-arterial infusion of tempol in normotensive (○; $n = 9$) and hypertensive (●; $n = 9$) rats and coinfusion of tempol + catalase in normotensive (▽; $n = 6$) and hypertensive (▲; $n = 10$) rats. PU, perfusion units. $*P < 0.05$ vs. corresponding control values.

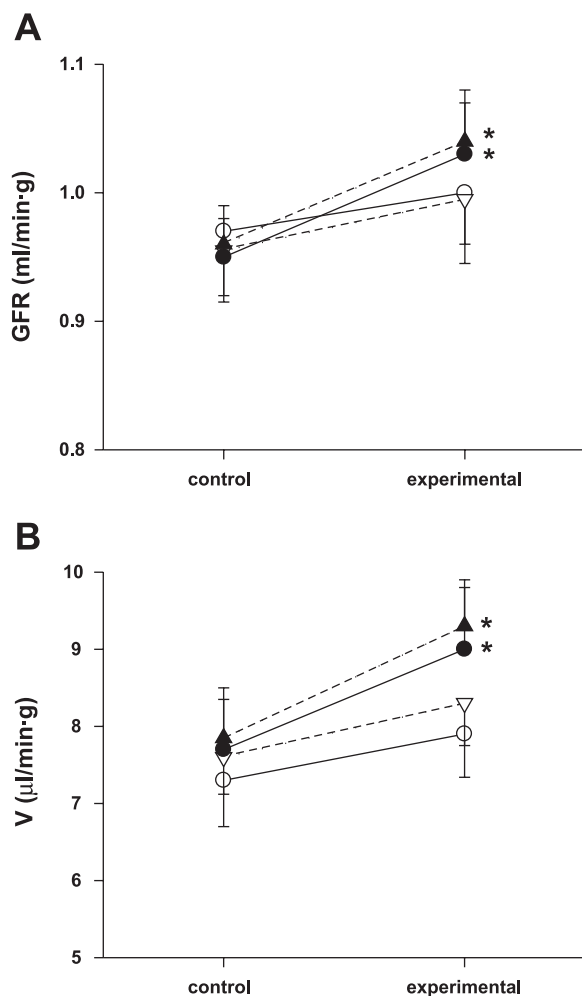


Fig. 3. Glomerular filtration rate (GFR; A) and urine flow (V; B) responses to intra-arterial infusion of tempol in normotensive (○; $n = 9$) and hypertensive (●; $n = 9$) rats and coinfusion of tempol + catalase in normotensive (▽; $n = 6$) and hypertensive (▲; $n = 10$) rats. * $P < 0.05$ vs. corresponding control values.

in $U_{H_2O_2}V$. However, coinfusion of catalase with tempol led to significant decreases in $U_{H_2O_2}V$ in both hypertensive rats ($\Delta -41 \pm 6\%$; $P < 0.05$) and normotensive rats ($\Delta -28 \pm 5\%$; $P < 0.05$), as shown in Fig. 5B.

DISCUSSION

In this present investigation, we assessed renal hemodynamic and excretory responses to tempol, a O_2^- scavenging agent administered directly in the renal artery, in ANG II-induced hypertensive rats. Intra-arterial administration of tempol allowed us to evaluate its direct effect in the kidney without appreciable changes in blood pressure that are usually associated with systemic administration of tempol, as reported earlier (22, 29, 34). To our knowledge, no previous study except a recent investigation by Welch et al. (34) addressed this specific issue of determining the role of O_2^- in the modulation of renal function in ANG II-induced hypertension. However, the study of Welch et al. (34) used chronic treatment of tempol, which was associated with marked reduction in arterial pressure and thus complicated the proper assessment of direct O_2^- scavenging effects on renal function. In the present study, tempol was

infused directly in the renal artery, which minimized its effects on systemic blood pressure and thus allowed more direct assessment of the responses to O_2^- scavenging on renal hemodynamics and excretory function. It was observed that acute administration of tempol caused significant increases in RBF, GFR, V, and $U_{Na}V$ in ANG II-induced hypertensive rats but not in normotensive control rats. Acute administration of tempol ameliorated the chronic ANG II-induced increases in $U_{Iso}V$ (marker for endogenous O_2^- activity; Fig. 5A), indicating that O_2^- activity is increased in these ANG II-treated rats, as reported previously (2, 28). Prolonged administration of tempol in ANG II-induced hypertensive rats was also shown to ameliorate the enhanced renal cortical NADPH oxidase activity as well as mRNA and protein expression for p22^{phox} subunits of NADPH oxidase (34). Increases in RBF, GFR, and $U_{Na}V$ in response to tempol in ANG II-treated rats indicate that enhanced O_2^- production in these animals modulates renal function. An antinatriuretic effect of acute administration of ANG II was also shown to be partly mediated by concomitant generation of O_2^- (15, 18). Thus these present data indicate that

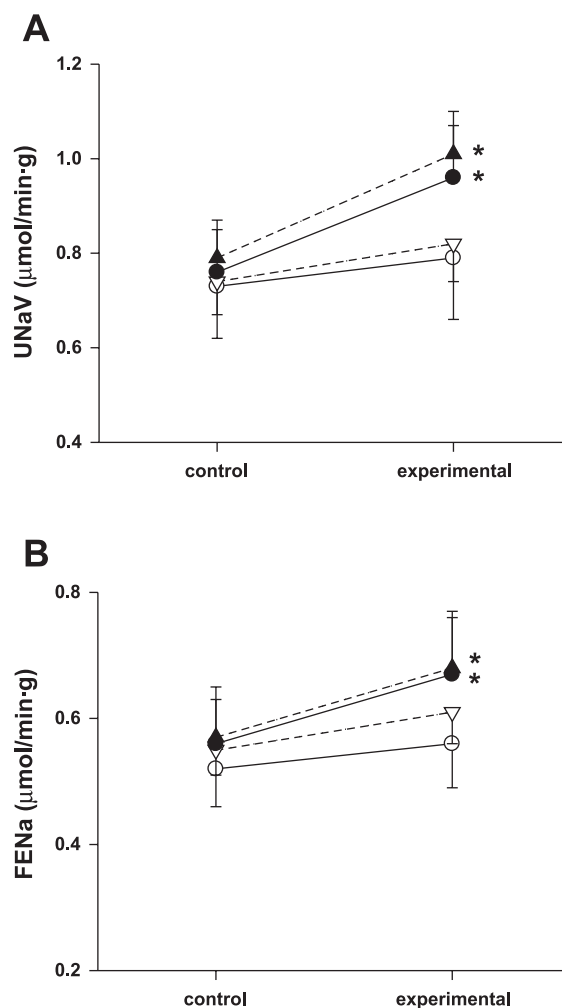


Fig. 4. Absolute sodium excretion ($U_{Na}V$; A) and fractional sodium excretion ($FENa$; B) responses to intra-arterial infusion of tempol in normotensive (○; $n = 9$) and hypertensive (●; $n = 9$) rats and coinfusion of tempol + catalase in normotensive (▽; $n = 6$) and hypertensive (▲; $n = 10$) rats. * $P < 0.05$ vs. corresponding control values.

Table 1. Comparison of the responses to native catalase and PEG-catalase coinfusion with tempol in ANG II-infused hypertensive rats

Parameter	Native Catalase + Tempol			PEG-Catalase + Tempol		
	Control	Experimental	Δ , %	Control	Experimental	Δ , %
MAP, mmHg	155 \pm 3	152 \pm 2	-2 \pm 1	152 \pm 2	150 \pm 2	-1 \pm 1
RVR, mmHg \cdot ml $^{-1}$ \cdot min \cdot g	25 \pm 1	22 \pm 1	-11 \pm 2	24 \pm 1	20 \pm 1	-11 \pm 2
RBF, ml \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$	6.36 \pm 0.28	6.94 \pm 0.36	10 \pm 2	6.61 \pm 0.18	7.24 \pm 0.19	9 \pm 2
CBF, perfusion units	186 \pm 14	197 \pm 12	6 \pm 3	191 \pm 18	199 \pm 14	5 \pm 2
MBF, perfusion units	47 \pm 3	55 \pm 3	16 \pm 3	51 \pm 3	59 \pm 5	15 \pm 4
GFR, ml \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$	0.96 \pm 0.05	1.05 \pm 0.05	10 \pm 2	0.94 \pm 0.02	1.01 \pm 0.03	7 \pm 2
V, μ l \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$	7.68 \pm 0.43	9.02 \pm 0.45	18 \pm 3	7.87 \pm 0.69	8.94 \pm 0.74	14 \pm 2
U _{Na} V, μ mol \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$	0.77 \pm 0.12	0.98 \pm 0.13	29 \pm 5	0.83 \pm 0.11	0.83 \pm 0.11	23 \pm 3
FE _{Na} , %	0.55 \pm 0.09	0.64 \pm 0.09	20 \pm 4	0.58 \pm 0.07	0.67 \pm 0.08	15 \pm 4
U _{H₂O₂} V, nmol \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$	2.8 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3	-44 \pm 9	2.4 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	-39 \pm 6

Values are means \pm SE; $n = 6$ rats in native catalase group and 4 rats in polyethylene glycol (PEG)-catalase group. MAP, mean arterial pressure; RVR, renal vascular resistance; RBF, renal blood flow; CBF, cortical blood flow; MBF, medullary blood flow; GFR, glomerular filtration rate; V, urine flow; U_{Na}V, absolute sodium excretion; FE_{Na}, fractional sodium excretion, U_{H₂O₂}V, urinary hydrogen peroxide excretion rate. The responses to native catalase with tempol were not significantly different from those of PEG-catalase with tempol. Because the responses were similar, data were combined for presentation in Figs. 1–5.

ANG II-induced hypertension could be, at least in part, the result of the sodium-retaining effect of enhanced O₂⁻ activity.

It could be argued that a possible increase in intrarenal H₂O₂ concentration during tempol administration (4, 19) influenced the observed changes in renal function in this study. Although we did not measure the tissue level of H₂O₂ in the kidney, the present results demonstrate that U_{H₂O₂}V was not altered during acute tempol administration in these rats. Previous studies also reported that tempol treatment acutely in dogs (18) or chronically in rats (13) did not alter U_{H₂O₂}V. It was also shown that chronic tempol treatment did not alter U_{H₂O₂}V in rats with normal salt intake but only in rats that were given a high-salt diet (35). However, in our earlier study (13), we have observed that high-salt intake alone in rats increased U_{H₂O₂}V but not because of chronic administration of tempol. It is also known that as a modulatory agent, tempol can enhance heme proteins' catalase-like activity, facilitating degradation of H₂O₂ (14). Supporting evidence from in vitro studies indicates that tempol decreased rather than increased H₂O₂ in renal proximal tubule cell cultures and moreover protected the cells against the cytotoxic effects of H₂O₂ (3, 8). Another point also needs to be considered that, although a modest change in renal medullary tissue concentration of H₂O₂ during tempol administration was reported earlier (4, 19), the effects of such changes in H₂O₂ on renal function are yet to be clearly defined. H₂O₂ was shown to act as a vasoconstrictor in renal medulla (4), but it has also been described as a vasodilator in renal cortical microcirculations (1). In the present study, cotreatment of catalase (both native and the PEG form) with tempol, although it caused significant reduction in U_{H₂O₂}V, did not lead to any differences in the responses of renal hemodynamics and excretory function caused by tempol treatment alone. Thus the present findings do not support a significant involvement of H₂O₂ in the renal responses to tempol and implicate an involvement of O₂⁻ generation in the regulation of renal hemodynamics and excretory function in ANG II-induced hypertensive rats.

Tempol did not cause any significant alterations in the renal parameters in normotensive control rats (Figs. 1–4). This indicates that O₂⁻ activity remains minimal in these animals. Other studies have also demonstrated that systemic administration of tempol caused MAP reduction in ANG II-infused rats but had no significant effect in normotensive control animals

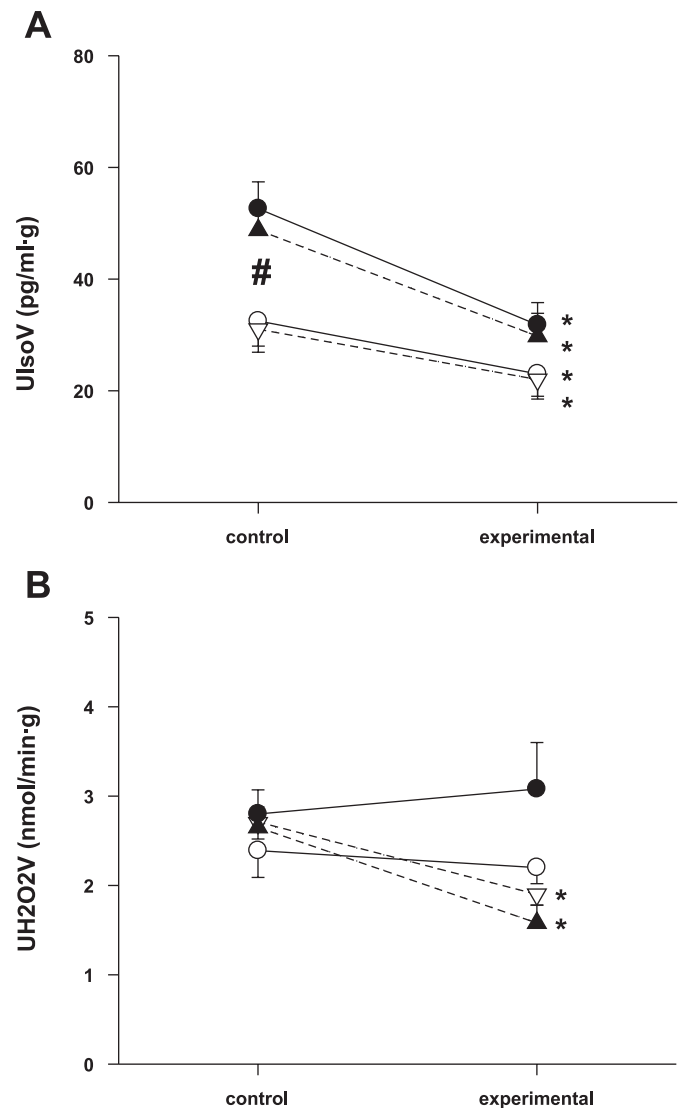


Fig. 5. Urinary 8-isoprostane excretion rate (U_{iso}V; A) and urinary H₂O₂ excretion rate (U_{H₂O₂}V; B) responses to intra-arterial infusion of tempol in normotensive (○; $n = 9$) and hypertensive (●; $n = 9$) rats and coinfusion of tempol + catalase in normotensive (▽; $n = 6$) and hypertensive (▲; $n = 6, 10$) rats. $P < 0.05$ vs. corresponding control values (*) and vs. values in normotensive rats (#).

(22, 34). Similar results were observed in Wistar-Kyoto rats compared with SHR (30). Although O_2^- is a constant product of cellular metabolism under normal conditions, its basal tissue concentration is kept to a minimal level because of efficient activity of endogenous antioxidant systems. Besides SOD and other antioxidative enzymes, endogenous NO is also known to exert a potent antioxidative effect (17). An appropriate physiological balance in oxidative status of the kidney during normal conditions is critically dependent on endogenous NO generation. As reported previously, chronic ANG II infusion significantly reduced extracellular SOD expression (2, 34); thus, the ability of enzymatic O_2^- degradation may be reduced in hypertensive compared with normotensive rats. Chronic administration of tempol ameliorated the suppressed extracellular SOD and moreover normalized enhanced NADPH oxidase activity in ANG II-induced hypertension (34). These findings indicate that the O_2^- level is increased in ANG II-infused hypertensive animals even though endothelial NO synthase activity may have increased in this model, as reported earlier (20).

In this study, the regional RBF responses to tempol infusion in ANG II-treated rats showed greater increases in MBF than in CBF; cumulatively, however, total RBF was increased. This indicates that concomitant generation of O_2^- during chronic ANG II infusion had a greater effect on medullary circulation than on cortical circulation. Previous studies to assess regional blood flow responses to tempol also suggest higher involvement of O_2^- in the renal medulla (7, 37). The diuretic and natriuretic effects of tempol in ANG II-infused hypertensive rats were modulated by increases in GFR and alterations of sodium reabsorption in the tubules. Because fractional excretion of sodium is significantly increased during tempol administration in ANG II-treated rats, it is also notable that enhanced O_2^- activity directly modulates tubular reabsorptive function as has been reported previously in *in vitro* (23) and *in vivo* studies (15, 16). O_2^- may exert its direct action in the kidney (14) or indirectly by reducing NO bioavailability (5, 17, 29), thus causing renal vasoconstriction and antinatriuresis. The observed renal responses to tempol in hypertensive rats could be due either to reduction of O_2^- activity, an increase in the bioavailability of NO, or both. In an earlier study in dogs (18), we observed that renal responses to acute administration of ANG II were ameliorated by tempol infusion both in intact conditions and under conditions of NO synthase inhibition. In isolated thick ascending limb preparations, tempol decreased NaCl absorption without increasing NO levels; that suggests the direct effect of O_2^- -modulated NaCl absorption in thick ascending limb is independent of NO (23). Thus these results provide further evidence that an increase in O_2^- generation modulates renal hemodynamics and excretory function during chronic administration of ANG II.

Because it was reported that tempol exerts an inhibitory effect on sympathetic nerve activity (36), it could be argued that a neural factor was involved in the observed renal responses to tempol in the present study. However, it was also demonstrated that enhanced O_2^- activity by SOD inhibition caused stimulation of renal sympathetic activity, a response that was shown to be ameliorated by tempol (32), indicating that tempol-induced inhibition of sympathetic activity could be related to its ability to scavenge O_2^- in the neural tissue. In the present study, tempol infusion in the renal artery did not cause

any changes in systemic arterial pressure in either normotensive or hypertensive rats, indicating a minimal neural involvement in the observed responses to tempol. Moreover, the renal artery was isolated from surrounding tissue by severing the visible renal nerve fibers; thus, the kidney was mostly denervated during these acute experiments. In our earlier studies, where a denervated kidney preparation was conducted in dogs, tempol was also shown to induce changes in renal function during treatment with ANG II and NO inhibition (17, 18). The vasodilator and natriuretic responses to tempol may indicate an involvement of natriuretic factors in these responses. However, marked changes in circulating factors, such as atrial natriuretic peptide induced by tempol administration, were not expected, since there was no indication of any changes in circulatory volume during tempol administration. Moreover, tempol did not cause any effects in normotensive rats; thus, a marked involvement of sympathetic activity and circulating natriuretic factors seems unlikely in the renal responses to tempol observed in the present study.

In conclusion, these data indicate that the generation of O_2^- due to ANG II administration modulates renal hemodynamic and excretory function, possibly leading to sodium retention and thus contributing to the development of ANG II-dependent hypertension.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical help provided by Dr. Mohammed Z. Haque (Tulane University, Health Sciences Center). We also thank Dr. Ludek Cervenka (Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic) for providing help in scientific discussion in this study.

GRANTS

This study was supported by National Heart, Lung, and Blood Institute Grants HL-51306 and HL-26371.

REFERENCES

1. **Carmines PK, Fallet RW, and Pollock JS.** Effect of H_2O_2 on afferent arteriolar diameter in normal rat kidney (Abstract). *FASEB J* 19: A1145, 2005.
2. **Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, and Wilcox CS.** Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R117–R124, 2003.
3. **Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, and Thiemermann C.** Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 58: 658–673, 2000.
4. **Chen YF, Cowley AW, and Zou AP.** Increased H_2O_2 counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R827–R833, 2003.
5. **Chin SY, Wang CT, Majid DS, and Navar LG.** Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F876–F882, 1998.
6. **Fam SS and Morrow JD.** The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Curr Med Chem* 10: 1723–1740, 2003.
7. **Feng MG, Dukacz SA, and Kline RL.** Selective effect of tempol on renal medullary hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1420–R1425, 2001.
8. **Hahn SM, Mitchell JB, and Shacter E.** Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23: 879–884, 1997.
9. **Huelsemann JL, Sterzel RB, McKenzie DE, and Wilcox CS.** Effects of a calcium entry blocker on blood pressure and renal function during angiotensin-induced hypertension. *Hypertension* 7: 374–379, 1985.
10. **Janssen LJ.** Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1067–L1082, 2001.

11. **Jernigan NL, Resta TC, and Walker BR.** Contribution of oxygen radicals to altered NO-dependent pulmonary vasodilation in acute and chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L947–L955, 2004.
12. **Kopkan L, Kramer HJ, Huskova Z, Vanourkova Z, Backer A, Bader M, Ganten D, and Cervenka L.** Plasma and kidney angiotensin II levels and renal functional responses to AT(1) receptor blockade in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 22: 819–825, 2004.
13. **Kopkan L and Majid DS.** Superoxide contributes to the development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension* 46: 1026–1031, 2005.
14. **Krishna MC, Samuni A, Taira J, Goldstein S, Mitchell JB, and Russo A.** Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of hemoproteins. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* 18: 26018–26025, 1996.
15. **Lopez B, Salom MG, Arregui B, Valero F, and Fenoy FJ.** Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension* 42: 1150–1156, 2003.
16. **Majid DS and Nishiyama A.** Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 39: 293–297, 2002.
17. **Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, and Castillo A.** Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R27–R32, 2004.
18. **Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, and Castillo A.** Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric oxide synthase inhibition in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F412–F419, 2005.
19. **Makino A, Skelton MM, Zou AP, and Cowley AW Jr.** Increased renal medullary H₂O₂ leads to hypertension. *Hypertension* 42: 25–30, 2003.
20. **Navar LG, Ichihara A, Chin SY, and Imig JD.** Nitric oxide-angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension. *Acta Physiol Scand* 168: 139–147, 2000.
21. **Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, and Mitchell KD.** Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 76: 425–536, 1996.
22. **Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, and Abe Y.** Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension* 37: 77–83, 2001.
23. **Ortiz PA and Garvin JL.** Superoxide stimulates NaCl absorption by the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F957–F962, 2002.
24. **Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, and Sobey CG.** Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke* 35: 584–589, 2004.
25. **Paravicini TM and Sobey CG.** Cerebral vascular effects of reactive oxygen species: recent evidence for a role of NADPH-oxidase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 855–859, 2003.
26. **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, and Harrison DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916–1923, 1996.
27. **Reckelhoff JF and Romero JC.** Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R893–R912, 2003.
28. **Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Roberts LJII, Morrow JD, and Romero JC.** Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats. *Hypertension* 35: 476–479, 2000.
29. **Schnackenberg CG, Welch WJ, and Wilcox CS.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59–64, 1998.
30. **Schnackenberg CG and Wilcox CS.** Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f₂alpha. *Hypertension* 33: 424–428, 1999.
31. **Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, and Granger JP.** Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension* 42: 806–810, 2003.
32. **Shokoji T, Fujisawa Y, Kimura S, Rahman M, Kiyomoto H, Matsubara K, Moriwaki K, Aki Y, Miyatake A, Kohno M, Abe Y, and Nishiyama A.** Effects of local administrations of tempol and diethylthio-carbamic on peripheral nerve activity. *Hypertension* 44: 236–243, 2004.
33. **Wang CT, Chin SY, and Navar LG.** Impairment of pressure-natriuresis and renal autoregulation in ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F319–F325, 2000.
34. **Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, and Wilcox CS.** Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H22–H28, 2005.
35. **Williams JM, Pollock JS, and Pollock DM.** Arterial pressure response to the antioxidant tempol and ETB receptor blockade in rats on a high-salt diet. *Hypertension* 44: 770–775, 2004.
36. **Xu H, Fink GD, and Galligan JJ.** Tempol lowers blood pressure and sympathetic nerve activity but not vascular O₂⁻ in DOCA-salt rats. *Hypertension* 43: 329–334, 2004.
37. **Zou AP, Li N, and Cowley AW Jr.** Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension* 37: 547–553, 2001.
38. **Zou LX, Imig JD, von Thun AM, Hymel A, Ono H, and Navar LG.** Receptor-mediated intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 28: 669–677, 1996.

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



*Learn and Live*SM

Enhanced Superoxide Activity Modulates Renal Function in NO-Deficient Hypertensive Rats

Libor Kopkan and Dewan S.A. Majid

Hypertension 2006;47:568-572; originally published online Jan 9, 2006;

DOI: 10.1161/01.HYP.0000200027.34925.93

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 72514

Copyright © 2006 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/47/3/568>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Enhanced Superoxide Activity Modulates Renal Function in NO-Deficient Hypertensive Rats

Libor Kopkan, Dewan S.A. Majid

Abstract—An enhancement of superoxide (O_2^-) activity was shown to contribute to the development of hypertension induced by NO deficiency. To better understand the mechanistic role of O_2^- in this NO-deficient hypertension, we evaluated the renal responses to acute intraarterial administration of an O_2^- scavenger, tempol (50 $\mu\text{g}/\text{min}$ per 100 g of body weight) in anesthetized male Sprague-Dawley rats treated with NO synthase inhibitor nitro-L-arginine methyl ester (15 mg/kg per day in drinking water, $n=7$) for 4 weeks, which caused increases in mean arterial pressure (146 ± 3 versus 124 ± 2 mm Hg) compared with normotensive control rats ($n=6$). Hypertensive rats had higher renal vascular resistance (29 ± 2 versus 20 ± 1 mm Hg/mL per minute per gram), as well as lower renal blood flow (5.2 ± 0.3 versus 6.3 ± 0.2 mL/min per gram; cortical blood flow, 153 ± 13 versus 191 ± 8 perfusion units; medullary blood flow, 43 ± 2 versus 51 ± 3 perfusion units) and glomerular filtration rate (0.69 ± 0.04 versus 0.90 ± 0.05 mL/min per gram) without a significant difference in urinary sodium excretion (0.81 ± 0.07 versus 0.86 ± 0.12 $\mu\text{mol}/\text{min}$ per gram) compared with normotensive rats. Urinary 8-isoprostane excretion rate (6.8 ± 0.7 versus 4.5 ± 0.3 pg/min per gram) was higher in hypertensive than normotensive rats. Intraarterial infusion of tempol did not alter renal function in normotensive rats. However, tempol significantly decreased renal vascular resistance by $12\pm 2\%$ and urinary 8-isoprostane excretion rate by $24\pm 4\%$ and increased renal blood flow by $10\pm 2\%$, cortical blood flow by $9\pm 2\%$, medullary blood flow by $15\pm 6\%$, glomerular filtration rate by $11\pm 3\%$, and urinary sodium excretion by $19\pm 5\%$ in hypertensive rats. These data indicate that enhanced O_2^- activity modulates renal hemodynamics and excretory function during reduced NO production and, thus, contributes to the pathophysiology of the NO-deficient form of hypertension. (*Hypertension*. 2006;47[part 2]:568-572.)

Key Words: nitric oxide ■ oxidative stress ■ hypertension, renal

An imbalance between the production and the degradation of reactive oxygen species such as superoxide anion (O_2^-) leads to the condition termed as “oxidative stress.” It has been suggested that oxidative stress is involved in the pathophysiology of many forms of hypertension.¹⁻³ Treatment with an O_2^- scavenging agent, tempol (4-hydroxy-tetramethylpiperidime-1-oxyl), significantly reduces blood pressure in different hypertensive models^{4,5} indicating that O_2^- plays a role in the development of hypertension. Recently, we also demonstrated that chronic treatment with tempol attenuated the development of hypertension and salt sensitivity in rats induced by chronic inhibition of NO synthase (NOS) in rats.⁶ These results indicate that an enhanced O_2^- generation is involved in the pathogenesis of an NO-deficient form of hypertension. However, the exact mechanistic role of O_2^- in mediating the salt sensitivity and hypertension in the condition of NO deficiency has not yet been clearly defined.

NO acts as an endogenous antioxidative agent by reacting with O_2^- generated in the living tissues, thus it provides a protective function against the action of O_2^- in many organs,

including the kidney.^{6,7} Previous studies have indicated that an increasing accumulation of O_2^- in biological tissues can occur in the condition of NO deficiency that can lead to alterations in organ function.^{3,8} In an earlier study in dogs, we observed that tempol treatment before NOS inhibition did not cause any functional changes in the kidney but caused diuresis and natriuresis during NOS inhibition indicating that an enhancement of O_2^- activity because of NO deficiency influences renal tubular function.⁷ Previous studies also provided evidence that an exaggerated impairment of kidney function occurred in hypertensive animals during NO inhibition.⁹⁻¹¹ The findings in these studies support the notion that an interaction between NO and O_2^- has a role in regulating normal function in the kidney, an imbalance of which would lead to the development of hypertension.

In the present study, we examined the hypothesis that increased O_2^- activity because of chronic NOS inhibition influences renal vascular and tubular function that compromises the ability of the kidney to excrete sodium appropriately and, thus, plays a role in the pathogenesis of the NO-deficient form of hypertension. We evaluated the renal

Received October 17, 2005; first decision November 2, 2005; revision accepted December 5, 2005.

From the Department of Physiology, Tulane Hypertension and Renal Center of Excellence, Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, La. Correspondence to Dewan S.A. Majid, Department of Physiology, SL 39, Tulane University Health Sciences Center, 1430 Tulane Ave, New Orleans, LA 70112. E-mail majid@tulane.edu

© 2006 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/01.HYP.0000200027.34925.93

functional responses to tempol, infused directly into the left renal artery of anesthetized male Sprague-Dawley rats treated chronically with the NOS inhibitor nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for 4 weeks. Normal Sprague-Dawley rats served as control animals. To our knowledge, no previous study addressed this specific issue of determining the role of O_2^- in modulating renal function in L-NAME-induced hypertensive rats. As we reported previously,¹² intraarterial administration of tempol provides a more direct assessment of the responses to O_2^- scavenging on renal hemodynamics and excretory function without appreciable changes in blood pressure that are usually associated with systemic administration of tempol.^{13,14}

Methods

The study was performed in male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) in accordance with the guidelines and practices established by the Tulane University Animal Care and Use Committee. After 3 days acclimation, rats (250 to 270 g) were randomly divided into the nontreated groups (n=6) and the L-NAME-treated groups (n=7). L-NAME (Sigma) at a dose of 15 mg/kg per day¹⁵ was given in drinking water for a 4-week experimental period.

At the end of 4 weeks of chronic L-NAME treatment, acute clearance experiments were performed to determine renal responses to tempol in anesthetized (pentobarbital sodium, Sigma; 50 mg/kg IP) L-NAME-treated hypertensive and nontreated normotensive rats as described previously.¹² The right jugular vein was catheterized for intravenous administration of solutions. The cannula introduced into the right femoral artery was connected with the AcqKnowledge data acquisition system Biopac to allow continuous monitoring of arterial blood pressure. The left kidney was exposed via a flank incision and placed in a Lucite cup, and the ureter was cannulated with a PE-10 catheter for urine collection. A polyethylene tube PE-10 (OD, 0.61 mm) catheter, which was tapered $\approx 40\%$ to 50% , was inserted ≈ 2 to 3 mm deep into the renal artery from the aorta via the left femoral artery to allow intraarterial administration of drugs directly into the kidney at a rate of $5 \mu\text{L}/\text{min}$.¹² This procedure of inserting the tapered catheter usually does not compromise the renal blood flow (RBF) measurements, because it was observed in pilot experiments that there was no significant alteration of baseline RBF before and after the catheter insertion.

An ultrasonic flow probe (Transonic System) was placed on the left renal artery to measure total RBF. Laser-Doppler needle flow probes (500 μm OD, Periflex 4001, Perimed) were used to measure the relative changes in cortical blood flow (CBF) and medullary blood flow (MBF). Zero flow was determined when the renal artery was completely occluded at the end of the experiment.

After a 60-minute stabilization, the experimental protocol was started with two 30-minute control clearance periods to assess the

baseline control values of renal hemodynamic and excretory parameters. Then, the intraarterial infusion of tempol was given for 75 minutes to determine the renal functional responses during drug administration. After the initiation of tempol infusion, a 15-minute equilibration period was allowed before two 30-minute clearance experimental periods in these experiments. Tempol (Sigma) was infused at a dose of $50 \mu\text{g}/\text{min}$ per 100 g of body weight. This dose of tempol was selected based on findings in our earlier acute studies in rats¹² and dogs^{7,16} that showed significant reductions in the urinary 8-isoprostane excretion rate ($U_{\text{iso}}V$; marker for endogenous O_2^- activity). At the midpoint of the clearance collection period, an arterial blood sample was collected from the femoral arterial cannula to measure plasma inulin and sodium concentration.

Urine volume was measured gravimetrically. Plasma and urine sodium concentrations were determined by flame photometry, and inulin concentrations were measured colorimetrically to determine glomerular filtration rate (GFR). Renal vascular resistance (RVR) and fractional sodium excretion (FE_{Na}) were calculated according to standard formulas. An enzyme immunoassay kit was used to measure urinary 8-isoprostane concentration (Cayman Chemical).^{4,6}

Data are expressed as mean \pm SE. Statistical comparisons between control and experimental values in the same group were conducted by paired Student *t* test. Statistical comparisons among the groups were conducted by 2-way ANOVA for repeated measurements, followed by Newman-Keuls test. *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

In acute experiments, baseline values of mean arterial pressure and renal hemodynamics and excretory parameters were assessed in anesthetized animals during the control period. Baseline mean arterial pressure was significantly higher in L-NAME-treated hypertensive rats than in normotensive rats (146 ± 2 versus 124 ± 2 mm Hg). Baseline RBF (Figure 1A) was lower, and baseline RVR (Figure 1B) was higher in L-NAME-treated hypertensive rats compared with normotensive rats. Comparisons of the baseline values of CBF and MBF between hypertensive and normotensive rats were not made, because these were measured as relative blood flow using laser-Doppler flowmetry and expressed as the percentage of the control value (taken as 100%; Figure 2 A and 2B). However, GFR (Figure 3A) measured by the inulin clearance technique was lower compared with normotensive control rats. There were no significant differences in urine flow (*V*; Figure 3B) and sodium excretion (Figure 4) between hypertensive or normotensive rats. However, it was observed that the baseline plasma sodium concentration was slightly but significantly higher in L-NAME-treated hypertensive rats

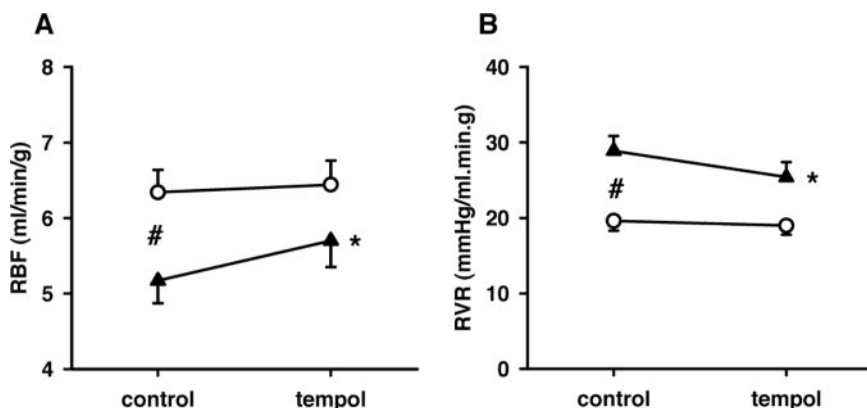


Figure 1. RBF (A) and RVR (B) responses to intraarterial infusion of tempol in normotensive (○; n=6) and L-NAME-treated hypertensive (▲; n=7) rats. **P*<0.05 vs corresponding control values; #*P*<0.05 vs values in normotensive rats.

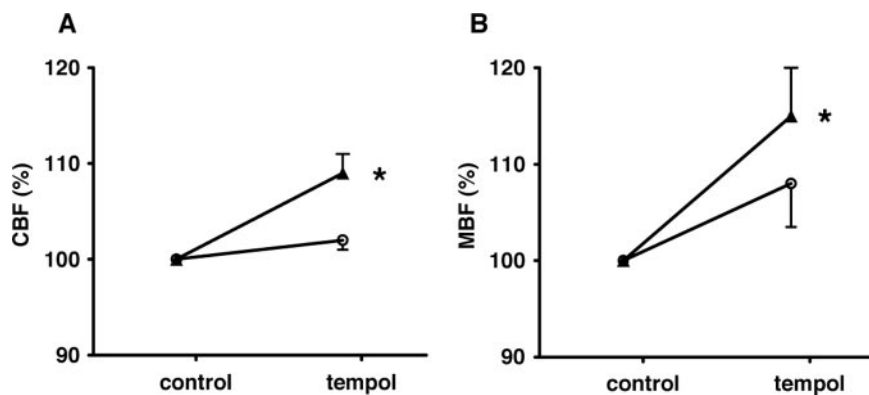


Figure 2. CBF (A) and MBF (B) responses to intraarterial infusion of tempol in normotensive (○; n=6) and L-NAME-treated hypertensive (▲; n=7) rats. These responses are expressed in percent of the control value (taken as 100%), as these are relative measures of regional blood flow. * $P < 0.05$ vs corresponding control values.

than in normotensive control rats (148.0 ± 0.4 versus 146.1 ± 0.6 mmol/L; $P < 0.03$).

Figures 1 to 4 illustrate the effects of acute tempol administration on the renal function in both hypertensive and normotensive rats. Tempol administration did not significantly alter renal hemodynamic and excretory function in normotensive rats as we demonstrated previously.¹² However, in L-NAME-treated hypertensive rats, tempol infusion caused a significant increase in RBF ($\Delta 10 \pm 2\%$; $P < 0.05$; Figure 1A) and decreased RVR ($\Delta 12 \pm 2\%$; $P < 0.05$; Figure 1B). There were also increases in regional blood flow to the renal cortex (CBF; $\Delta 9 \pm 2\%$; $P < 0.05$; Figure 2A) and to the renal medulla (MBF; $\Delta 15 \pm 6\%$; $P < 0.05$; Figure 2B) during tempol infusion in L-NAME-treated rats. As illustrated in Figure 3A, GFR was also significantly increased by tempol in L-NAME-treated hypertensive rats ($\Delta 11 \pm 2\%$; $P < 0.05$). Although the increases in urine flow during tempol infusion were of borderline significance statistically ($\Delta 9 \pm 4\%$; $P < 0.07$; Figure 3B), the absolute urine sodium excretion ($\Delta 19 \pm 5\%$; $P < 0.05$) and FE_{Na} ($\Delta 11 \pm 4\%$; $P < 0.05$) were significantly increased as illustrated in Figure 4A and 4B. During administration of tempol in the renal artery, there was a minimal effect on systemic arterial pressure either in normotensive control (124 ± 2 to 122 ± 3 mm Hg; P value not significant) or in L-NAME-treated hypertensive rats (146 ± 2 to 143 ± 3 mm Hg; P value not significant).

As illustrated in Figure 5, baseline control values of $U_{ISO}V$ were significantly higher in hypertensive rats compared with normotensive rats. Tempol administration decreased the $U_{ISO}V$ as reported previously.^{6,12,14} In hypertensive rats, tempol infusion decreased $U_{ISO}V$ by $24 \pm 4\%$ ($P < 0.01$; Figure 5). There was

also a decrease in $U_{ISO}V$ by $11 \pm 3\%$ ($P < 0.05$; Figure 5) in normotensive rats during tempol administration; however, the magnitude was smaller than that in hypertensive rats.

Discussion

In the present study, it has been demonstrated that acute treatment with an O_2^- scavenger, tempol, increases the RBF, GFR, and urinary excretion rate of sodium in chronic L-NAME-induced hypertensive rats but not in normotensive control rats. Because tempol was infused directly into the renal artery that minimized its effect on systemic blood pressure,^{7,12,16} a more direct assessment of O_2^- scavenging effects on renal hemodynamics and excretory function was possible in these experiments. The results clearly indicate that an enhancement of O_2^- activity modulates renal hemodynamics and excretory function during NOS inhibition in rats. This assessment is additionally supported by the fact that chronic L-NAME treatment in these rats caused higher $U_{ISO}V$ (marker for endogenous O_2^- activity; Figure 5) compared with non-treated animals, which was ameliorated by such acute intra-renal administration of tempol. Earlier, we also demonstrated that chronic treatment with tempol attenuated the development of salt sensitivity and hypertension in rats that were given L-NAME for a 4-week period.⁶ Taken together, these results demonstrate that enhanced O_2^- activity in the condition of NO deficiency modulates renal hemodynamics and excretory function, which contributes to the development of salt sensitivity and hypertension induced by chronic NOS inhibition. Previous studies also suggested that the hyperten-

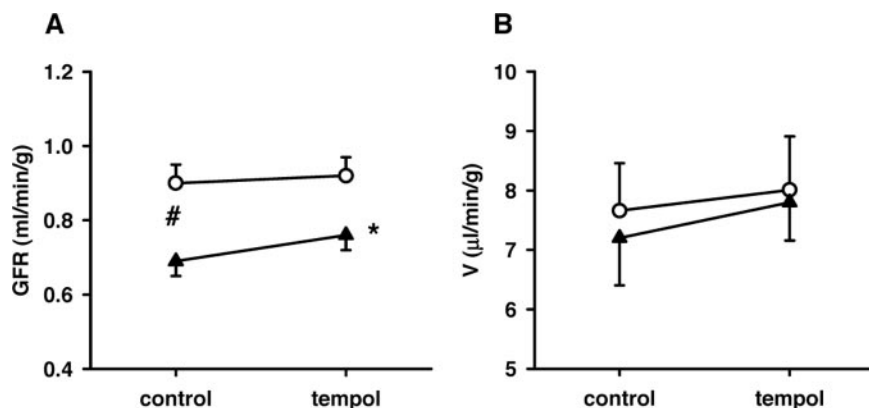


Figure 3. GFR (A) and urine flow (B) responses to intraarterial infusion of tempol in normotensive (○; n=6) and L-NAME-treated hypertensive (▲; n=7) rats. * $P < 0.05$ vs corresponding control values; # $P < 0.05$ vs values in normotensive rats.

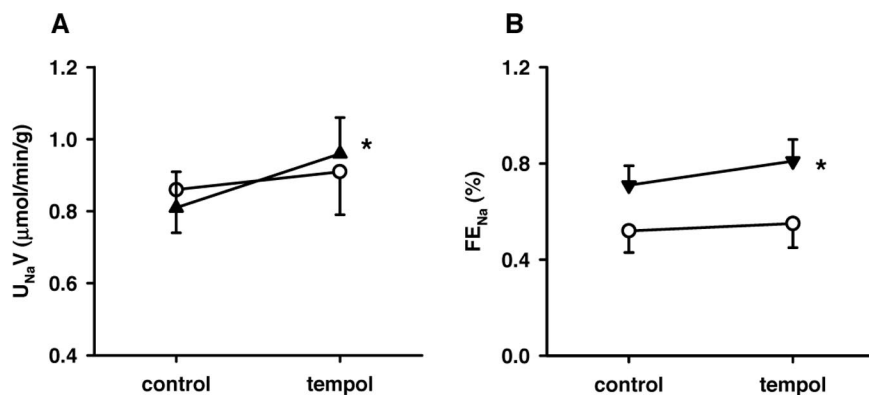


Figure 4. Absolute sodium excretion (UNaV; A) and FE_{Na} (B) responses to intraarterial infusion of tempol in normotensive (○; n=6) and L-NAME-treated hypertensive (▲; n=7) rats. *P<0.05 vs corresponding control values.

sion observed in Dahl salt-sensitive rats was linked to enhanced O₂⁻ activity.¹⁷

In rats, both acute and chronic administration of an NOS inhibitor causes renal vasoconstriction and a decrease in GFR as reported previously.^{9,11,18,19} The present investigation also confirms that chronic L-NAME treatment induces decreases in total and regional blood flow to the kidney, as well as GFR, as compared with the values obtained from nontreated control animals. As observed with chronic tempol treatment in our earlier study,⁶ acute intrarenal infusion of tempol in L-NAME-hypertensive rats in the present study also increased GFR. This finding indicates that an enhancement of O₂⁻ modulates glomerular hemodynamics in the condition of NO deficiency, possibly by altering preglomerular vascular resistance as suggested earlier.²⁰ Because tempol infusion caused increases in absolute, as well as fractional excretion of sodium in L-NAME-treated rats but not in intact animals (Figure 4), it is reasonable to speculate that enhanced O₂⁻ activity because of NOS inhibition directly modulates tubular reabsorptive function. A similar observation was also reported in our earlier studies using dogs⁷ in which intraarterial administration of tempol caused natriuretic response during NO inhibition but not in intact condition. The exact tubular segment in which O₂⁻ exerts its effect was not possible to

determine from our in vivo experiments; however, a previous in vitro study by Ortiz and Garvin²¹ reported that O₂⁻ enhances sodium reabsorption in a thick ascending limb of the loop of Henley. Chronic administration of tempol also showed increases in sodium excretion, as well as attenuation of the hypertensive responses in rats treated with L-NAME for 4 weeks.⁶ In the present study, we also observed that mean baseline plasma sodium concentration was significantly higher in L-NAME-treated rats than in nontreated control rats. These findings may indicate that a degree of sodium retention has occurred in rats because of L-NAME treatment. Collectively, these results support the hypothesis that sodium retention resulting from oxidative stress-induced enhancement in tubular sodium reabsorption plays a mechanistic role in the development of an NO-deficient form of hypertension. However, additional comprehensive studies may be required to confirm this hypothesis, because our present study was not designed to assess the sodium balance or volume status in these rats treated chronically with or without L-NAME.

Although O₂⁻ is a constant product of cellular metabolism under normal condition, its basal tissue concentration is kept to a minimal level because of efficient activity of endogenous antioxidant systems. It is increasingly evident that endogenous NO also exerts a potent antioxidative effect and that an appropriate physiological balance in the oxidative status of the kidney during normal condition is critically dependent on endogenous NO generation.^{7,8} We have demonstrated earlier that RBF, GFR, and excretory function in anesthetized dogs remain appreciably well protected during acute treatment with an inhibitor of O₂⁻ dismutase enzyme in intact animals but not in NO-blocked dogs.²² It was also shown that acute treatment with the O₂⁻ scavenger tempol increased urine flow and sodium excretion in NO-blocked dogs but not in intact animals.⁷ In the present study, tempol treatment did not cause any appreciable changes in renal parameters in normotensive control rats but only in rats subjected to chronic NO deficiency. These findings clearly indicate a powerful antioxidative function of endogenous NO that protects critical organ function from the adverse effects of continually released endogenous O₂⁻ both in physiology, as well as in pathophysiology of many disease processes. It is conceivable that in any condition of NO deficiency, tissue O₂⁻ concentration would increase because of a lack of NO-mediated antioxidant action. Supporting this notion, previous studies also demonstrated that NOS inhibition enhances vascular O₂⁻ release in rats,²³

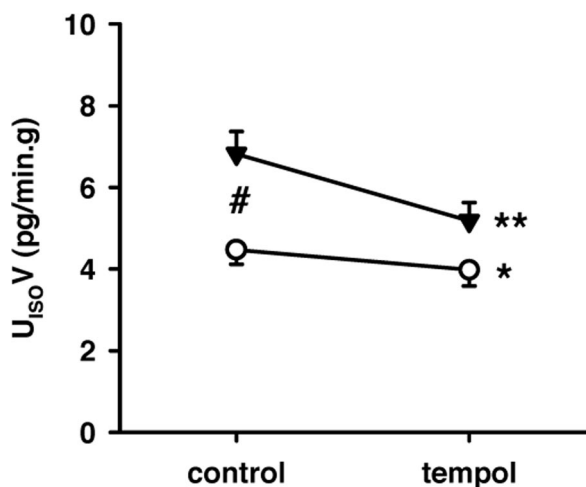


Figure 5. U_{Iso}V responses to intraarterial infusion of tempol in normotensive (○; n=6) and L-NAME-treated hypertensive (▲; n=7) rats. *P<0.05 vs corresponding control values; **P<0.01 vs corresponding control values; #P<0.05 vs values in normotensive rats.

mice,²⁴ and humans.²⁵ Although we did not measure directly the O_2^- level in the present study, we observed that $U_{ISO}V$ increased in L-NAME-treated rats, which was significantly reduced by acute tempol infusion. In our previous study in dogs,⁷ we also observed an increase in $U_{ISO}V$ during acute NOS inhibition in the kidney that was ameliorated by coadministration of tempol. In conclusion, these data demonstrate that the enhanced O_2^- activity because of chronic NOS inhibition contributes to the impairment of renal function that compromises the ability of the kidney to excrete sodium appropriately and, thus plays a role in the pathogenesis of the NO-deficient form of hypertension.

Perspectives

The findings of this present study, as well as our earlier observations,^{6,7,16} emphasize an important role of the interaction between O_2^- and NO in the regulation of renal function and blood pressure. These observations suggest that decreased NO availability can also induce an imbalance between oxidative and antioxidative mechanism in living tissues, which is involved in many pathophysiologic processes in the body. Thus, additional emphasis should be given in future experimental studies to determine the interactive role of O_2^- and NO in the regulation of many organ functions to increase our understanding of physiological as well as pathophysiological processes of many cardiovascular and renal diseases that are commonly associated with NO deficiency.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the technical help provided by Alexander Castillo. This study was supported by National Heart, Lung, and Blood Institute Grant HL-66432.

References

- Romero JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*. 1999;34:943–949.
- Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:R913–R935.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840–844.
- Schnackenberg CG, Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin $f_2\alpha$. *Hypertension*. 1999;33:424–428.
- Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H22–H28.
- Kopkan L, Majid DS. Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension*. 2005;46:1026–1031.
- Majid DSA, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R27–R32.
- Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol*. 2004;24:354–365.
- Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertension*. 1992;20:298–303.
- Tolins JP, Shultz PJ. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int*. 1994;46:230–236.
- Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension*. 1996;27:1165–1172.
- Kopkan L, Castillo A, Navar LG, Majid DS. Enhanced superoxide generation modulates renal function in angiotensin II - induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. In Press.
- Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, Abe Y. Systemic and regional hemodynamic responses to tempol in angiotensin II-infused hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;37:77–83.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998;32:59–64.
- Scroggin KE, Hatton DC, Chi Y, Luft FC. Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. *Am J Physiol*. 1998;274:R367–R374.
- Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric oxide synthase inhibition in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288:F412–F419.
- Manning RD Jr, Meng S, Tian N. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:243–250.
- Shultz PJ, Tolins JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest*. 1993;91:642–650.
- Qiu C, Baylis C. Endothelin and angiotensin mediate most glomerular responses to nitric oxide inhibition. *Kidney Int*. 1999;55:2390–2396.
- Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand*. 2003;179:217–223.
- Ortiz PA, Garvin JL. Superoxide stimulates NaCl absorption by the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F957–F962.
- Majid DSA, Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension*. 2002;39:293–297.
- Usui M, Egashira K, Kitamoto S, Koyanagi M, Katoh M, Kataoka C, Shimokawa H, Takeshita A. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*. 1999;34:546–551.
- Cosentino F, Barker JE, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, West N, Channon KM, Volpe M, Luscher TF. Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:496–502.
- Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*. 2002;39:1088–1094.

Superoxide and its interaction with nitric oxide modulates renal function in prehypertensive *Ren-2* transgenic rats

Libor Kopkan^{a,b}, Zuzana Husková^{b,c}, Zdeňka Vaňourková^{b,c}, Monika Thumová^b, Petra Škaroupková^b, Luděk Červenka^{b,c} and Dewan S.A. Majid^a

Objective The present study was performed to examine the role of superoxide (O_2^-) and its interaction with nitric oxide (NO) in the regulation of renal function in prehypertensive heterozygous *Ren-2* transgenic rats (TGR).

Methods Renal responses to the O_2^- scavenger, tempol (150 μ g/min per 100 g), and/or the NO synthase inhibitor, nitro-L-arginine methylester (L-NAME; 5 μ g/min per 100 g), infused alone or in combination directly into the renal artery were evaluated in anesthetized heterozygous male TGR and aged-matched Hanover Sprague–Dawley rats (HanSD).

Results There were no differences in arterial pressure (122 ± 3 versus 115 ± 2 mmHg), renal plasma flow (RPF; 2.09 ± 0.1 versus 2.07 ± 0.1 ml/min per g), glomerular filtration rate (GFR; 0.73 ± 0.1 versus 0.74 ± 0.1 ml/min per g) or sodium excretion (0.63 ± 0.13 versus 0.67 ± 0.16 μ mol/min per g) between TGR and HanSD. Tempol alone caused significant increases in RPF and GFR ($10 \pm 4\%$ and $12 \pm 2\%$, respectively) in TGR but not in HanSD. Tempol also caused greater sodium excretory responses in TGR compared to HanSD ($112 \pm 16\%$ versus $43 \pm 7\%$; $P < 0.05$). 8-Isoprostane excretion was significantly higher in TGR than in HanSD (10.2 ± 0.8 versus 6.5 ± 0.7 pg/min per g), which was attenuated by tempol. L-NAME caused greater decreases in RPF and GFR in TGR ($-34 \pm 4\%$ and $-22 \pm 4\%$, respectively) than in HanSD

($-19 \pm 3\%$ and $-10 \pm 4\%$, respectively). Co-infusion of tempol partially attenuated the renal hemodynamic and excretory responses to L-NAME in TGR.

Conclusions These data suggest that the enhanced O_2^- activity and its interaction with NO during the prehypertensive phase in TGR modulates renal hemodynamic and excretory function, which may contribute to the development of hypertension in this transgenic rat model. *J Hypertens* 25:2257–2265 © 2007 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Journal of Hypertension 2007, 25:2257–2265

Keywords: angiotensin II, hypertension, nitric oxide, renal function, superoxide

^aDepartment of Physiology, Tulane Hypertension and Renal Center of Excellence, Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana, USA, ^bCenter for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague and ^cCenter for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

Correspondence to Libor Kopkan DVM, Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 1958/9 Videňská, CZ-140 00 Prague 4, Czech Republic
Tel: +4202 61362741; fax: +4202 41721666; e-mail: likp@medicon.cz

Previous presentations: The 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, San Antonio, Texas, USA; and the 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Fukuoka, Japan.

Received 1 March 2007 Revised 11 June 2007
Accepted 4 July 2007

Introduction

The transgenic rat strain for the mouse *Ren-2* renin gene (TGR) represents a monogenetic model of angiotensin II (ANG II)-dependent hypertension. The development of hypertension in this model is attributed to a mouse *Ren-2* renin gene insertion into the genome of normotensive background Hannover Sprague–Dawley (HanSD) rats [1]. Although the hypertension that occurs in this strain is considered to be related to the activation of the renin–angiotensin system, the exact pathophysiological mechanisms responsible for the development of hypertension remain unclear. We have found that plasma and kidney ANG II levels are elevated in conscious TGR at early age, even before a rise in blood pressure [2,3]. It is suggested that chronically elevated ANG II levels cause alterations in renal vascular and tubular function, leading to the development and maintenance of hypertension

in this TGR model [2–4]. ANG II has been shown to increase the production of superoxide anion (O_2^-) via activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, which is an important enzymatic source of O_2^- in the body [5,6]. Recent studies indicate that O_2^- exerts a direct renal vasoconstrictor and antinatriuretic effect [7–10]. It has also been demonstrated that O_2^- activity is increased in TGR in the prehypertensive phase [11]. Thus it is possible that an enhanced O_2^- generation modulates kidney function and plays a mechanistic role in the development of hypertension in this model.

Although ANG II induces an enhancement of O_2^- activity, it also increases nitric oxide (NO) production, which plays an important renoprotective role in the regulation of kidney function during an increase in endogenous ANG

II level [12–14]. NO exhibits renal vasodilatation and inhibits tubular reabsorptive function, leading to diuresis and natriuresis [15]. It also serves an antioxidative function by reducing O_2^- molecules [16,17]; however, an interaction between NO and O_2^- can cause a reduction in bioavailability of NO and, thus, can impair renal vascular as well as tubular function, which may contribute to the development of hypertension induced by ANG II.

In the present study, we examined the hypothesis that enhanced O_2^- generation due to elevated ANG II level in TGR influences renal vascular and tubular function, directly and/or indirectly by diminishing NO level, leading to sodium retention, and thus plays a role in the pathogenesis of hypertension in this model. The renal functional responses to the O_2^- scavenger, tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl), and NO synthase inhibitor, nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), administered alone or in combination directly into the left renal artery of anesthetized prehypertensive heterozygous male TGR and age-matched HanSD rats, were evaluated in the present study. These experimental procedures with direct administration of tempol/L-NAME in the renal artery using anesthetized rats are preferred over systemic administration of drugs in awake animals to ensure proper assessment of specific changes in renal hemodynamics and excretory function during the experimental period.

Methods

Animal preparation

Studies were performed in accordance with guidelines established by the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Use Committee and in accordance with animal protection laws in the Czech Republic. All animals used in the present study were bred at the Center for Experimental Medicine from stock animals supplied from the Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin. Animals were fed standard rat chow containing 0.4% sodium chloride (SEMED, Prague, Czech Republic) and had free access to tap water.

The animals used in this study were aged 35–36 days, during which time heterozygous TGR remain normotensive. TGR usually develop hypertension after 40 days of age and this model represents an ANG II-dependent form of hypertension [2,3,11]. The development of hypertension in this strain can be compared with other experimental rat strains, such as spontaneously hypertensive rats, a model of essential hypertension [18], and in contrast to homozygous TGR, a model of malignant hypertension [19]. Systolic blood pressure (SBP) was measured every alternate day from 30 days of age by tail-cuff plethysmography, as described previously [2,3].

Acute clearance experiments

Acute clearance experiments were performed as described previously [2,9,10,11]. Briefly, the rats were anesthetized

with thiopental sodium (60 mg/kg intraperitoneally). They were placed on a thermoregulated table to maintain body temperature at 37–37.5°C. A tracheostomy was performed to maintain a patent airway and the exterior end of the tracheal cannula was placed inside a small plastic chamber into which humidified 95% O_2 /5% CO_2 mixture was continuously passed. The right jugular vein was catheterized for intravenous administration of isotonic saline solution containing bovine serum albumin (6%). The right femoral artery was cannulated to allow continuous monitoring of arterial blood pressure by a data acquisition system (PowerLab; ADInstruments, Oxfordshire, UK) and blood sampling. The left kidney was exposed via a flank incision and placed in a Lucite cup and the ureter was cannulated with a PE-10 catheter for urine collection. A tapered PE-10 catheter was inserted into the renal artery via the left femoral artery to allow intra-arterial administration of drugs directly into the kidney [2,9,10]. A continuous infusion of heparinized saline (250 U of heparin/ml of isotonic saline) at a rate of 5 μ l/min was made to maintain the patency of the tapered catheter used in the renal artery throughout the experiment. This practice of low-dose infusion of heparin was also employed in our earlier studies [2,9,10] and was noted without any significant effects on basal renal hemodynamics and excretory function. Although the other catheter (for measurement of arterial pressure) contained heparinized saline, it was not for infusion. After surgery, isotonic saline solution containing bovine serum albumin (1%), *p*-aminohippurate sodium (PAH; Merck, Sharp & Dohme, West Point, Pennsylvania, USA) (1.5%), and polyfructosan inulin (Inutest, Laevosan, Austria) (7.5%) was infused at a rate of 20 μ l/min [2,11].

Experimental protocol

Acute experiments were conducted in the following groups of rats:

- (1) HanSD group
 - (a) vehicle (saline) infusion ($n = 8$),
 - (b) tempol infusion ($n = 11$),
 - (c) L-NAME infusion ($n = 11$),
 - (d) L-NAME + tempol co-infusion ($n = 11$);
- (2) TGR group
 - (a) vehicle infusion ($n = 10$),
 - (b) tempol infusion ($n = 10$),
 - (c) L-NAME infusion ($n = 11$),
 - (d) L-NAME + tempol co-infusion ($n = 12$).

After 60-min stabilization, the experimental protocol was started with a two 30-min clearance periods to assess baseline control values of renal hemodynamic and excretory parameters. The intra-arterial infusion of tempol (150 μ g/min per 100 g body weight (BW); Sigma Chemical Co., St Louis Missouri, USA) and/or L-NAME (5 μ g/min per 100 g BW; Sigma Chemical Co.) was given for 80 min directly into the left renal artery to determine

renal functional responses during drug administration. After the initiation of drug infusion, a 20-min equilibration period was allowed prior to two 30-min clearance collections. An arterial blood sample was collected from the femoral arterial cannula to measure plasma inulin, PAH and sodium concentration at the end/mid-point of control and experimental clearance collection periods.

Analysis

Urine and plasma inulin and PAH concentrations were determined colorimetrically. Inulin and PAH clearances were calculated according to standard formulas where urinary concentration and urinary volume are divided by plasma concentration and calculated per minute and gram of kidney weight. Inulin clearance was used as an index of glomerular filtration rate (GFR) and PAH clearance as an index of renal plasma flow (RPF) [2]. Urinary 8-isoprostane concentration (a marker for O_2^- activity) was measured by enzyme immunoassay kit (Assay Design Inc; Ann Arbor, Michigan, USA) [10,11].

Data are expressed as means \pm SE. Statistical comparisons between control and experimental values in the same group were conducted by paired Student's *t*-test. Statistical comparisons among the groups were conducted by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, followed by Newman-Keuls test. A *P* value \leq 0.05 was considered statistically significant.

Results

On the day prior to the acute experimental procedure, SBP was 135 ± 6 mmHg in TGR and 129 ± 4 mmHg in HanSD, which are not statistically different, indicating the prehypertensive stage of TGR used in this study. Table 1 illustrates the baseline values of mean arterial pressure (MAP) and renal hemodynamics, as well as excretory parameters of all groups during the control period. The baseline in MAP was not significantly different in the two groups – TGR and HanSD rats. There were also no significant differences in baseline values of renal parameters in TGR and HanSD rats, except in

8-isoprostane excretion (U_{ISOV}), which was significantly higher in TGR compared to HanSD rats (Table 1). Intra-arterial infusion of vehicle (saline) did not change MAP and renal function in either TGR or HanSD during the control period (data are not presented). During acute administration of tempol and L-NAME, we recorded MAP via the right femoral artery, which allowed continuous monitoring of arterial blood pressure in anesthetized animals. Compared to control periods, the intra-arterial infusion of tempol directly into the renal artery caused no significant changes in MAP in either TGR (120 ± 3 to 117 ± 3 mmHg) or HanSD rats (115 ± 3 to 114 ± 2 mmHg). Similarly, L-NAME administration did not cause significant changes in MAP either in TGR (122 ± 3 to 125 ± 3 mmHg) or HanSD rats (117 ± 3 to 119 ± 4 mmHg).

Tempol infusion increased RPF in TGR ($10 \pm 3\%$) but not in HanSD rats, as illustrated in Fig. 1. L-NAME administration significantly decreased RPF in both TGR and HanSD rats. However, the responses in RPF were greater in TGR compared to HanSD rats ($-31 \pm 4\%$ versus $-18 \pm 3\%$; $P < 0.05$; Fig. 1). Co-infusion of tempol did not significantly attenuate the responses to L-NAME in either TGR or HanSD rats (Fig. 1). Administration of tempol increased ($8 \pm 2\%$) and L-NAME reduced GFR ($-16 \pm 4\%$) in TGR but not in HanSD rats (Fig. 2). Moreover, co-infusion of tempol significantly attenuated the responses to NO inhibition observed in TGR ($-2 \pm 3\%$).

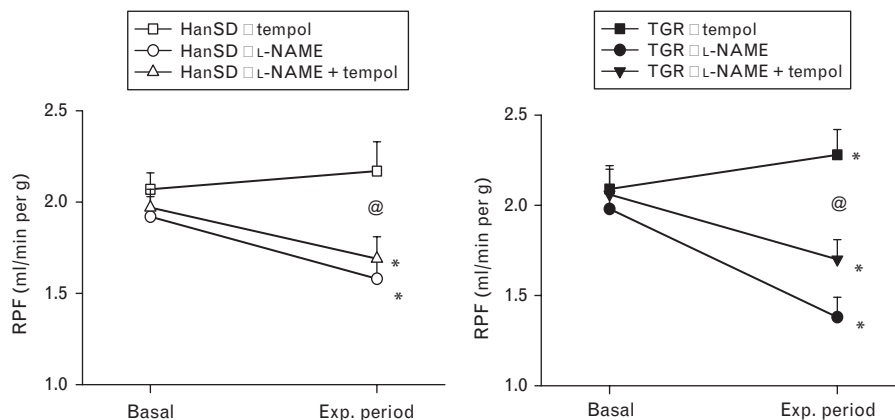
Infusion of tempol caused a diuretic effect in both TGR and HanSD rats (Fig. 3); however, the responses were greater in TGR compared to HanSD rats ($59 \pm 10\%$ versus $31 \pm 7\%$; $P < 0.05$). The antidiuretic responses to L-NAME were not statistically different in TGR and HanSD rats ($-24 \pm 4\%$ and $-16 \pm 5\%$, respectively). Co-administration of tempol reversed the antidiuretic responses to L-NAME in both groups of rat (Fig. 3). The natriuretic responses to tempol were also greater in TGR compared to HanSD rats ($112 \pm 16\%$ versus $43 \pm 7\%$; $P < 0.05$). L-NAME-induced reduction

Table 1 Basal values of mean arterial pressure, renal hemodynamics and sodium excretion (average from two control clearance periods) in TGR and HanSD rats

Group	<i>n</i>	MAP (mmHg)	RPF (ml/min per g)	GFR (ml/min per g)	V (μ l/min per g)	$U_{Na}V$ (μ mol/min per g)	FE_{Na} (%)	U_{ISOV} (pg/min per g)
HanSD								
vehicle	8	118 ± 2	1.81 ± 0.11	0.72 ± 0.08	10.8 ± 1.0	0.70 ± 0.13	0.61 ± 0.14	6.6 ± 0.6
tempol	11	115 ± 3	2.07 ± 0.09	0.74 ± 0.06	10.3 ± 1.1	0.67 ± 0.16	0.56 ± 0.10	6.5 ± 0.7
L-NAME	11	117 ± 3	1.92 ± 0.10	0.72 ± 0.04	9.5 ± 1.3	0.66 ± 0.18	0.57 ± 0.19	6.3 ± 0.6
L-NAME + tempol	11	119 ± 2	1.97 ± 0.12	0.71 ± 0.03	9.3 ± 1.2	0.69 ± 0.11	0.58 ± 0.10	6.8 ± 0.8
TGR								
vehicle	10	121 ± 3	1.98 ± 0.16	0.72 ± 0.05	9.7 ± 1.3	0.65 ± 0.11	0.51 ± 0.09	$10.5 \pm 0.6^*$
tempol	10	122 ± 3	2.09 ± 0.13	0.73 ± 0.07	10.1 ± 1.1	0.63 ± 0.13	0.57 ± 0.11	$10.2 \pm 0.8^*$
L-NAME	11	120 ± 3	1.99 ± 0.10	0.70 ± 0.08	8.9 ± 0.9	0.64 ± 0.20	0.59 ± 0.13	$9.8 \pm 0.8^*$
L-NAME + tempol	12	125 ± 2	2.07 ± 0.14	0.71 ± 0.04	9.6 ± 1.3	0.62 ± 0.15	0.55 ± 0.18	$10.5 \pm 0.9^*$

FE_{Na} , fractional sodium excretion; GFR, glomerular filtration rate; HanSD, transgene-negative Hannover Sprague-Dawley rats; L-NAME, nitro-L-arginine methyl ester; MAP, mean arterial pressure; RPF, renal plasma flow; TGR, prehypertensive Renin-2 transgenic rats; U_{ISOV} , urinary 8-isoprostane excretion; $U_{Na}V$, absolute sodium excretion; V, urine flow. Values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ versus HanSD rats.

Fig. 1

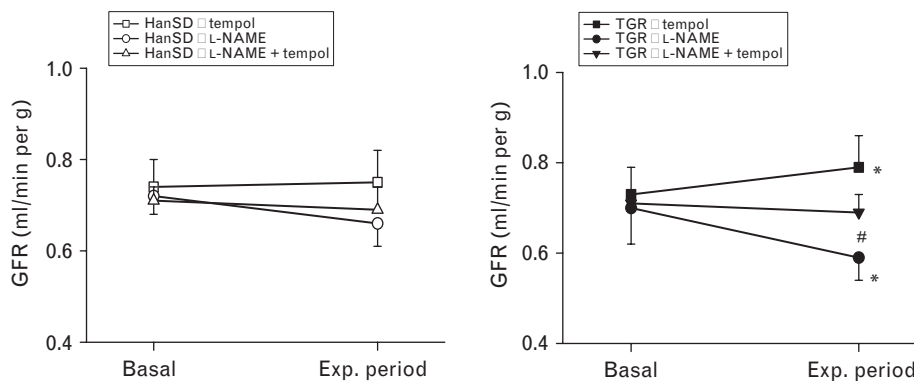


Renal plasma flow (RPF) responses to intra-arterial infusion of tempol and/or L-NAME in transgene-negative Hannover Sprague–Dawley rats (HanSD) and prehypertensive Renin-2 transgenic rats (TGR). Exp., experimental. * $P < 0.05$ versus basal values; @ $P < 0.05$ versus tempol alone.

in sodium excretion was greater in TGR compared to HanSD rats ($-39 \pm 6\%$ versus $-21 \pm 4\%$, $P < 0.05$) as shown in Fig. 4. Co-infusion of tempol also reversed the responses in sodium excretion responses to L-NAME in both rat strains. Similarly, in TGR, tempol increased fractional sodium excretion to a greater extent than in HanSD rats ($89 \pm 14\%$ versus $31 \pm 8\%$; $P < 0.05$; Fig. 5); however, L-NAME reduced fractional sodium excretion equally in TGR and HanSD rats ($-30 \pm 4\%$ and $-27 \pm 5\%$, respectively). Co-administration of tempol also reversed the responses to L-NAME in both TGR and HanSD rats (Fig. 5). As illustrated in Fig. 6, tempol caused significant decreases in $U_{ISO}V$ in TGR ($-40 \pm 3\%$), without significant changes in $U_{ISO}V$ in HanSD rats. L-NAME infusion increased $U_{ISO}V$ in HanSD ($47 \pm 6\%$), but not in TGR (Fig. 6); however, co-administration of tempol also decreased $U_{ISO}V$ in TGR ($-29 \pm 4\%$) and tempol attenuated increases in

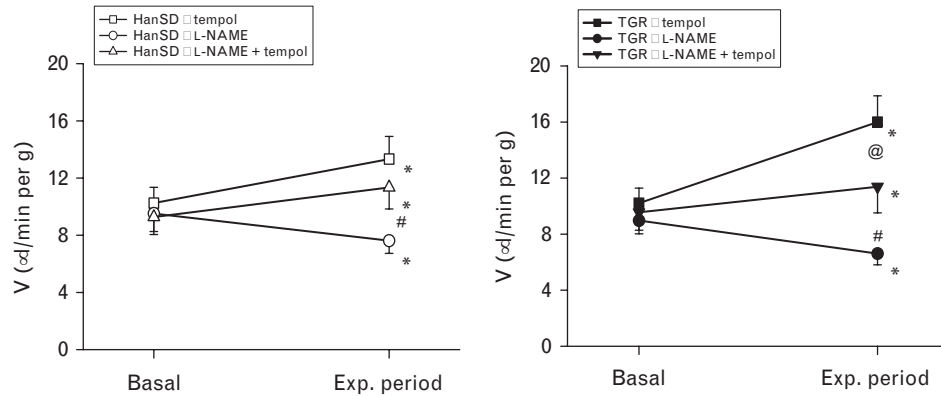
$U_{ISO}V$ observed during NO inhibition in HanSD rats (Fig. 6). The ratio between urinary 8-isoprostane and creatinine excretion was not considered in the present study as it is assumed that the plasma creatinine level remained mostly unchanged and the water intake or fluid infusion was maintained constant during the experimental protocol period of nearly 2 h in these acute experiments. It should be mentioned here that the variations in fluid volume intake may alter $U_{ISO}V$ and thus may limit its interpretation as an index of oxidative stress marker. In such cases of variations in fluid intake and consequent urine output, it is essential to normalize 8-isoprostane to creatinine concentration, which is usually filtered at a constant rate into urine; however, as fluids were administered at a constant rate in animals in our present experiments, it was unlikely that the variations in $U_{ISO}V$ were influenced by factors other than alterations in oxidative stress level in these animals.

Fig. 2



Glomerular filtration rate (GFR) responses to intra-arterial infusion of tempol and/or L-NAME in transgene-negative Hannover Sprague–Dawley rats (HanSD) and prehypertensive Renin-2 transgenic rats (TGR). Exp., experimental. * $P < 0.05$ versus basal values; # $P < 0.05$ versus L-NAME alone.

Fig. 3



Urine flow (V) responses to intra-arterial infusion of tempol and/or L-NAME in transgene-negative Hannover Sprague–Dawley rats (HanSD) and prehypertensive Renin-2 transgenic rats (TGR). Exp., experimental. * $P < 0.05$ versus basal values; @ $P < 0.05$ versus tempol alone; # $P < 0.05$ versus L-NAME alone.

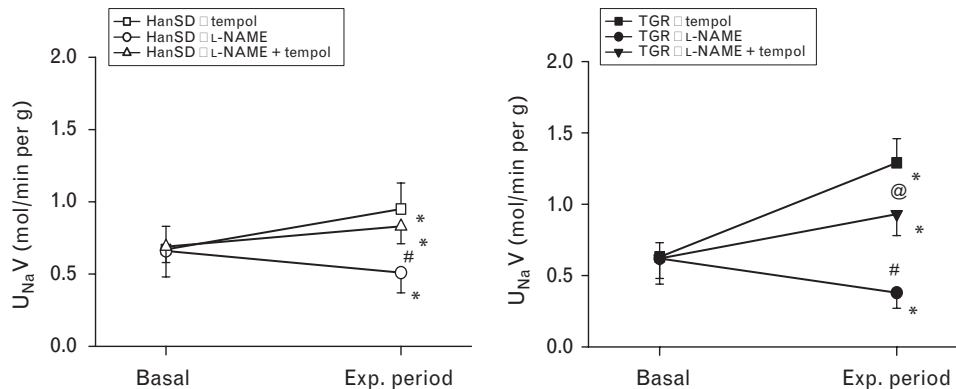
Discussion

In a previous investigation [11], the renal responses to systemic administration of a NO synthase inhibitor, L-NAME, with or without co-administration of a O_2^- scavenging agent, tempol, were evaluated in prehypertensive TGR at an early age and compared to those in aged, matched transgene, negative control HanSD rats. Interpretation of the renal effects of L-NAME/tempol in those experiments [11] was complicated due to the alteration in blood pressure due to systemic administration of these agents. Thus, uniquely, in the present study, the administration of tempol and L-NAME was made directly into the renal artery [2,9,10] to allow a more direct assessment of kidney function, avoiding the complications resulting from their systemic effects, particularly the changes in arterial pressure which have a direct influence on modulating renal hemodynamics and kidney function

[15,20]. Thus, this is the first study in prehypertensive TGR model to assess specific renal responses to reductions in endogenous O_2^- and NO levels.

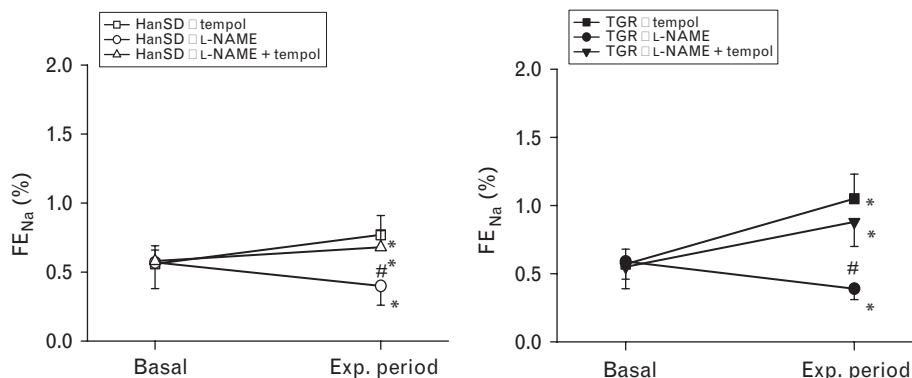
The results in the present study clearly demonstrate that O_2^- scavenging in the kidney caused increases in blood flow and glomerular filtration rate in TGR but not in HanSD rats. The natriuretic response to tempol was also greater in TGR than in HanSD rats. NO blockade in the kidney also caused comparatively greater decreases in blood flow, glomerular filtration rate and sodium excretion in TGR than in HanSD rats, which were partially reversed by scavenging O_2^- by tempol administration. These results clearly indicate that renal hemodynamic and excretory function are modulated by an enhanced O_2^- activity in normotensive TGR which contributes to the development of hypertension in this rat model.

Fig. 4



Absolute sodium excretion ($U_{\text{Na}}V$) responses to intra-arterial infusion of tempol and/or L-NAME in transgene-negative Hannover Sprague–Dawley rats (HanSD) and prehypertensive Renin-2 transgenic rats (TGR). Exp., experimental. * $P < 0.05$ versus basal values; @ $P < 0.05$ versus tempol alone; # $P < 0.05$ versus L-NAME alone.

Fig. 5



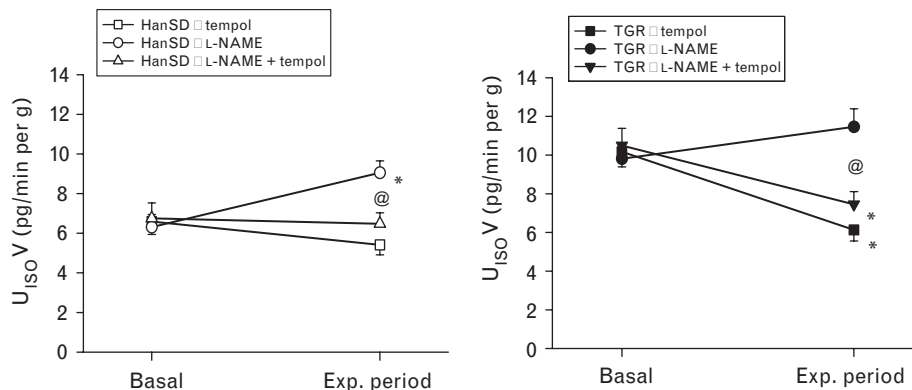
Fractional sodium excretion (FE_{Na}) responses to intra-arterial infusion of tempol and/or L-NAME in transgene-negative Hannover Sprague-Dawley rats (HanSD) and prehypertensive Renin-2 transgenic rats (TGR). Exp., experimental. **P* < 0.05 versus basal values; #*P* < 0.05 versus L-NAME alone.

It has been observed that the administration of tempol significantly increased RPF and GFR in TGR but not in HanSD rats. Moreover, tempol caused greater diuretic and natriuretic responses in TGR compared to HanSD rats. These data indicate that an enhancement of O₂⁻ activity modulates renal hemodynamics and tubular function in prehypertensive TGR. It has also been reported that TGR exhibits elevated plasma and kidney levels of ANG II in the prehypertensive phase [2,3]. ANG II activates NADPH oxidase, which is one of the major O₂⁻ generating enzymes in the body, including the kidney [5,6,21,22]. In agreement, higher expression of NADPH oxidase in the kidney was also observed in TGR [23]. Although we have not tested directly whether or not ANG II type 1 (AT₁) receptor blockade or angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition reduces O₂⁻ production in TGR, it has been demonstrated that administration of candesartan (AT₁ receptor blocker)

reduced 8-isoprostane excretion (marker of endogenous O₂⁻ activity) in Cyp1a1-Ren2 TGR with inducible hypertension [24]. Thus these results support the notion that ANG II enhances O₂⁻ production which contributes in the regulation of renal hemodynamic and excretory function in prehypertensive TGR, directly and also by diminishing the NO level.

In TGR, inhibition of NO synthase by intra-arterial L-NAME administration into the kidney led to greater attenuation of RPF and GFR compared to HanSD rats. The larger RPF and GFR responses to L-NAME in TGR could be due to the fact that renal hemodynamics were maintained by a higher NO activity in TGR, as reported previously [11]; that opposes the action of higher O₂⁻ activity in this animal model. NO inhibition by L-NAME facilitated the unopposed action of O₂⁻ in the TGR kidney and led to greater attenuation of RPF

Fig. 6



Urinary 8-isoprostane excretion (U_{ISO}V) responses to intra-arterial infusion of tempol and/or L-NAME in transgene-negative Hannover Sprague-Dawley rats (HanSD) and prehypertensive Renin-2 transgenic rats (TGR). Exp., experimental. **P* < 0.05 versus basal values; @*P* < 0.05 versus tempol alone.

and GFR compared to HanSD rats. L-NAME also reduced sodium excretion to a greater extent in TGR than HanSD rats. Similar to our earlier findings [10,17], NO inhibition led to an increase in $U_{ISO}V$ in HanSD rats in the present study, indicating an increase in O_2^- activity due to NO inhibition; however, $U_{ISO}V$ in TGR was not increased further during L-NAME infusion. In TGR, basal $U_{ISO}V$ is already at a higher level than that in HanSD rats, indicating that O_2^- activity in TGR is higher than in HanSD rats and may be at a maximal level from which further increment during L-NAME administration was limited.

In a previous study [11], RPF and GFR responses to systemic L-NAME administration were not significantly different between prehypertensive TGR and HanSD rats. The reason for this discrepancy in the results of that previous study [11] and our recent observation could be related to changes in arterial pressure due to systemic administration of the drug. However, greater renal responses to NO inhibition have been reported in other ANG II-dependent hypertensive models, such as ANG II-infused rats and Goldblatt hypertensive rats [13,25,26]. These data indicate that NO plays a renoprotective role in the maintenance of appropriate renal hemodynamic and tubular function in the prehypertensive stage in TGR.

With regard to the origin of 8-isoprostane that appears in the urine, it should be mentioned here that our present experiments may not be appropriately designed to address this; however, as we observed the changes in $U_{ISO}V$ during the manipulations of intrarenal O_2^- and NO levels by infusing tempol and L-NAME directly into the kidney, it can be assumed that these changes in $U_{ISO}V$ are mainly of renal origin.

Co-infusion of tempol with L-NAME did not cause any significant changes in RPF compared to L-NAME treatment alone in both TGR and HanSD rats. This is not unexpected as a similar observation was also noted in previous studies in dogs [17]. It should be emphasized here that the expected vasodilator effect of scavenging O_2^- is primarily due to the action of increased bioavailability of NO in the vasculature [9,18,27]. Thus scavenging O_2^- by tempol during effective blockade of NO synthase by L-NAME will not produce any significant reverse vasodilatory effect. Tempol attenuated the reductions in GFR in response to L-NAME in TGR, suggesting that the O_2^- and NO interact with each other in regulating the glomerular hemodynamic, possibly by altering preglomerular vascular resistance [10,22,28] in these animals. In NO-inhibited anesthetized dogs, the marked reduction in GFR in response to acute administration of ANG II was also shown to be attenuated by tempol administration [14]. In the present study, tempol also reversed the antinatriuretic effect of

NO inhibition in both TGR and HanSD rats. Similar results were also observed in the previous studies in dogs [17] and in L-NAME-induced hypertensive rats [10]. Moreover, tempol attenuated increases in $U_{ISO}V$ observed during NO inhibition in HanSD rats and also reduced $U_{ISO}V$ in TGR. These data further demonstrate a renoprotective effect of NO against the action of O_2^- influencing renal tubular function [8,10,14,17,27,29].

It may be argued that a nitroxide compound such as tempol may have nonspecific effects other than scavenging O_2^- [30]. In previous studies [17,31] this issue of selectivity was tested by comparing the effects of tempol with that of 3-carbamoyl-proxyl (3-CP), another nitroxide compound chemically similar to tempol but lacking O_2^- scavenging effects. In those studies [17,31] it was observed that, in the condition of enhanced oxidative stress, tempol exerts renal and systemic vasodepressor actions as well as diuresis and natriuresis but such effects were absent with administration of equimolar concentrations of 3-CP. There was a decrease in $U_{ISO}V$ during tempol but not during 3-CP administration [17], confirming that among other nitroxide compounds tempol has high selectivity as a scavenger of O_2^- . At present, no agent other than tempol is known to have more selectivity as a O_2^- scavenger and can be used systemically *in vivo* without cytotoxicity [11,18,24,32,33].

It may also be argued that there is the possibility of a chemical interaction between the agents tempol and L-NAME during combined infusion that may have influenced the results of these experiments. This possibility is unlikely as the tempol and L-NAME co-infusion has been used in many previous studies from our laboratory [11,14,17,31] as well as others [18,24,29], and these results did not indicate any such chemical interaction between these two agents that could affect the findings of the experiments.

Although we have not determined the enzymatic activities producing O_2^- and NO in these prehypertensive TGR, previous studies have shown that chronic ANG II administration activates NADPH oxidase, leading to enhanced O_2^- generation in many organs, including the kidney [5,6,21–23,27]. Moreover, extracellular superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase expression in the kidney is significantly reduced in ANG II-infused rats [6,32,34] and thus the ability of enzymatic O_2^- degradation, as well as the degradation of other reactive oxygen species, may also be reduced in TGR. Further experiments are needed to assess the activities of these enzymes in TGR.

Although our present acute experiments to study kidney function do not address the regulation of systemic blood pressure directly, we realize the dire importance of conducting these experiments with a chronic set-up in

conscious animals, to see the impacts of renal NO and O_2^- interactions on systemic blood pressure. In previous studies, chronic systemic administration of tempol has been shown to ameliorate hypertension induced by chronic ANG II administration in rats and mice [32,33], and acute systemic administration of tempol reduced arterial pressure in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with inducible malignant hypertension [24], implicating a role for oxidative stress in the ANG II-dependent form of hypertension. In the present study, we demonstrated an interactive role of NO/ O_2^- in the kidney that modulates the renal hemodynamics and excretory function at the prehypertensive stage of TGR. In our earlier study in ANG II-induced hypertensive rats [9], we also observed such an interactive role of NO/ O_2^- in modulating kidney function. Such modulation of renal function leads to progressive sodium retention, which could be linked mechanistically to the development of hypertension under conditions of elevated endogenous ANG II, as in the TGR model.

How much of the renal action of NO is due to decreasing O_2^- and how much is due to other actions of NO still remains to be resolved. The present experiment is not appropriately designed to address this issue quantitatively; however, the results of the present study and also our earlier studies [9,10,14,17] have generally shown that the effects of tempol on reversing the renal and systemic responses to L-NAME are quantitatively variable, depending on the underlying production status of both the endogenous factors (NO and O_2^-). These results indicate that an interaction between these factors determines the final status of their endogenous levels, which vary under different conditions (normal or oxidative stress) to produce a resultant biological action. Under normal conditions, the actions of NO other than decreasing O_2^- have a major contributory role in regulating kidney function; however, under conditions of oxidative stress, such relative contributory roles of endogenous NO may differ widely, depending on the production levels of both these factors (NO and O_2^-). Thus, more comprehensive experiments are needed to resolve this issue in future studies.

In conclusion, these data suggest that the enhanced generation of O_2^- and its interaction with NO in prehypertensive TGR modulate renal hemodynamics and excretory function, and thus may play a role in the development of hypertension in this transgenic rat model.

Acknowledgements

We acknowledge the generous gift of the stock animals supplied by Professors Bader and Ganten, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin. This study was supported by the National Heart, Lung and Blood Institute Grant HL-66432 and by grant No. NR/7956-3

awarded to L.C. by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic. L.C. is also supported by institutional finance support from the Institute for Clinical and Experimental Medicine (# MZO 00023001) and by financial support from the Center for Cardiovascular Research (#1M6798582302).

There are no conflicts of interest.

References

- Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harboring the mouse *Ren-2* gene. *Nature* 1990; **344**:541–544.
- Kopkan L, Kramer HJ, Huskova Z, Vanourkova Z, Skaroupkova P, Thurmová M, Cervenka L. The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 2005; **23**:1531–1539.
- Huskova Z, Kramer HJ, Vanourkova Z, Cervenka L. Effects of changes in sodium balance on plasma and kidney angiotensin II levels in anesthetized and conscious Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 2006; **24**:517–527.
- Gross V, Lippoldt A, Schneider W, Luft FC. Effect of captopril and angiotensin II receptor blockade on pressure natriuresis in transgenic TGR(mRen2)27 rats. *Hypertension* 1995; **26**:471–479.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; **97**:1916–1923.
- Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **285**:R117–R124.
- Zou AP, Li N, Cowley AW Jr. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension* 2001; **37**:547–553.
- Majid DSA, Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 2002; **39**:293–297.
- Kopkan L, Castillo A, Navar LG, Majid DS. Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**:F80–F86.
- Kopkan L, Majid DS. Enhanced superoxide activity modulates renal function in NO-deficient hypertensive rats. *Hypertension* 2006; **47**:568–572.
- Vaneckova I, Kramer HJ, Novotna J, Kazdova L, Opocensky M, Bader M, et al. Roles of nitric oxide and oxidative stress in the regulation of blood pressure and renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res* 2005; **28**:117–126.
- Navar LG, Ichihara A, Chin SY, Imig JD. Nitric oxide–angiotensin II interactions in angiotensin II-dependent hypertension. *Acta Physiol Scand* 2000; **168**:139–147.
- Chin SY, Wang CT, Majid DS, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol* 1998; **274**:F876–F882.
- Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric oxide synthase inhibition in anesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **288**:F412–F419.
- Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 2001; **14**:74S–82S.
- Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2001; **3**:203–213.
- Majid DSA, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **287**:R27–R32.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998; **32**:59–64.
- Dvorak P, Kramer HJ, Backer A, Maly J, Kopkan L, Vaneckova I, et al. Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Res* 2004; **27**:248–258.

- 20 Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the mediation of pressure natriuresis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; **24**:595–599.
- 21 Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **289**:R913–R935.
- 22 Haque MZ, Majid DS. Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91PHOX subunit of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2004; **43**:335–340.
- 23 Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin–angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**:1456–1464.
- 24 Patterson ME, Mouton CR, Mullins JJ, Mitchell KD. Interactive effects of superoxide anion and nitric oxide on blood pressure and renal hemodynamics in transgenic rats with inducible malignant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**:F754–F759.
- 25 Nishiyama A, Fujisawa Y, Fukui T, Rahman M, Kondo N, Ogawa Y, *et al.* Role of nitric oxide in regional blood flow in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 2001; **24**:421–427.
- 26 Dedeoglu IO, Springate JE. Effect of nitric oxide inhibition on kidney function in experimental renovascular hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2001; **23**:267–275.
- 27 Lopez B, Salom MG, Arregui B, Valero F, Fenoy FJ. Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension* 2003; **42**:1150–1156.
- 28 Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand* 2003; **179**:217–223.
- 29 Ortiz PA, Garvin JL. Interaction of O₂(⁻) and NO in the thick ascending limb. *Hypertension* 2002; **39**:591–596.
- 30 Xu H, Jackson WF, Fink GD, Galligan JJ. Activation of potassium channels by tempol in arterial smooth muscle cells from normotensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 2006; **48**:1080–1087.
- 31 Dutta UK, Lane J, Roberts LJ 2nd, Majid DS. Superoxide formation and interaction with nitric oxide modulate systemic arterial pressure and renal function in salt-depleted dogs. *Exp Biol Med* 2006; **231**:269–276.
- 32 Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288**:H22–H28.
- 33 Kawada N, Imai E, Karber A, Welch WJ, Wilcox CS. A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**:2860–2868.
- 34 Pech V, Sikka SC, Sindhu RK, Vaziri ND, Majid DS. Oxidant stress and blood pressure responses to angiotensin II administration in rats fed varying salt diets. *Am J Hypertens* 2006; **19**:534–540.