

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

INSTITUT KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY

Pracoviště experimentální medicíny

**Úloha intrarenálního renin-angiotenzinového
systému v rozvoji hypertenze
u Ren-2 transgenních potkanů**

Dizertační práce

Autor práce: **Mgr. Zuzana Husková**

Praha 2006

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se mnou v průběhu mého postgraduálního studia spolupracovali a vycházeli mi vstříc. Především chci poděkovat Ing. Zdeňce Vaňourkové, CSc. za významnou pomoc s prováděním vlastních pokusů a RNDr. Ivaně Vaněčkové, CSc. za věcné připomínky a rady při sepisování mé dizertační práce. Velký dík patří také mému školiteli Doc. MUDr. Ludřku Červenkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost, ochotu, pomoc a cenné rady.

Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za jejich podporu, pomoc a vytvořené zázemí.

Úvodní prohlášení

Všechny pokusy provedené v rámci následujících studií byly provedeny dle standardů Americké fyziologické společnosti a odborné komise na ochranu zvířat proti týrání v Institutu Klinické a Experimentální Medicíny v Praze a jsou plně v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání. Pro každou studii byl vypracován vlastní projekt pokusu, který byl schválen odbornou Komisí na ochranu zvířat proti týrání v IKEM a příslušnou rezortní komisí MZ ČR.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	8
2. Renin-angiotenzinový systém	10
2.1 Klasický renin-angiotenzinový systém	10
2.2 Lokální tkáňové renin-angiotenzinové systémy	20
2.2.1 Intrarenální RAS	20
2.2.2 Srdeční RAS	22
2.2.3 Cévní RAS	23
2.2.4 Nadledvinový RAS	23
3. Modely hypertenze	24
3.1 2K1C Goldblattův hypertenzní kmen	24
3.2 ANG II-infundování potkanů	26
3.3 Kmeny transgenních potkanů	27
3.3.1 Hypertenzní transgenní kmen TGR(mRen2) ²⁷	28
3.3.2 Transgenní kmen TGR(Cyp1a1-Ren2) s indukovatelnou hypertenzí	30
4. <u>Studie č. 1:</u>	
Vliv anestézie na plazmatické a renální koncentrace angiotenzinu II u normotenzních a ANG II-dependentních hypertenzních potkanů	32
A. Úvod	32
B. Experimentální část	35
C. Výsledky	39
D. Diskuse	48
E. Souhrn výsledků	53

5. <u>Studie č. 2:</u>	
Vliv změn sodíkové rovnováhy na plazmatické a renální koncentrace ANG II u anestetizovaných a bdělých Ren-2 transgenních potkanů	54
A. Úvod	55
B. Experimentální část	57
C. Výsledky	59
D. Diskuse	67
E. Souhrn výsledků	71
6. <u>Studie č. 3:</u>	
Účinky zvýšeného a sníženého příjmu soli na průběh hypertenze a na koncentrace angiotenzinu II u Ren-2 transgenních samic	72
A. Úvod	72
B. Experimentální část	74
C. Výsledky	75
D. Diskuse	86
E. Souhrn výsledků	89
7. Závěrečné shrnutí výsledků	90
Literatura	91
Publikace	110

Seznam použitých zkratek

2K1C	„two-kidney, one-clip“ (dvouledvinový, jednosvorkový) Goldblattův model hypertenze
ACE	angiotenzin-konvertující enzym
ACE 2	angiotenzin-konvertující enzym 2
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ANG I	angiotenzin I (taktéž nazývaný ANG 1-10)
ANG II	angiotenzin II (taktéž nazývaný ANG 1-8)
ANG III	angiotenzin III (taktéž nazývaný ANG 2-8)
ANG IV	angiotenzin IV (taktéž nazývaný ANG 3-8)
ANG-(1-4)	angiotenzin 1-4
ANG-(1-5)	angiotenzin 1-5
ANG-(3-5)	angiotenzin 3-5
ANG-(1-7)	angiotenzin 1-7
ANG-(2-7)	angiotenzin 2-7
ANG-(3-7)	angiotenzin 3-7
ANG-(1-9)	angiotenzin 1-9
Aogen	angiotenzinogen
AP A, N, M, B	aminopeptidáza A, N, M, B
AT ₁ , AT ₂	receptory pro angiotenzin II typu 1 a 2
AT _{1A} , AT _{1B}	receptory pro angiotenzin II typu 1, subtypu A a B
AT ₄	receptory pro angiotenzin IV
BK	bradykinin
BSA	bovinní sérový albumin
BW	tělesná hmotnost (body weight)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOCA	deoxykortikosteronacetát
EDTA	disodná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové
F	furosemid
FE _K	frakční vylučování draslíku
FE _{Na}	frakční vylučování sodíku
FSH	folikuly stimulující hormon

GF	glomerulární filtrace
HanSD	normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley
HCG	lidský choriogonadotropin
HS dieta	dieta s vysokým obsahem soli
HW	hmotnost srdce (heart weight)
i.p.	intraperitoneálně
IRAP	inzulínem-regulované aminopeptidázy
JG buňky	juxtaglomerulární buňky
KW	hmotnost ledviny (kidney weight)
LH	luteinizační hormon
LS dieta	dieta s nízkým obsahem soli
MAP	střední arteriální tlak (mean arterial pressure)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NEP 24.11	neutrální endopeptidáza 24.11
NO	oxid dusnatý
NO-BK-cGMP	oxid dusnatý-bradykinin-cyklický guanosinmonofosfát
NS dieta	dieta s normálním obsahem soli
O ₂ ⁻	superoxid
OECT	objem extracelulární tekutiny
PAH	p-aminohippurová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEP	prolyl-endopeptidáza
PPL	průtok plazmy ledvinou
PRA	plazmatická reninová aktivita
RAS	renin-angiotenzinový systém
RIA	radio-imunoanalýza
SARS-CoV	„severe acute respiratory syndrome-coronavirus“
SBP	systolický krevní tlak (systolic blood pressure)
TGR	TGR(mRen2) ²⁷ ; hypertenzní transgenní potkani nesoucí myší Ren-2 reninový gen
TK	krevní tlak
tk.	tkáň
U _K V	absolutní vylučování draslíku
U _{Na} V	absolutní vylučování sodíku

1. Úvod

Historie renin-angiotenzinového systému (RAS) sahá až do 19. století. Za neúčinnější složku RAS je stále považován ANG II. Tento oktapeptid hraje důležitou roli v kontrole objemu tělních tekutin, v regulaci krevního tlaku a v kardiovaskulárním remodelingu prostřednictvím přímých účinků na syntézu proteinů, na buněčný růst a diferenciaci buněk, na indukci růst-podporujících genů a na utlumení syntézy kyslíkových radikálů, prostanoidů či cytokinů.

Hlavním cílem této dizertační práce bylo zjistit, jakou úlohu hraje interakce mezi systémovým a intrarenálním RAS v rozvoji hypertenze. Vycházeli jsme z následující hypotézy: u transgenních potkanů dochází v období rozvoje hypertenze k urychlené intrarenální tvorbě ANG II, která není následována přiměřeným útlumem exprese AT_1 receptorů v renálním řečišti a v oblasti tubulárního systému ledvin. Kombinace těchto dvou faktorů je odpovědná za zvýšenou renální vaskulární rezistenci, zvýšenou tubulární reabsorpci sodíku a celkové zhoršení funkce tlakově-natriuretického mechanismu ledvin a následný rozvoj hypertenze.

Celá práce je rozdělena do několika kapitol. První část je zaměřena na klasický RAS, na jeho známé i nově objevené hlavní složky a na jednotlivé lokální tkáňové RAS. Hlavním tématem druhé části jsou zvířecí modely hypertenze. Jsou zde popsány čtyři modely experimentální hypertenze, které jsou používány v naší laboratoři. Poslední a zároveň největší část tvoří vlastní studie.

Cílem první studie bylo stanovit koncentrace ANG II v plazmě a v ledvinné tkáni u anestezovaných, chirurgicky stresovaných zvířat a naproti tomu u bdělých zvířat. Doposud nebyl studován vliv anestézie u ANG II-dependentních modelů hypertenze a také nebyla provedena podrobnější studie srovnávající plazmatické a renální koncentrace ANG II u experimentálních modelů ANG II-dependentní formy hypertenze a u normotenzních kontrolních potkanů. Je všeobecně známo, že anestézie ovlivňuje koncentrace ANG II. Bdělá zvířata byla usmrcena dekapitací, tudíž naměřené koncentrace ANG II nebyly ovlivněny anestézií.

Hlavní roli v patofyziologii hypertenze u ANG II-dependentních modelů hraje ANG II, proto jsme se dále rozhodli stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II v jednotlivých fázích rozvoje hypertenze. Jako experimentální model jsme si vybrali hypertenzní transgenní kmen TGR(mRen2)²⁷, který představuje geneticky přesně

definovaný model ANG II-dependentní formy hypertenze. S ohledem na význam ANG II v rozvoji sůl-senzitivní hypertenze a zjištění, že TGR vykazují sůl-senzitivní složku hypertenze, bylo naším dalším úkolem ověřit účinky diety s vysokým a s nízkým obsahem soli na krevní tlak a na plazmatické i renální koncentrace ANG II.

Co se týče rozvoje a průběhu hypertenze, řada studií popisuje u TGR sexuální dimorfismus. Samci mají vyšší krevní tlak (TK) a vážnější hypertenzí vyvolané orgánové poškození v porovnání se stejně starými samicemi. Navíc TK heterozygotních TGR samic se ve stáří spontánně vrací až k normotenzním hladinám. Posledním úkolem tedy bylo stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II v průběhu rozvoje hypertenze u anestetizovaných i bdělých samic a taktéž ověřit vliv sodíkové rovnováhy na krevní tlak a ANG II koncentrace.

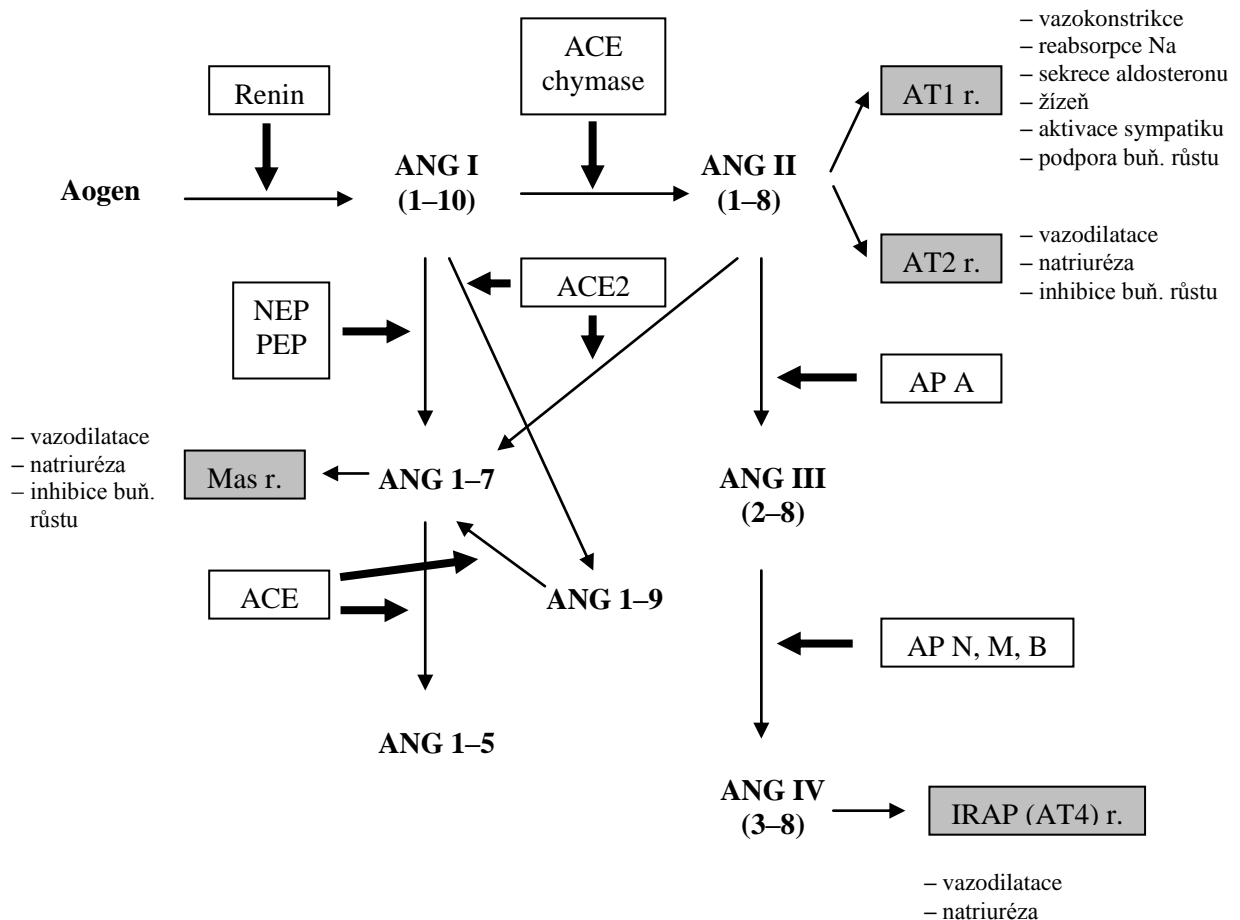
2. Renin-angiotenzinový systém

2.1 Klasický renin-angiotenzinový systém

Základní a nejdůležitější funkcí renin-angiotenzinového systému (RAS) je udržovat relativně konstantní složení elektrolytů, objem extracelulární tekutiny (OECT) a arteriální tlak. RAS je výrazně aktivován při sníženém příjmu solí a tekutin s následným poklesem OECT, při krvácení a při poklesu TK. V případě jeho nepřiměřené aktivace vyvolané nadbytkem solí v potravě či poškozením ledvin je RAS hlavním přispěvatelem k rozvoji hypertenze.

Jednotlivé komponenty RAS jsou znázorněny na obr. č. 1.

Obrázek č. 1: Schéma renin-angiotenzinového systému



V játrech syntetizovaný glykoprotein angiotenzinogen je jediným substrátem pro karboxypeptidázu renin. Renin je syntetizován v ledvinách, v juxtaglomerulárních (JG) buňkách. Z angiotenzinogenu odštěpuje málo účinný decapeptid angiotenzin I (ANG I, taktéž nazývaný ANG 1-10). 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 decapeptidu ANG I, a tak vzniká vysoce účinný oktapeptid ANG II (ANG 1-8), který je stále považován za nejúčinnější peptid renin-angiotenzinového systému. ANG II je rychle metabolizován enzymy, které se souhrnně nazývají angiotenzinázy. Aminopeptidáza A (AP A) odstraňuje jeden aminokyselinový zbytek z N-terminálního konce řetězce ANG II za vzniku heptapeptidu ANG III (ANG 2-8), který je štěpen dalšími aminopeptidázami (AP) na hexapeptid ANG IV (ANG 3-8). Přímou z ANG II je pomocí karboxypeptidázy ACE2 produkován heptapeptid ANG 1-7. Tento peptid vzniká i štěpením ANG I endopeptidázami (NEP a PEP). ACE2 také konvertuje ANG I na ANG 1-9, jehož funkce zatím není známa [Reudelhuber 2005].

Existují dva hlavní typy receptorů pro ANG II – AT_1 a AT_2 receptory, které mají proteinovou povahu a patří mezi tzv. serpentínové s G proteinem-svázané receptory (7x procházejí buněčnou membránou). AT_1 receptory zprostředkovávají hlavní fyziologické účinky ANG II. Myši a potkani, na rozdíl od člověka, mají dvě formy těchto receptorů označované jako AT_{1A} a AT_{1B} receptory [Campbell 2003]. Funkce AT_2 receptorů jsou stále předmětem zkoumání. Prostřednictvím AT_1 , AT_2 a specifických ANG III receptorů působí také ANG III [Campbell 2001]. Účinky ANG IV jsou zprostředkovány pomocí AT_4 receptorů, které patří mezi inzulinem-regulované aminopeptidázy (IRAP) [Albiston et al. 2001]. AT_4 receptory byly poprvé identifikovány v nadledvinách hovězího dobytka. Kromě toho se tyto receptory vyskytují ve velké míře v mozku a v periferních orgánech [Albiston et al. 2001]. ANG-(1-7) působí přes Mas receptor [Santos et al. 2003, Kostenis et al. 2005].

V rámci RAS existují dvě odlišná ramena pro tvorbu aktivních angiotenzinů – vazokonstriční a vazodilatační. Vazokonstriční rameno je reprezentováno tvorbou a degradací hypertenzního, růst-stimulujícího peptidu ANG II. Vazodilatační rameno je antagonistou prvního ramene, dává vznik vazodilatátoru ANG-(1-7) s antiproliferačními účinky. Rovnováhu mezi oběma rameny udržuje ACE2. Případná nerovnováha mezi těmito rameny může vést ke vzniku hypertenze či hypotenze.

Angiotenzinogen

= Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-[des-ANG I-angiotenzinogen]

V roce 1957 byla objasněna sekvence prvních 14 aminokyselin koňského angiotenzinogenu, včetně štěpného místa pro renin. V 80-tých letech 20. století byla díky klonování a sekvenování krysího a lidského angiotenzinového genu objasněna jeho primární struktura [Morgan et al. 1996]. Neglykosylovaný protein je tvořen jednoduchým polypeptidovým řetězcem 452 aminokyselin o celkové molekulové hmotnosti 49 770 Da. Potenciální glykosylační místa se nacházejí v pozicích 14, 137, 271 a 295 [Campbell et al. 1985]. Strukturu angiotenzinového genu popsaly dvě skupiny badatelů – Gaillard a spol., Fukamizu a spol. [Gaillard et al. 1989, Fukamizu et al. 1990]. Lidský angiotenzinový gen se skládá z pěti exonů a čtyř intronů o celkové délce 12 kb.

Angiotenzinogen je primárně syntetizován v játrech a uvolňován do cirkulace, kde je štěpen reninem za vzniku ANG I. Koncentrace angiotenzinogenu v cirkulaci jsou přibližně 1000x větší než koncentrace volného cirkulujícího ANG I a ANG II [Zou et al. 1996]. Rychlost tvorby ANG I závisí na plazmatické reninové aktivitě (PRA), která je regulována tempem uvolňování reninu z JG buněk ledvin. Jeho hladina v cirkulaci je zvyšována glukokortikoidy, hormony štítné žlázy a estrogeny [Ganong 1995]. Angiotenzinogen je syntetizován a uvolňován také ze srdeční, cévní, ledvinné a tukové tkáně [Carey and Siragy 2003a].

Angiotenzinogen je „rezervoárem“ ANG I, což je jeho jediná jednoznačně prokázaná funkce.

Angiotenzin I

= Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

Díky rozšířené lokalizaci ACE v mnoha krévních řečištích a tkáních může být ANG I lokálně konvertován na ANG II ve všech tkáních.

Angiotenzin II (ANG II)

= Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Na rozdíl od reninu a angiotenzinogenu, které mají relativně dlouhý poločas rozpadu, je ANG II degradován peptidázami během několika sekund [Carey and Siragy 2003a].

ANG II stimuluje uvolňování aldosteronu, uvolňování katecholaminů z dřene 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 [Navar et al. 1999]. V krevních cévách vyvolává vazokonstrikci. Většina hypertenzogenních účinků ANG II (vazokonstrikce, retence sodíku) je zprostředkována přes AT₁ receptory. ANG II také vykazuje významné dlouhodobé proliferační účinky [Wolf and Neilson 1993]. ANG II dále přispívá k zánětu a fibróze ledvin, což má za následek změny v renálních funkcích a ve výši krevního tlaku [Siragy 2006]. Neprochází hematoencefalickou bariérou, ale je produkován lokálně. ANG II je klíčovým faktorem v patofyziologii a v rozvoji hypertenze, onemocnění ledvin, aterosklerózy, diabetu a srdečního selhání.

Angiotenzinové receptory AT₁ a AT₂

AT₁ receptory jsou široce rozšířeny po celých ledvinách. Jsou lokalizovány na buňkách hladké svaloviny renálních cév, včetně aferentní i eferentní arterioly a glomerulárních mesangiálních buněk, dále na kartáčovém lemu a bazolaterálních membránách buněk proximálního tubulu, na buňkách epitelia tlustého vzestupného raménka Henleho kličky, distálního tubulu, korové i dřeňové části sběracího kanálku, macula densa a na glomerulárních podocytech [Miyata et al. 1999, Harrison-Bernard et al. 1997]. Podobně AT₁ mRNA byla nalezena v proximálním tubulu, v tlustém vzestupném raménku Henleho kličky, v buňkách korové i dřeňové části sběracího kanálku, v glomerulu, v cévách, ve vasa recta a JG buňkách [Carey and Siragy 2003b, Navar et al. 2002]. Kromě ledvin (retence vody a soli) se AT₁ receptory vyskytují také v řadě dalších orgánů včetně srdce (zprostředkování pozitivních ionotropních a chronotropních účinků Ang II na kardiomyocyty), mozku (uvolňování vazopresinu, žížeň, 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). Jak již bylo uvedeno výše, u potkanů a myší existují 2 subtypy AT₁ receptorů – AT_{1A} a AT_{1B}. Co se týče ledvin, u hlodavců se AT_{1B} mRNA nachází převážně v glomerulu, kdežto v ostatních částech nefronu převládá subtyp AT_{1A} [Navar et al. 2002].

Selektivními antagonisty AT₁ receptorů jsou bifenylimidazoly, tj. losartan, candesartan a irbesartan. Blokáda intrarenálních AT₁ receptorů, za podmínek minimálního snížení arteriálního tlaku, vyvolá signifikantní zvýšení GF, průtoku krve

ledvinou, celkové i frakční exkrece sodíku [Cervenka et al. 1998, Cervenka and Navar 1999b, Cervenka et al. 1999c, Wang et al. 1997].

AT₂ receptory jsou vysoce 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 ovlivňují AT₂ receptory renální produkci reninu [Siragy et al. 2005]. Regulují aktivitu RAS tím, že inhibují syntézu reninu. Mezi selektivní ligandy AT₂ receptorů patří tetrahydroimidazolpyridiny PD123319 a PD123177 a dále CGP42112.

AT₁ receptory se skládají z 359 aminokyselin. Naproti tomu AT₂ receptory jsou tvořeny 363 aminokyselinami a s AT₁ receptory se shodují přibližně ve 30 %. Oba typy receptorů mají molekulovou hmotnost 41 kDa. Obecně jsou účinky Ang II zprostředkované přes AT₁ a AT₂ receptory opačné. Zatímco AT₁ receptory stimulují reabsorpci sodíku, AT₂ receptory zvyšují exkreci sodíku. AT₁ receptory podporují buněčný růst, naopak AT₂ receptory vyvolávají antiproliferaci a diferenciaci buněk [Dinh et al. 2001]. Stimulací AT₁ receptorů způsobuje ANG II vazokonstrikci cév, kdežto AT₂ receptory zprostředkovávají pomocí stimulace NO-BK-cGMP kaskády cévní vazodilataci [Siragy 2006]. Zablokování aktivity AT₁ receptorů způsobí signifikantní snížení krevního tlaku.

Angiotenzin-(1-7)

= Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro

Biologická aktivita ANG-(1-7) byla poprvé prokázána v roce 1988 [Schiavone et al. 1988]. Od té doby řada autorů dospěla k závěru, že ANG-(1-7) je biologicky aktivní produkt RAS. 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]. ANG-(1-7) je tvořen přímo z ANG I účinkem endopeptidáz (NEP 24.11, PEP, thimet oligopeptidázy) nebo z ANG II působením ACE2. ACE2 je vysoce účinný enzym pro vznik ANG-(1-7) z ANG II, v tomto případě

je téměř 500x účinnější než při tvorbě ANG-(1-9) z ANG I. Syntetizovaný ANG-(1-7) je poté štěpen pomocí ACE na biologicky neaktivní ANG-(1-5) a ANG-(3-5) a působením aminopeptidáz na ANG-(2-7) a ANG-(3-7). 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. Na kartáčovém lemu buněk renálních tubulů štěpí neprilysin ANG-(1-7) na ANG-(1-4) [Kucharewicz et al. 2002]. ANG-(1-7) je inhibitorem -COOH domény ACE a na rozdíl od ANG II je rozklad ANG-(1-7) pomocí ACE zprostředkován prostřednictvím -NH₂ domény ACE [Deddish et al. 1998].

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) (10^{-8} – 10^{-13} M) mohou ovlivnit renální funkce v proximálním i v distálním tubulu [Chappell et al. 1998, Santos et al. 2000]. V ledvinách vedou účinky ANG-(1-7) 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) může také regulovat účinky tubulárního vazopresinu působením na jeho V2 receptor [Ferrario et al. 2002, Magaldi et al. 2003]. V srdci působí ANG-(1-7) proti hypertrofickým, pro-fibrotickým a pro-trombotickým účinkům ANG II a také zvyšuje průtok krve v myokardu [Ferrario and Chappell 2004, Kucharewicz et al. 2002]. ANG-(1-7) přispívá k antihypertenzním účinkům ACE inhibitorů a inhibitorů ANG II receptorů. U lidí korelovaly chronické antihypertenzivní účinky léčby kaptoprilem či omapatrilátem se zvýšenými hladinami ANG-(1-7) v moči [Ferrario et al. 2005]. Inhibice ACE zvyšuje koncentrace heptapeptidu v krvi a ve tkáních tak, že brání ACE-zprostředkované degradaci tohoto peptidu a zvyšuje dostupnost substrátu ANG I. Blokáda ANG II receptorů zvyšuje koncentrace ANG-(1-7) v krvi a ve tkáních díky následné rostoucí dostupnosti substrátu ANG I a rychlejší přeměně ANG II na ANG-(1-7) vlivem zvýšené exprese a aktivity ACE2. U potkanů je březost spojována se zvýšenými renálními koncentracemi ANG I a ANG-(1-7) a také se zvýšenou exkrecí heptapeptidu [Neves et al. 2003].

Bürgelová a spol. [Bürgelova et al. 2005] ve své nedávné studii zjistili, že ANG(1-7) není významným faktorem regulace renálních funkcí za normální aktivity RAS nebo za zvýšené aktivity RAS v důsledku exogenního podání ANG II, či vložení reninového genu potkanům bez omezení příjmu soli. Naopak, za podmínek endogenní

aktivace RAS následkem naložení svorky na renální artérii nebo díky omezení příjmu soli slouží ANG-(1-7) jako oponent vazokonstričním účinkům ANG II.

Obecně ANG-(1-7) působí proti účinkům ANG II a to tak, že stimuluje NO a vazodilatační prostaglandiny. Dále ANG-(1-7) zesiluje účinek bradykininu (BK), napomáhá uvolňování prostaglandinů z vaskulárních endoteliálních a hladkých svalových buněk, uvolňování NO, vazodilataci, inhibici růstu vaskulárních buněk a zeslabuje ANG II indukovanou vasokonstrikci [Carey and Siragy 2003a]. Bylo zaznamenáno, že ANG-(1-7) působí jako antiarytmický činitel (aktivuje sodíkovou pumpu, hyperpolarizuje srdeční buňky a obnovuje vedení impulsů během ischemické reperfuze), může inhibovat oxidativní stres, stimuluje agregaci destiček a funguje jako protizánětlivý činitel [Ferrario et al. 2005].

Deficit v syntéze či aktivitě ANG-(1-7) může přispívat k rozvoji hypertenze s porušenou regulací vnitřních kontrolních mechanismů v důsledku genetických či získaných změn v aktivitě ANG-(1-7)-formujících či -degradujících enzymů.

Specifický receptor pro ANG-(1-7) zatím nebyl klonován, ačkoliv existuje důkaz o jeho existenci a nedávné studie naznačují, že ANG-(1-7) je endogenním ligandem pro s G proteinem-spřažený receptor Mas [Santos et al. 2003]. ANG-(1-7) také reaguje s AT₁ receptorem a některé jeho účinky mohou být blokovány losartanem. Další účinky ANG-(1-7) mohou být inhibovány antagonisty AT₂ receptorů. Tato pozorování poukazují na možnost interakce mezi receptory ANG II a ANG-(1-7) [Santos et al. 2000]. Kostenis a spol. nedávno zjistili, že Mas receptor působí jako antagonist AT₁ receptoru [Kostenis et al. 2005]. Mas receptor vytváří spolu s AT₁ receptorem hetero-oligomerní komplex, a tím inhibuje účinky ANG II. Vytvořený komplex není ovlivňován přítomností agonistů ani antagonistů obou receptorů.

Renin

Renin byl objeven v 2. pol. 19. stol. fyziology R. Tigerstedtem a P. Bergmanem. Hormon renin je ledvinami produkována aspartylproteáza s molekulovou hmotností přibližně 44 kDa. Renin je syntetizován ve formě velkého preprohormonu preproreninu v JG buňkách ledvin, které obklopují aferentní arterioly v místech, kde tyto arterioly vstupují do glomerulů. 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 [Carey and Siragy 2003a]. Odštěpením 46-ti aminokyselinového

peptidu z N-terminálního konce molekuly proreninu vzniká aktivní renin [Carey and Siragy 2003a]. 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. Hladiny plazmatického proreninu jsou zvýšené u osob s deficitem prekalikreinu [Campbell 2003], u diabetických pacientů a v těhotenství. Prorenin může být přeměňován na aktivní renin také plazmatickým kalikreinem [Campbell 2003].

Sekrece reninu z ledvin do cirkulace je kontrolována nervově, intrarenálními baroreceptory a množstvím sodíku v macula densa. Po stimulaci je aktivní renin uvolňován z JG buněk exocytózou. Renin má poločas rozpadu v cirkulaci asi 80 minut nebo méně. U většiny druhů je renin kódován pouze jedním genem (Ren-1c), avšak některé druhy myší mají dva geny pro renin (Ren-1d a Ren-2) [Campbell 2003].

Reninový receptor

Tento receptor proteinové povahy je tvořen 350-ti aminokyselinami a má jednu transmembránovou doménu, na kterou se specificky váže renin a prorenin [Nguyen et al. 2004]. Receptory pro renin se nacházejí v srdci, v mozku, v placentě, v játrech a v ledvinách. V rámci ledvin jsou reninové receptory lokalizovány v glomerulárním mesangiu a subendoteliální vrstvě renálních artérií [Nguyen et al. 2002].

Angiotenzin-konvertující enzym (ACE)

ACE je glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 kDa produkovaný v endoteliu. Tato zinková metaloproteáza (pro svou aktivitu vyžaduje přítomnost iontů zinku) má dvě aktivní C-terminální domény, které jsou inhibovány ACE inhibitory.

ACE existuje ve dvou formách – solubilní a na membráně vázané formě [Carey and Siragy 2003a]. Většina ACE je vázána na plazmatickou membránu různých typů buněk (vaskulární endoteliální buňky, mikroklky kartáčového lemu endoteliálních buněk, neuroepiteliální buňky, atd.).

ACE štěpí ANG I na ANG II a také přeměňuje bradykinin (BK) na jeho neaktivní metabolity, tedy ACE tak zvyšuje produkci vasokonstriktoru ANG II a současně degraduje vazodilatátor BK.

Použití ACE inhibitorů vede k inhibici syntézy ANG II, ale také k produkci BK, NO, prostaglandinů a ke zvýšeným hladinám ANG-(1-7).

Angiotenzin-konvertující enzym 2 (ACE2)

V roce 2000 byl objeven ACE2, který byl charakterizován jako enzym podobný ACE [Tipnis et al. 2000, Donoghue et al. 2000]. ACE2 je jedno-doménová zinková metaloproteáza o molekulové hmotnosti 120 kDa, která se skládá z 805-ti aminokyselin.

ACE2 byl nalezen v buněčných membránách srdečních myocytů, renálních endoteliálních a tubulárních buněk a ve varlatech [Donoghue et al. 2000].

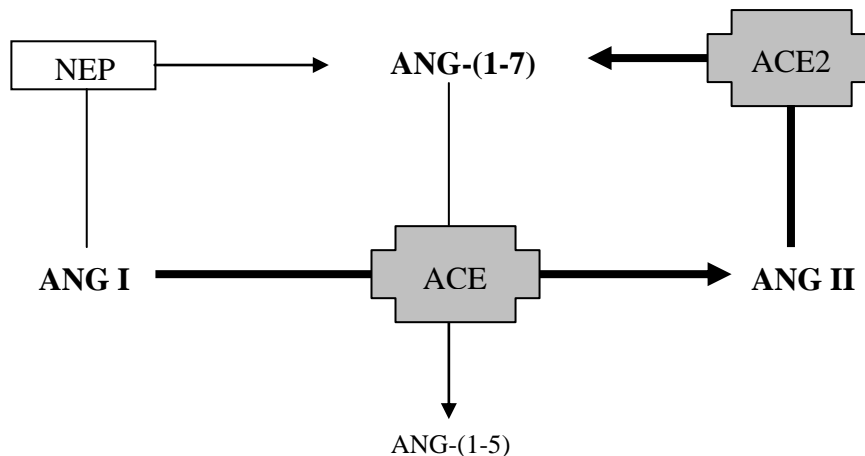
ACE2 působí jako karboxypeptidáza, odstraňuje jeden aminokyselinový zbytek z C-terminálního konce peptidu. ACE2 hydrolyzuje ANG I na ANG-(1-9), ANG II na ANG-(1-7), dále apelin-13, dynorphin A 1-13 a také štěpí vazoaaktivní peptidy des-Arg⁹ BK, neurotensin a kinetensin [Donoghue et al. 2000, Burrell et al. 2004]. Neurotensin má různé účinky v kardiovaskulárním, nervovém a trávicím systému, kdežto kinetensin, příbuzný peptid získaný *in vitro*, stimuluje degranulaci žírných buněk a permeabilitu cév. Na rozdíl od ACE, ACE2 nepřeměňuje ANG I na ANG II a není schopen inaktivovat BK. Lokální vazodilátor des-Arg⁹ BK, který je štěpen a deaktivován ACE2, účinkuje prostřednictvím B1 receptorů, na rozdíl od bradykininu, který působí přes B2 receptory a je štěpen ACE [Marceau and Bachvarov 1998]. ACE2 efektivně inhibuje tvorbu ANG II tak, že stimuluje alternativní cesty degradace ANG I. Neočekávaně působí ACE2 jako SARS-CoV (virus vyvolávající těžký akutní respirační syndrom) receptor [Turner et al. 2004].

S objevem ACE2 získává na významu i druhé, a to vazodilatační rameno RAS. Hladiny ACE a ACE2 určují převahu vazokonstrikce či vazodilatace. ACE určuje produkci ANG II i degradaci ANG-(1-7), kdežto ACE2 může, usnadněním přeměny ANG II na ANG-(1-7), regulovat hladiny ANG II v tkáních (obr. č. 2). Inhibice ACE snižuje produkci ANG II a zvyšuje hladiny ANG-(1-7). Blokáda AT₁ receptorů stimuluje aktivitu ACE2.

Studie používající ACE inhibitory či antagonisty AT₁ receptorů poukazují na roli RAS v činnosti a hypertrofii srdce. Zatímco myši s deficitem ACE nebo angiotenzinogenu vykazují normální srdeční vývoj i funkci, byla u ACE2-knockout myši poprvé zaznamenána abnormální srdeční funkce charakterizovaná mírným ztenčením levé komory a závažným zmenšením srdeční kontraktility [Crackower et al. 2002]. Nedostatek ACE2 byl spojován se zvýšenými tkáňovými a plazmatickými koncentracemi ANG II, což potvrzuje úlohu ACE2 v hydrolýze ANG II. Vytvoření dvojnásobných mutantů ace/ace2-knockout myši zcela eliminovalo kardiální dysfunkce vyskytující se u ACE2-knockout myši a způsobilo snížení TK [Crackower et al. 2002].

Naopak zvýšená exprese ACE2 v srdci myši zvýšila v závislosti na míře exprese četnost náhlých úmrtí [Donoghue et al. 2003].

Obrázek č. 2: Mechanismus pozitivní zpětné vazby v rámci ACE – ACE2 regulační smyčky RAS (upraveno volně dle: Ferrario 2006)



Jeho enzymatická aktivita je inhibována EDTA, ale není inhibována klasickými ACE inhibitory jako je kaptopril, lisinopril či enalaprilát [Tipnis et al. 2000].

Nadměrná exprese ACE2 chrání proti angiotensin II-indukované srdeční hypertrofii a fibróze [Huentelman et al. 2005]. ACE2 hraje důležitou roli nejen v regulaci kardiovaskulárních a renálních funkcí, ale i ve fertilitě [Tipnis et al. 2000].

Endopeptidázy

Neutrální endopeptidáza 24.11 (neprilysin, NEP) štěpí ANG I za vzniku ANG-(1–7), dále inaktivuje enkefalin, atriový natriuretický peptid, endotelin a substanci P [Welches et al. 1993].

Prolyl-endopeptidáza 24.26 (PEP) štěpí ANG I za vzniku ANG-(1–7), ale také neurotensin, oxytocin, BK, substanci P, LH-HR a TRH [Welches et al. 1993].

2.2 Lokální tkáňové renin-angiotenzinové systémy

Lokální tkáňový RAS musí splňovat tato kritéria [Carey and Siragy 2003a]:

1. mRNA všech komponent systému nutných pro biosyntézu biologicky aktivního produktu (např. ANG II) jsou přítomné v dané tkáni
2. biologicky aktivní produkt je syntetizován v dané tkáni
3. receptory pro biologicky aktivní produkt jsou taktéž přítomny v dané tkáni
4. biologicky aktivní produkt je regulován v dané tkáni, nezávisle na systémové cirkulaci
5. redukce či eliminace účinku produktu vyvolává fyziologickou odpověď

Řada studií popisuje význam tkáňového RAS v mozku, v srdci, v periférním krevním řečišti, v nadledvinách a v ledvinách [Campbell 1987, Engeli et al. 2000, Johnston 1992, Navar et al. 2002, Dostal 2000].

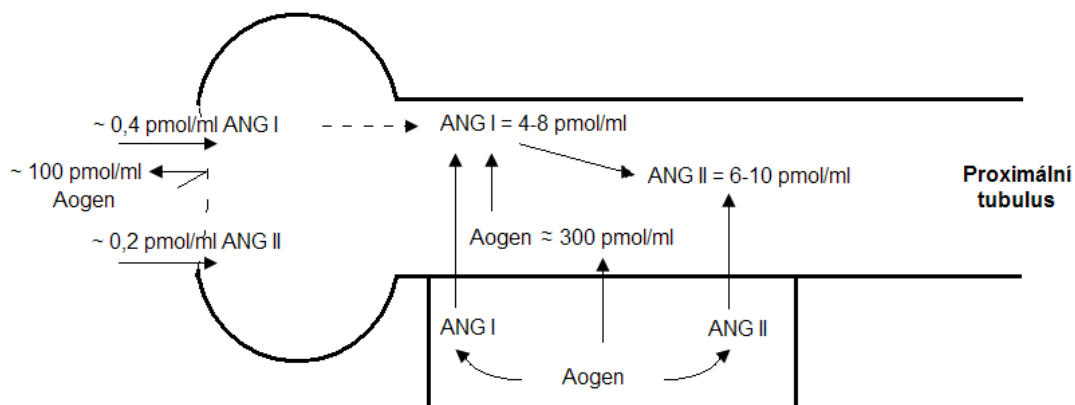
2.2.1 Intrarenální RAS

Intrarenální RAS byl prvním popsáným funkčním tkáňovým RAS [Carey and Siragy 2003a]. Tento systém byl odhalen na základě *in vivo* pokusů, u kterých měla intrarenální inhibice RAS ANG II receptorovými blokátory za následek významné zvýšení průtoku plazmy ledvinou (PPL), glomerulární filtrace (GF) a exkrece Na a vody. Později byla v ledvinách prokázána přítomnost všech komponent RAS.

Receptory pro ANG II jsou soustředěny v renálních arteriolách, v glomerulárních mesangiálních buňkách a v bazolaterální a apikální membráně buněk proximálních i distálních tubulů [Carey and Siragy 2003b, Harrison-Bernard et al. 1997]. Aktivace těchto receptorů stimuluje aktivitu a zvyšuje expresi $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiportu v proximálním a distálním tubulu a také stimuluje aktivitu Na^+ kanálu ve sběracím kanálku; jejich blokáda snižuje reabsorpci sodíku [Navar 2004a]. Většina intrarenální angiotenzinové mRNA a samotný protein jsou lokalizovány v buňkách proximálních tubulů, což nasvědčuje tomu, že angiotenzinogen pocházející z těchto buněk slouží jako základ pro intratubulární a intersticiální ANG I a ANG II. Hladiny angiotenzinové mRNA i samotného proteinu jsou stimulovány ANG II [Kobori et al. 2001]. Tato pozitivní zpětná vazba, díky níž je lokální produkce substrátu zvyšována jeho vlastním produktem, pravděpodobně přispívá ke zvyšování intrarenální produkce ANG II během

hypertenze. Angiotenzinogen produkovaný v buňkách proximálního tubulu může být sekretován také přímo do lumen tubulů, kde je poté štěpen přítomným reninem na ANG I. Renin je dále produkován JG buňkami a buňkami proximálních tubulů. Na kartáčovém lemu buněk proximálních tubulů je ANG I konvertován pomocí ACE na ANG II. Na zvýšených intrarenálních koncentracích ANG II se podílí jak intrarenálně vyprodukovaný ANG II, tak ANG II internalizovaný pomocí AT_1 receptory-zprostředkované endocytózy. Přítomnost netknutého ANG II v endozómech naznačuje, že část internalizovaného ANG II zůstává nedotčená a přispívá k celkovým koncentracím ANG II měřeným v ledvinných homogenátech [Imig et al. 1999, Navar and Nishiyama 2001]. Intrarenální koncentrace ANG II jsou 1000x vyšší než plazmatické, většina intrarenálního ANG II je tvořena právě v ledvinách [Nishiyama et al. 2002]. Souhrn možných zdrojů intrarenálního ANG II je znázorněn na obr. č. 3. Intratubulární koncentrace ANG II v kontralaterální ledvině 2K1C potkanů, v ledvinách ANG II-infundovaných a Ren-2 transgenních hypertenzních potkanů, které jsou ochuzené o renin, odpovídají intratubulárním koncentracím ANG II naměřeným u kontrolních normotenzních potkanů [Mitchell et al. 1997, Cervenka et al. 1999c, Wang et al. 2003]. Z toho plyne, že intratubulární koncentrace ANG II jsou regulovány nezávisle na intrarenální reninové aktivitě.

Obrázek č. 3: Koncentrace a zdroje angiotenzinogenu, ANG I a ANG II v proximálním tubulu a v intersticiu
(upraveno volně dle: Navar et al. 2002)



ANG II v ledvinách není distribuován rovnoměrně, ale v různých místech s odlišnou koncentrací [Navar et al. 1998a]. Distribuce ANG II ve dřeni a v kůře se značně liší [Navar et al. 1997]. Řada studií naznačila, že ANG II ovlivňuje hemodynamiku ve dřeni ledvin do větší míry než hemodynamiku v ledvinné kůře [Navar and Nishiyama 2001]. Hustota ANG II receptorů i koncentrace ANG II ve dřeni ledvin jsou vyšší v porovnání s ledvinnou kůrou. Zajímavé je, že blokáda intrarenálních AT₁ receptorů u psů vyvolá přibližně stejné zvýšení průtoku krve v kůře i ve dřeni ledvin [Omoró et al. 2000]. V rámci kůry se ANG II nachází v intersticiální a tubulární tekutině stejně jako v buňkách. Intersticiální tekutina přispívá k nepřiměřeně vysokým koncentracím ANG II. Koncentrace ANG II, jakož i ANG I, v intersticiální i v proximální tubulární tekutině jsou mnohem vyšší než plazmatické koncentrace [Nishiyama et al. 2002, Siragy et al. 1995, Siragy and Carey 1999, Navar et al. 1994].

Spolu s ANG I, AT₁ receptory a ACE se ANG II nachází v renálních endozómech [Imig et al. 1999]. Koncentrace ANG II jsou zde opět vyšší než koncentrace ANG I.

ANG II má mnohé přímé intrarenální účinky. Kromě renální arteriální vazokonstrikce zvyšuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby, stimuluje tubulární reabsorpci sodíku a inhibuje tlakovou natriurézu. ANG II zužuje aferentní i eferentní arteriolu a stimuluje kontrakce mesangiálních buněk, čímž snižuje průtok krve ledvinou, rychlost GF a dávku filtrovaného sodíku [Navar et al. 1996]. V proximálním tubulu ANG II zvyšuje aktivitu Na⁺-H⁺ výměny, Na⁺-HCO₃⁻ kotransportu a Na⁺/K⁺ ATPázy v bazolaterální membráně [Garvin 1991, Quan and Baum 1996]. V distálním tubulu ANG II reguluje Na⁺-H⁺ výměnu a k amiloridu citlivý sodíkový kanál [Wang and Giebisch 1996].

2.2.2 Srdeční RAS

Původně byly v srdci v r. 1987 nalezeny renin a jeho mRNA [Dzau and Re 1987]. Do dnešní doby již byla potvrzena přítomnost všech komponent RAS nutných pro biosyntézu ANG II i samotná tvorba ANG II [Dostal 2000]. V myokardu jsou přítomny receptory pro renin, angiotenzinogen, ACE i ANG II [Dostal and Baker 1999]. Většina ANG II nalezená v srdeční tkáni pochází z místní produkce z ANG I a nikoliv ze systémové cirkulace [Neri Serneri et al. 1996, Danser et al. 1997]. Myokardiální koncentrace reninu a angiotenzinogenu představují pouze 1 – 4% plazmatických koncentrací reninu a angiotenzinogenu, avšak v srdeční intersticiální tekutině jsou

koncentrace ANG I a ANG II 100x větší než v plazmě [Danser et al. 1994]. Intrakardiální přeměna ANG I na ANG II může být katalyzována srdeční chymázou, která, na rozdíl od ACE, nedegraduje BK [Urata et al. 1993]. Biosyntéza a uvolňování ANG II z ventrikulárních myocytů jsou regulovány glukokortikoidy, estrogenem, thyroïdním hormonem, atriovým natriuretickým peptidem, ale také mechanickým rozpětím ventrikulárních myocytů [Carey and Siragy 2003a].

2.2.3 Cévní RAS

Buňky hladké svaloviny cév, endoteliální a endokardiální buňky vytvářejí ANG I i ANG II, avšak otázka syntézy reninu v krevních cévách zůstává sporná [Carey and Siragy 2003a, von Lutterotti et al. 1994, Rosenthal et al. 1990, Dzau 1984, Kifor and Dzau 1987]. Důležitou roli pro tvorbu ANG I a ANG II v rámci vaskulárního RAS hraje endotelium, pomocí něhož je renin vychytáván z cirkulace. Takto získaný renin je poté hlavním zdrojem pro tvorbu vaskulárních angiotenzinů. Molekulární mechanismus vychytávání (adsorpce) reninu není znám. Někteří vědci předpokládají existenci specifických receptorů pro renin [Hilgers et al. 2001].

2.2.4 Nadledvinový RAS

ANG II je hlavním stimulatorem sekrece aldosteronu. Až do poloviny 80. let 20. stol. se myslelo, že vylučování aldosteronu je řízeno prostřednictvím endokrinního RAS. Až později byla v buněčné kultuře izolované adrenální zony glomerulosa prokázána reninová a angiotenzinogénová mRNA a také tvorba ANG II. 90 % adrenální reninové aktivity je soustředěno do oblasti zony glomerulosa, v zóně fasciculata, v zóně reticularis a v adrenální dřeni je aktivita velmi malá [Carey and Siragy 2003a]. Omezený přísun sodíku a dieta bohatá na draslík zvýší koncentraci adrenálního reninu, který poté vyvolá větší produkci aldosteronu. Nefrektomie snižuje plazmatické koncentrace reninu až k nedetekovatelným mezím během 4 – 6 hodin, ale zvyšuje koncentrace adrenálního reninu s maximem mezi 24 – 36 hodinami tím, že zvýší koncentraci draslíku v séru [Carey and Siragy 2003a]. U renin-transgenních zvířat restrikce sodíku zvýší koncentraci adrenálního reninu a aldosteronu, aniž by změnila koncentrace reninu v plazmě a v ledvinách. Inhibice ACE nebo AT₁ receptorů blokuje v buňkách zony glomerulosa stimulaci aldosteronu draslíkem či ACTH a inhibice ACE snižuje produkci ANG II a aldosteronu [Carey and Siragy 2003a].

3. Modely hypertenze

V naší laboratoři pracujeme s následujícími čtyřmi zvířecími modely ANG II-dependentní formy hypertenze:

1. 2K1C Goldblattova hypertenze
2. ANG II-indukovaná hypertenze
3. transgenní kmen TGR(mRen2)²⁷
4. transgenní kmen TGR(Cyp1a1-Ren2) s indukovatelnou hypertenzí

3.1 2K1C Goldblattův hypertenzní kmen

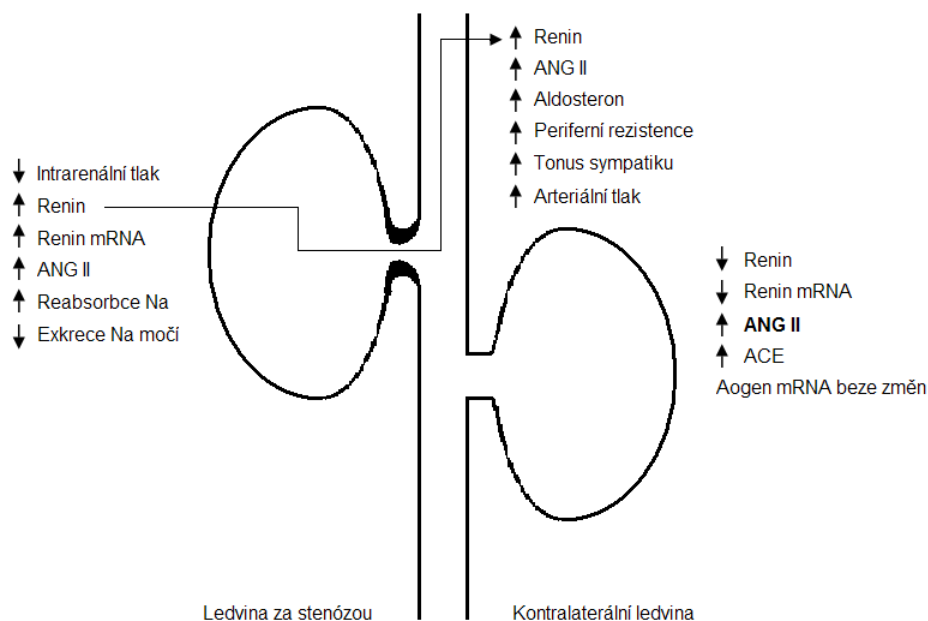
V roce 1939 Wilson a Byrom přizpůsobili metodu „sevřené renální artérie“ pro potkany, čímž navodili dnes klasickou Goldblattovskou hypertenzi u potkanů [Pinto et al. 1998]. Tato metoda je druhově specifická, 2K1C (two-kidney one-clip) hypertenze u psů má jen krátké trvání, kdežto u potkanů je chronická, stejně jako u lidí s jednostrannou stenózou renální artérie [Cerqua and Samaan 1939]. Počátkem 70. let minulého století bylo zjištěno, že modely, u kterých je kontralaterální ledvina neporušená (two-kidney one-clip), se podstatně liší od těch, u kterých byla tato ledvina odstraněna (one-kidney one-clip) [Swales and Tange 1971].

U tohoto experimentálního modelu je hypertenze vyvolána jednostrannou stenózou renální artérie. Klip není natolik sevřený, aby způsobil ischemii, avšak snížený renální perfúzní tlak stimuluje zvýšenou syntézu a uvolňování reninu z ledviny za stenózou. Kaskáda dějů, která byla spuštěna zvýšeným uvolňováním reninu z ledviny za stenózou, vede k nárůstu cirkulujícího ANG II, který postupně inhibuje produkci reninu kontralaterální ledvinou (obr. č. 4). Cirkulující ANG II zvětšuje celkovou periferní rezistenci a zvyšuje krevní tlak, ale má také vliv na řadu dalších orgánů v těle. Přímé a nepřímé účinky zvýšených koncentrací cirkulujícího ANG II spolu se zvýšenou produkcí aldosteronu a ANG II-dependentní zvýšenou aktivitou sympatiku přispívají ke zhoršené exkreační schopnosti kontralaterální ledviny. Tyto ovlivňující se účinky hrají významnou roli v časně fázi rozvoje 2K1C Goldblattovské hypertenze, při níž jsou plazmatická reninová aktivita a koncentrace cirkulujícího ANG II zvýšené [Brunner et

al. 1971, Koletsky et al. 1971, Navar et al. 1998b]. Když je perfúzní tlak ledviny za stenózou obnoven, vrátí se plazmatická reninová aktivita a koncentrace cirkulujícího ANG II k normálu, kdežto arteriální tlak zůstává zvýšený [Guan et al. 1992]. Dokonce i během tohoto stádia přetrvávající hypertenze působí ANG II nadále silně na funkce kontralaterální ledviny. Zvýšené intrarenální koncentrace ANG II v kontralaterální o renin ochuzené ledvině jsou zodpovědné za pozměněné reabsorpční funkce tubulů a hemodynamické funkce [Navar et al. 1998b]. Jelikož jsou hladiny reninu a reninová mRNA v kontralaterální ledvině značně potlačeny, nejsou zvýšené intrarenální koncentrace ANG II zprostředkovány reninem, ale jiným na reninu nezávislým mechanismem. Na základě studií u ANG II-infundovaných potkanů se zjistilo, že zvýšení koncentrací intrarenálního ANG II je závislé na aktivaci AT_1 receptorů a následné receptory-zprostředkované internalizaci ANG II a dále na zvýšení intrarenální tvorby ANG II [Navar et al. 1998b].

Hypertenzi a ANG II-vyvolanému snížení renálních funkcí kontralaterální ledviny u 2K1C potkanů lze předejít chronickým podáváním ACE inhibitorů nebo antagonistů receptorů pro ANG II.

Obrázek č. 4: Angiotenzin-dependentní mechanismus aktivovaný jednostrannou stenózou renální artérie (upraveno volně dle: Navar et al. 1998b)



Rozvoj orgánových změn u 2K1C potkanů závisí zejména na velikosti použitého klipu, na věku potkanů a částečně na technice použité k zúžení renální artérie. Hypertrofie srdce se pohybuje mezi 25–50% [Pinto et al. 1998].

3.2 ANG II-infundování potkanů

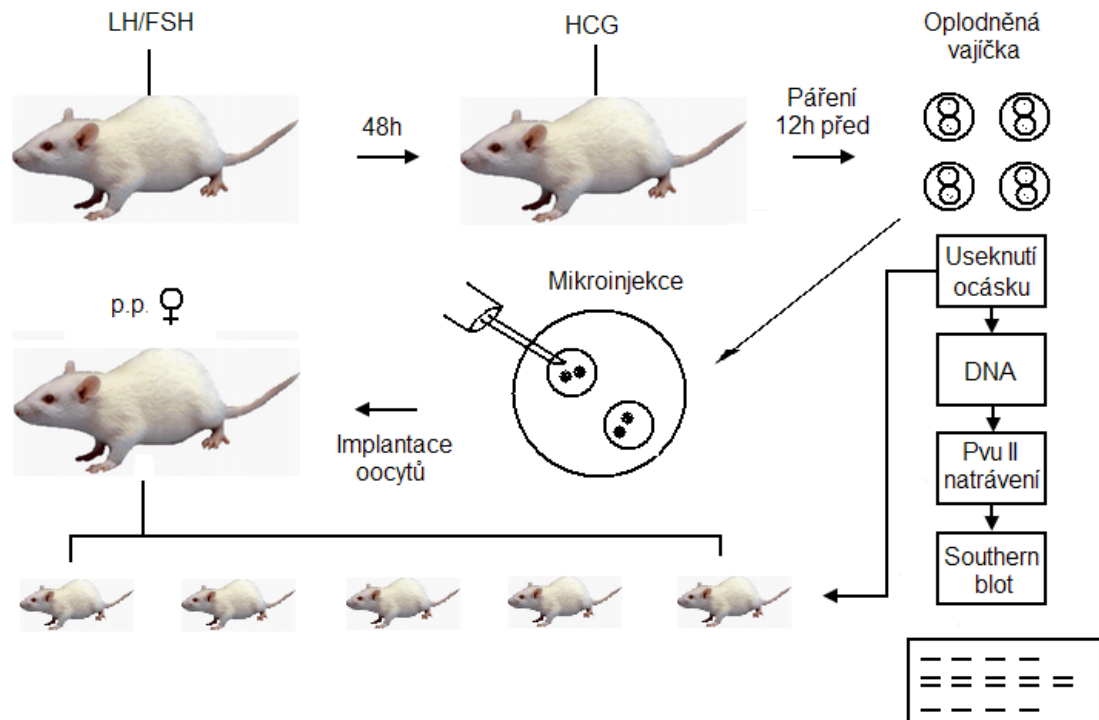
Namísto naložení svorky na renální arterii je u tohoto modelu jedna ledvina odstraněna a nahrazena osmotickou minipumpičkou obsahující ANG II [Navar et al. 1998b]. ANG II-infundování potkanů nemají zvýšenou reninovou aktivitu ani v cirkulaci ani v tkáních [von Thun et al. 1994a, Wang et al. 1997, Zou et al. 1996]. Infuze ANG II zvýší plazmatické koncentrace ANG II až k hodnotám, které odpovídají hladinám naměřeným po jednostranné stenóze renální artérie. Infuze subpresorických dávek ANG II nezpůsobí okamžitý nárůst systémového arteriálního tlaku, ale vede k pomalému rozvoji hypertenze po dobu 6–10 dnů. Koncentrace reninu, reninová mRNA v ledvinách i plazmatická reninová aktivita jsou u tohoto modelu značně potlačeny [von Thun et al. 1994a, von Thun et al. 1994b]. Intrarenální koncentrace ANG II jsou po 8–10 denní infuzi ANG II signifikantně vyšší, než by mohlo být vysvětleno pomocí plazmatických koncentrací ANG II [von Thun et al. 1994b]. Renální funkce ANG II-infundovaných potkanů jsou jasně ovlivněny zvýšenými koncentracemi ANG II.

Podání losartanu, antagonisty AT₁ receptorů, zabrání rozvoji ANG II-indukované hypertenze. Losartan značně sníží intrarenální koncentrace ANG II po 13-ti denní infuzi ANG II [Zou et al. 1996]. Toto zjištění ukazuje, že navázání ANG II na jeho AT₁ receptory vede k aktivačnímu mechanismu, který je zodpovědný za zvýšené intrarenální koncentrace ANG II. Tento AT₁-dependentní mechanismus zvyšuje intrarenální koncentrace ANG II stimulací další intrarenální produkce ANG II.

3.3 Kmeny transgenních potkanů

Obrázek č. 5: Postup používaný k vytváření linií transgenních potkanů

(upraveno volně dle: Langheinrich et al. 1996)



Vznik transgenních potkanů

Jak uvádí Paul a spol. [Paul et al. 1994; obr. č. 5] u 29 – 30-ti denních samic se podáváním gonadotropinů navodí častější ovulace. Pro optimální superovulaci je nutné aplikovat specifický poměr luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) po dobu 72h pomocí subkutánně implantované minipumpy. Zhruba 50h po implantaci minipump se samicím intraperitoneálně podá HCG, aby byla indukována superovulace. 12h před odběrem oocytů se tyto samice nechají spářit s plodnými samci. Ve stejném čase se nechají spářit dospělé samice s vasektomovanými samci, aby u nich byla vyvolána pseudopregnance (p.p.). Tyto samice pak slouží jako pěstounky. Příští ráno je úspěch páření kontrolovatelný nalezením vaginálních zátek. Dárcovské samice se usmrtí a pod mikroskopem se jim vyjmou vejcovody. Poté se vyizolují oocyty a připraví se pro mikroinjekci. Po vytvoření pronuklea jsou tyto oocyty injektovány vybraným fragmentem DNA pomocí mikroinjekčního zařízení a mikromanipulátoru. Mikroinjektované oocyty jsou poté implantovány pěstounkám. Přítomnost transgenu u potomstva je kontrolována zavedenými metodami jako je Southern blot nebo PCR.

3.3.1 Hypertenzní transgenní kmen TGR(mRen2)²⁷

Tento kmen vytvořili Mullins a spol. v roce 1990 [Mullins et al. 1990]. Byli to první transgenní potkani ve výzkumu hypertenze. Tento model představuje monogenní formu hypertenze, neboť od geneticky neupravených kontrolních potkanů se liší pouze v jednom genu. Do genomu normotenzních Sprague-Dawley potkanů byl zaveden myši Ren-2 reninový gen. Podle výše uvedeného postupu byly oplodněné oocyty mikroinjektovány lineárním fragmentem DNA obsahujícím neporušený DBA/2J Ren-2 gen včetně 5,3 kb 5'- a 9,5 kb 3'- koncové sekvence [Engler et al. 1998, Langheinrich et al. 1996]. Heterozygotní transgenní potkani vzniknou spojením transgen-positivního potomka s transgen-negativním SD potkanem opačného pohlaví. Spojením dvou heterozygotních zvířat vzniknou homozygoti pro daný gen.

U heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů se hypertenze začíná rozvíjet přibližně ve 4–5 týdnu věku, maximálních hodnot (240 mmHg) dosahuje kolem 9–10 týdne věku. Ve stáří krevní tlak opět klesá [Kasper et al. 2005]. Homozygotní TGR vyvíjejí mnohem vyšší krevní tlak, který se blíží až k 300 mmHg, což naznačuje, že stupeň hypertenze se odvíjí od dávky transgenu. Homozygotní zvířata vykazují menší váhový přírůstek, a pokud nejsou léčena antihypertenzivy, umírají v raném věku za známek maligní hypertenze [Dvorak et al. 2004]. Co se týče rozvoje a průběhu hypertenze, byl u TGR potvrzen sexuální dimorfismus [Opočenský et al. 2004]. Výše krevního tlaku samců a samic se liší, samice mají v průměru o 30–40 mmHg nižší krevní tlak. TK heterozygotních TGR samic se ve stáří spontánně vrací až k normotenzním hodnotám. U TGR samců dochází k vážnějším hypertenzím vyvolaným orgánovým poškozením než u TGR samic. Podání androgenů transgenním samicím vede ke vzestupu krevního tlaku až k hladinám, které jsou srovnatelné s hodnotami krevního tlaku transgenních samců. Kastrace u samců snižuje hladiny krevního tlaku až k hodnotám transgenních samic. Tyto skutečnosti podporují teorii, že androgeny mají stimulační účinky na RAS [Engler et al. 1998, Langheinrich et al. 1996]. Mimoto inhibitory ACE a antagonisté ANG II receptorů významně snižují hladiny krevního tlaku [Engler et al. 1998, Mullins et al. 1990].

Zda tento kmen představuje model hypertenze se zvýšenou či sníženou aktivitou reninu je stále předmětem diskuse. Některé práce uvádějí ve výsledcích nižší plazmatické koncentrace reninu v porovnání s kontrolními skupinami, v jiných studiích naopak naměřili zvýšené plazmatické koncentrace reninu. Tento rozpor lze připsat vlivu

řady faktorů na měření reninových koncentrací (genetické pozadí, věk, pohlaví, pH) [Lee et al. 1996]. Koncentrace angiotenzinogenu v plazmě jsou mírně snížené a plazmatické koncentrace proreninu jsou signifikantně zvýšené oproti kontrolním skupinám. Převážná část plazmatického reninu i proreninu je transgenního původu [Peters et al. 1993, Tokita et al. 1994b, Veniant et al. 1995, Bohlender et al. 1998], odchylky od hladin normotenzních potkanů jsou patrné již u potkanů v prehypertenzní fázi [Lee et al. 1996]. Myši a potkaní renin se liší optimálním pH, při kterém štěpí potkaní angiotenzinogen (pH 8,5 vs. pH 6,5), proto záleží na pH prostředí, ve kterém je aktivita reninu vyšetřována. Za fyziologických podmínek (pH 7,4) byla naměřena zvýšená plazmatická reninová aktivita [Veniant et al. 1995, Bohlender et al. 1998], s hlavním podílem myšního transgenního reninu. Nižší hladiny potkaního reninu v plazmě tak odpovídají nízkým hladinám reninu v ledvinách. Plazmatické koncentrace ANG I a ANG II jsou vyšší než u kontrolních zvířat, renální koncentrace ANG II jsou taktéž zvýšené [Campbell et al. 1995].

Co se týče tkání, je největší exprese transgenů u TGR v nadledvinách, dále v thymu, v mozku, v GITu, v močových cestách, v ledvinách a v plicích [Engler et al. 1998]. Na rozdíl od potkanů je u DBA/2 myši navíc vysoká exprese Ren-2 genu v submandibulární žláze [Mullins et al. 1990, Zhao et al. 1993]. U netransgenních potkanů je exprese reninu v těchto tkáních velmi nízká. Před rozvinutím hypertenze je exprese v ledvinách, v nadledvinách a v mozku rovnoměrná, avšak během rozvoje hypertenze se exprese Ren-2 genu v ledvinách a v určitých částech mozku sníží, ale nemění se v nadledvinách a v hypothalamu [Zhao et al. 1993].

Nadledviny transgenních potkanů jsou hypertrofické v porovnání s kontrolními zvířaty, ale bez morfologických změn. Největší exprese reninové mRNA byla zjištěna v zoně glomerulosa [Engler et al. 1998, Langheinrich et al. 1996]. Imunoprecipitace s myšící renin-specifickou protilátkou, která se váže pouze na renin myšícího původu, snížila reninovou aktivitu v plazmě i v nadledvinách, což svědčí o transgenním původu vyvázaného reninu [Peters et al. 1993]. Během rozvoje hypertenze jsou u mladých TGR(mRen2)27 zvýšené plazmatické koncentrace steroidů a exkrece steroidů močí. Nadledviny TGR(mRen2)27 potkanů jsou citlivější ke stimulaci ACTH v porovnání s ostatními kmeny. Koncentrace K, Na a ACTH v plazmě se od kontrolních skupin neliší. Snížený přísun sodíku po dobu jednoho týdne vyvolá u TGR trvalé zvýšení reninové mRNA a reninové aktivity v nadledvinách, avšak plazmatické a renální aktivity reninu se nemění. Stimulace nadledvinového RAS je doprovázená značným

zvýšením aldosteron-syntázy a plazmatických koncentrací aldosteronu [Rubattu et al. 1994]. Oboustranná adrenalektomie vede k prudkému poklesu plazmatických koncentrací proreninu a redukuje zvýšení plazmatických koncentrací reninu vyvolané nefrektomií, což svědčí o tom, že nadledviny jsou důležitým zdrojem plazmatického reninu a proreninu [Tokita et al. 1994a].

Odporové cévy Ren-2 transgenních potkanů vykazují odchylky, které byly popsány i u jiných forem arteriální hypertenze – zmenšený vnitřní průměr cévy a tlustší stěna cévy. Srdce TGR je vlivem hypertrofie levé komory zvětšené v porovnání s normotenzními potkany. Tlakově-natriuretická křivka je u kmene TGR(mRen2)²⁷ potkanů posunuta doprava [Gross et al. 1994]. Zpět doleva ji posunou inhibitory ACE a blokátory ANG II receptorů [Gross et al. 1995].

3.3.2 Transgenní kmen TGR(Cyp1a1-Ren2) s indukovatelnou hypertenzí

Počáteční změny v patologickém procesu mohou být studovány pouze na zvířecích modelech, u kterých je hypertenze indukována časově řízenou genovou expresí. Pokud je začátek a stupeň hypertenze kontrolovatelný, pak mohou být určeny buněčné a molekulární změny probíhající během počáteční fáze vaskulárního a orgánového poškození. Reverzibilita genové exprese dále umožňuje studovat molekulární a buněčný základ „uzdravení“.

Kantachuvesiri a spol. vytvořili transgenní kmen potkanů s hypertenzí indukovatelnou pomocí promotoru cytochromu P450, Cyp 1a1, který řídí expresi myšího Ren-2 genu [Kantachuvesiri et al. 2001]. Do genomu Fischer 344 potkanů byl vložen myší Ren-2 reninový gen spojený s 11,5 kb fragmentem promotoru cytochromu P450 1a1 (Cyp1a1). Cyp1a1, který katalyzuje oxidaci celé řady endogenních lipofilních sloučenin a xenobiotik, je produkován pouze v přítomnosti různých aryl-uhlovodíků, mezi které patří např. indol-3-karbinol (I3C) [Mitchell and Mullins 2005]. Ren-2 gen je exprimován převážně v játrech a to po indukci Cyp1a1 promotoru indol-3-karbinolem. I3C se přirozeně vyskytuje v zelenině čeledi brukvovitých (Brassicaceae), kde působí jako benigní induktor s krátkým biologickým poločasem. Indukce Cyp1a1 promotoru vyvolaná podáním I3C v dietě vede k expresi Ren-2 reninového genu a k rozvoji ANG II-dependentní hypertenze. Po ukončení podávání I3C se krevní tlak velmi rychle navrátí k normálním hodnotám, což poukazuje na reverzibilitu vyvolané hypertenze. U tohoto modelu je ANG II-dependentní maligní hypertenze vyvolána benigním

přirozeně se vyskytujícím potravním doplňkem bez nutnosti operačního zákroku, dietních úprav přijímaného množství soli či podání steroidů.

Integračním místem Cyp1a1-Ren2 transgenu je chromozom Y, proto u tohoto kmene nelze studovat hypertenzi na samicích. Rozvoj hypertenze je závislý na dávce. Nepřetržité podávání I3C v krmivu má za následek trvalou hypertenzi, vysokou renin-angiotenzin-aldosteronovou aktivitu v cirkulaci a klinické projevy maligní hypertenze. Vysoké koncentrace plazmatického reninu jsou převážně transgenního původu. Dieta s 0,3% I3C vyvolá maligní hypertenzi charakterizovanou ztrátou tělesné hmotnosti, polyurií, polydipsií, apatií a husí kůží [Kantachuvesiri et al. 2001, Patterson et al. 2005].

Cyp1a1-Ren2 transgenní potkani s maligní hypertenzí mají sníženou GF i PPL a zvýšenou citlivost SFP (stop-flow pressure) tubuloglomerulární zpětné vazby [Mitchell and Mullins 2005]. Aktivace AT₁ receptorů, vyvolaná ANG II vytvořeným po indukované expresi transgenu, má výrazný vliv na citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby a na hodnoty renální hemodynamiky. Tyto ANG II-dependentní účinky mohou přispívat k neschopnosti ledvin udržet za normálního tlaku normální rychlost exkrece sodíku a zmírnit natriuretickou reakci na ANG II-zprostředkované zvýšení arteriálního tlaku. Tímto způsobem mohou modulační účinky ANG II na renální hemodynamiku a na citlivost glomerulární zpětné vazby vést k rozvoji maligní hypertenze u Cyp1a1-Ren 2 potkanů.

Cyp1a1-Ren2 transgenní potkani s maligní hypertenzí vykazují zvýšený oxidativní stres. Zvýšené hladiny O₂⁻ přispívají ke zvýšené renální vaskulární rezistenci a arteriálnímu krevnímu tlaku [Patterson et al. 2005]. Zvýšený arteriální tlak je alespoň zčásti vyvolán poklesem bioaktivity NO vlivem O₂⁻. Kromě toho NO má u Cyp1a1-Ren2 transgenních potkanů s maligní hypertenzí výrazný renální vazodilatační účinek. Tyto trvalé ledviny-ochraňující účinky mohou hrát roli v prevenci nadměrné renální vazokonstrikce a tak přispívat k udržování renálních hemodynamických hodnot po indukci maligní hypertenze u tohoto transgenního kmene.

Dočasná indukce ANG II-dependentní hypertenze navozená krátkodobou aktivací Cyp1a1-Ren2 transgenu vyvolá u těchto potkanů sůl-senzitivní hypertenzi [Howard et al. 2005]. GF ani PPL nejsou změněny, ale zvýšená tubulární reabsorpce přispívá k této formě hypertenze. Chronické podávání tempolu zmenší nárůst krevního tlaku vyvolaný podáním diety s vysokým obsahem soli TGR(Cyp1a1-Ren2) potkanům po dočasné indukci ANG II-dependentní hypertenze, což naznačuje, že ANG II-indukovaná produkce O₂⁻ přispívá k rozvoji sůl-senzitivní hypertenze.

4. Studie č. 1:

Je všeobecně známo, že anestézie stimuluje aktivitu RAS. Reakce na anestézii je variabilní, individuální a nezávisí na dávce anestetika. Vliv anestézie na koncentrace ANG II u anestezovaných, chirurgicky stresovaných normotenzních a hypertenzních potkanů se liší. Jelikož doposud nebyla provedena podrobnější studie porovnávající plazmatické a renální koncentrace ANG II u anestezovaných a bdělých (tj. dekapitovaných bez podání anestetik) normotenzních a ANG II-dependentních hypertenzních potkanů, rozhodli jsme se věnovat této problematice v naší první studii.

Vliv anestézie na plazmatické a renální koncentrace angiotenzinu II u normotenzních a ANG II-dependentních hypertenzních potkanů



Cíl studie:

- **Zjistit vliv anestézie a chirurgického stresu** na plazmatické a renální koncentrace ANG II u potkanů různých experimentálních skupin.

A. Úvod

Klíčová role renin-angiotenzinového systému (RAS) v regulaci renálních funkcí, v udržování sodíkové rovnováhy a objemu extracelulární tekutiny (OECT) je zkoumána již mnoho let. RAS chrání organismus před život ohrožující ztrátou OECT v podmínkách nedostačujícího přísunu soli [Mitchell and Navar 1989, Hall and Brands

2000]. Roste počet údajů o tom, že renální koncentrace ANG II jsou mnohem vyšší než hladiny cirkulujícího ANG II a že ledviny umějí regulovat intrarenální koncentrace ANG II nezávisle na aktivitě ANG II v cirkulaci. Tato vlastnost jim umožňuje přiměřeně regulovat tubulární reabsorpci sodíku a vyváženost OECT dle potřeb homeostázy [Navar and Nishiyama 2004b]. Nicméně se také připouští, že nepřiměřená aktivace intrarenálního RAS může ohrozit tlakově-natriuretický mechanismus v ledvinách a tím přispět k rozvoji a přetrvávání jistých forem ANG II-dependentních hypertenzí [Morton and Wallace 1983, Ploth 1983, Navar 2004a, Hall et al. 1999, Navar and Harrison-Bernard 2000].

Tato teorie je podpořena nedávnými výsledky naměřenými u několika modelů ANG II-dependentní hypertenze, které ukazují, že intrarenální koncentrace ANG II jsou zvýšené mnohem více než koncentrace cirkulujícího ANG II, a to i pokud se plazmatické koncentrace ANG II blíží k normálu, či pokud jsou hladiny reninu v ledvinách potlačeny [Navar et al. 1998b, Cervenka et al. 1999c, El-Dahr et al. 1993, Tokuyama et al. 2002, Wang et al. 2003, Sadjadi et al. 2002, Guan et al. 1992, von Thun et al. 1994b, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005]. Za těchto podmínek by se dalo očekávat, že hodnoty renální hemodynamiky a exkrece sodíku po farmakologické blokáde RAS budou u ANG II-dependentních modelů hypertenze jasně zvýšené. Avšak dřívější studie používající farmakologickou inhibici RAS k posouzení vlivu zvýšené intrarenální koncentrace ANG II na renální funkce u ANG II-dependentních modelů hypertenze nepřinesly jednoznačné výsledky, které by podpořily tuto představu. Kupodivu většina studií ukazuje, že systémová či intrarenální aplikace antagonistů AT₁ receptorů zvyšuje renální hemodynamiku a exkreci sodíku srovnatelně u ANG II-dependentních hypertenzních modelů jako u normotenzních kontrolních potkanů [Cervenka et al. 1999c, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005, Mitchell and Mullins 1995, Cervenka and Navar 1999b, Wang et al. 1997, Navar et al. 1999]. Tato zjištění by mohla argumentovat proti teorii, že nepřiměřeně vysoká aktivita intrarenálního ANG II a AT₁-receptory zprostředkovaná tubulární reabsorpce sodíku vede k narušenému tlakově-natriuretickému mechanismu, který přispívá k rozvoji a přetrvávání ANG II-dependentní hypertenze [Navar 2004a, Hall et al. 1999, Navar and Harrison-Bernard 2000, Navar et al. 1998b]. Vysvětlení těchto protichůdných závěrů by mohlo být vyvozeno ze skutečnosti, že všechny výše zmíněné funkční studie ledvin byly prováděny u anestezovaných, chirurgickým zákrokem stresovaných zvířat, která obecně mají vyšší plazmatické a renální koncentrace ANG II než bdělá zvířata. Navíc

bylo prokázáno, že normotenzní potkani vykazují větší zvýšení sekrece reninu jako odpověď na anestézii a chirurgické postupy než ANG II-indukovaní hypertenzní potkani s nedostatkem intrarenálního reninu [Cervenka et al. 1999c, El-Dahr et al. 1993, Tokuyama et al. 2002, Wang et al. 2003, Sadjadi et al. 2002, Guan et al. 1992, von Thun et al. 1994b, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005, Mitchell and Mullins 1995, Cervenka and Navar 1999b, Wang et al. 1997, Navar et al. 1999]. Je zajímavé, že anestézie má za následek vyšší renální koncentrace ANG II u anestezizovaných normotenzních potkanů než u anestezizovaných hypertenzních potkanů [Wang et al. 2003, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005]. Nicméně, i když byly renální koncentrace ANG II nižší u hypertenzních potkanů v porovnání s normotenzními potkany, podobné funkční odpovědi ledvin na AT₁ receptorovou blokádu u hypertenzních ANG II-dependentních a u normotenzních potkanů nasvědčují tomu, že intrarenální RAS je aktivován ve větší míře u ANG II-dependentních modelů hypertenze než u normotenzních potkanů [Cervenka et al. 1999c, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005, Cervenka and Navar 1999b, Wang et al. 1997].

Až dosud nebyly provedeny detailní studie srovnávající plazmatické a renální koncentrace ANG II u hypertenzních ANG II-dependentních modelů a u normotenzních kontrolních potkanů, kteří byli anestezizováni nebo dekapitováni. Proto cílem této studie bylo porovnat plazmatické a renální koncentrace ANG II po dvou clearancových periodách u anestezizovaných (tj. chirurgickým zákrokem stresovaných zvířat) a u bdělých potkanů.

Jako experimentální modely ANG II-dependentní hypertenze sloužili hypertenzní heterozygotní transgenní samci nesoucí Ren-2 reninový gen (TGR) [Mullins et al. 1990], ANG II-infundovaní hypertenzní potkani (ANG II-infund.) a 2K1C (two-kidney, one-clip) Goldblattovi hypertenzní potkani. Protože je snížený přísun soli úzce spjat se zvyšováním renálních koncentrací ANG II [Ingert et al. 2002a, Fox et al. 1992], byli jako další modely zvýšené intrarenální aktivity ANG II použiti normotenzní transgen-negativní Hannover-Sprague Dawley potkani (HanSD) a TGR, kteří byli vystaveni nedostatečnému přísunu sodíku. Jako kontroly sloužili HanSD krmení dietou s normálním obsahem soli.

B. Experimentální část

Zvířata

Vlastní experimenty byly prováděny na 52 denních potkanech vybraných experimentálních modelů, kteří byli poslední noc před pokusem bez krmiva.

HanSD potkani

HanSD samci na dietě s normálním obsahem soli (NS; 0,6 g NaCl/100 g krmiva; C 1000, Altromin, Lage, Germany) sloužili jako kontrolní zvířata s „normální“ systémovou i intrarenální aktivitou ANG II.

Hypertenzní heterozygotní TGR

52 denní (časná fáze hypertenze u TGR) heterozygotní TGR samci hypertenzní linie TGR(mRen2)²⁷ byli použiti jako dobře definovaný monogenní model ANG II-dependentní hypertenze [Mullins et al. 1990]. Stejně staří HanSD potkani sloužili jako transgen-negativní normotenzní kontroly. Všechna TGR i HanSD zvířata použitá v níže uvedených studiích byla namnožena v Centru experimentální medicíny, Institutu klinické a experimentální medicíny, z původního kmene dodaného z Max Delbrückova centra molekulární medicíny v Berlíně, Německo.

HanSD a TGR s nedostatečným přísunem soli

47 denním HanSD a TGR byl po dobu jednoho dne podáván furosemid (F) v pitné vodě (40 mg/l, Furon; Merckle Corp., Blaubeuren, Germany) a následně byli krmeni dietou s nízkým obsahem soli (LS; <0,01 g NaCl/100 g krmiva; C 1036, Altromin, Germany) po dobu čtyř dnů. Předchozí studie ukázaly, že takovéto snížení příjmu sodíku vede k silné stimulaci RAS [Ingert et al. 2002a, Nakamura et al. 2003].

2K1C Goldblattovi hypertenzní potkani

Po odstavu (28 dní) byli samci kmene HanSD anestetizováni thiopentalem sodným (60 mg/kg i.p.). Řezem ve slabíně zvířete byla izolována renální artérie, na kterou byla naložena stříbrná svorka o vnitřním průměru 0,25 mm [Cervenka et al. 1999c, El-Dahr et al. 1993]. Akutní experimenty byly prováděny 25 dnů po naložení klipu. Funkční studie ledvin byly provedeny u dvou samostatných skupin - u první

skupiny byla měřena renální hemodynamika a exkrece elektrolytů kontralaterální ledviny, u druhé skupiny byly sledovány tytéž parametry ale u ledviny za stenózou.

ANG II-infundování hypertenzní potkani

Anestetizovaným HanSD samcům (stáří 39 dnů) byly na zátylek implantovány subkutánně osmotické minipumpičky (Model 2002, Alza Corp., California, USA) obsahující ANG II (Sigma Chemical Co., Praha, ČR), dle postupu popsaného dříve [Wang et al. 2003, von Thun et al. 1994b]. ANG II je uvolňován rychlostí 80 ng/min. Předchozí studie ukázaly, že trvalá infuze takovéto dávky vede k pomalu rozvíjející se hypertenzi se vzrůstem intrarenálních koncentrací ANG II, které jsou podobné hodnotám naměřeným u modelu 2K1C Goldblattovy hypertenze [Wang et al. 2003, von Thun et al. 1994b]. Vlastní experimenty byly prováděny 13. den po naložení svorky.

Úkol č. 1:

Funkční studie ledvin – stanovení plazmatických a renálních koncentrací ANG II u anestetizovaných zvířat

Po anestézii thiopentalem sodným (v dávce 60 mg/kg i.p.) byli potkani umístěni na vyhřívaný stoleček, díky němuž byla teplota těla udržována v rozmezí 37-37,5°C. K zajištění dýchání byla provedena tracheostomie (95%O₂/5%CO₂). Pro infuzi roztoků, dodatečných anestetik a intravenózně podávaných léků byl do pravé v. jugularis zaveden katetr (PE-50). Poté byla zakanylována pravá a. femoralis pro kontinuální měření arteriálního krevního tlaku a sběr vzorků krve. Střední arteriální tlak (MAP) byl měřen pomocí tlakového snímače (model MLT 1050) a zaznamenáván do počítače díky automatizovanému systému sběru dat (PowerLab/4SP, ADInstruments, UK). V dalším kroku byl proveden boční řez, levá ledvina byla izolována od okolní tkáně a umístěna do plastového kalíšku vystlaného zvlhčenou buničitou vatou. Přes levou a. femoralis byl zaveden zašpičatělý katetr PE-10 do levé a. renalis. Tento krok je do renálních funkčních studií zařazen kvůli selektivnímu intrarenálnímu podávání léků [Cervenka et al. 1999c, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005]. Průchodnost tohoto katetru byla během experimentu udržována kontinuální infuzí heparinovaného fyziologického roztoku o průtoku 4 µl/min. Během chirurgické přípravy byl infundován fyziologický roztok obsahující 6% bovinní sérový albumin (BSA; Sigma Chemical Co., Praha, ČR) rychlostí 20 µl/min. Po skončení chirurgické přípravy byl infundován fyziologický roztok obsahující 0,6% BSA, 1,5% p-aminohippurát sodný (PAH; Merck, Sharp &

Dohme West Point, PA, USA) a 7,5% polyfruktosan (Inutest, Laevosan, Linz/Donau, Austria) taktéž rychlostí 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pro jímání moči byl zakanylován ureter katetrem PE-10. Po dokončení výše uvedených chirurgických postupů následovala 50-ti minutová ekvilibrační perioda, aby se zvířata dostala do stabilního stavu před začátkem dvou kontrolních clearancových period. Vzorky moče byly sbírány ve dvou 30-ti minutových periodách a mezi těmito dvěma sběry moče bylo odebráno 0,5 ml arteriální krve. Je známo, že ztráta krve může výrazně stimulovat uvolňování reninu z ledvin do cirkulace a zvýšit plazmatickou reninovou aktivitu (PRA) i pokud nedojde ke snížení krevního tlaku a také že náhrada daného objemu krve proteinovým fyziologickým roztokem může předejít těmto změnám [Weber et al. 1973, Hodge et al. 1966], proto jsme odebrané množství krve ihned nahradili stejným objemem fyziologického roztoku obsahujícího 0,6% BSA.

Po skončení dvou kontrolních clearancových period, díky nimž jsme určili bazální hodnoty MAP, renální hemodynamiky a vylučovaných elektrolytů, byl proveden ventrální řez (řez středem břicha), na levou renální arterii byl naložen klip (jako prevence snížení renálního perfuzního tlaku) a levá ledvina byla odstraněna. Ihned po odebrání ledviny byla do předchlazené zkumavky s inhibitory (5 mM EDTA, 10 μM pepstatin, 1,25 mM 1,10-phenanthrolin) sbírána arteriální krev. Poté byla odebrána i druhá ledvina a srdce. Čas odběru nepřesáhl 30 sekund. Obě ledviny byly po odběru osušeny, zváženy a zhomogenizovány v předchlazeném (4°C) metanolu. Srdce bylo osušeno a zváženo. Vzorky krve i homogenáty z ledvin byly centrifugovány po dobu 10 minut při 3 000 x g a 4°C. 1 ml plazmy byl vysrážen čtyřnásobným množstvím předchlazeného (4°C) etanolu a vše bylo zcentrifugováno při 3 000 x g, 4°C, po dobu 10 minut. Supernatanty ze vzorků krve i ledvin byly vysušeny ve vakuové centrifuze (Speedvac concentrator SPD101B, Savant Instruments, New York, USA) a uchovány při -80°C před vlastním stanovením koncentrací ANG II.

Rekonstituované odparky ledvinných homogenátů (ve 4 ml 50 mM fosfátového pufru o pH 7,4 obsahujícího 267 mg BSA/l) byly přečištěny na SPE kolonkách (BondElut[®]PH, Varian, Harbor City, CA, USA). Kolonky byly nejprve promyty 3 ml metanolu a 2x 3ml vody, pak byl aplikován vzorek, poté byly kolonky postupně promývány 3 ml vody, 3 ml hexanu a 3 ml chloroformu (voda odstraní soli a ostatní polární složky, hexan a chloroform vymyjí kontaminující tuky a hydrofobní materiál, ale neovlivní ANG II). Nakonec byl vzorek z kolonek eluován 2x 1 ml metanolu. Získané eluáty byly vysušeny a uchovány při -80°C.

Koncentrace ANG II v plazmě i v ledvinách byly stanoveny radioimunologicky (EURIA-Angiotensin II RIA kit, EURO-DIAGNOSTICA AB, Malmö, Sweden), dle návodu přiloženého u kitu.

Experimentální skupiny:

- Skupina 1: HanSD potkani krmeni dietou s normálním obsahem soli (n = 11)
- Skupina 2: HanSD potkani na dietě s nízkým obsahem soli s podáním furosemidu (n = 13)
- Skupina 3: TGR krmeni dietou s normálním obsahem soli (n = 11)
- Skupina 4: TGR na dietě s nízkým obsahem soli s podáním furosemidu (n = 12)
- Skupina 5: ANG II-infundovaní potkani na dietě s normálním obsahem soli (n = 11)
- Skupina 6a: 2K1C potkani na dietě s normálním obsahem soli, měření v kontralaterální ledvině (n = 12)
- Skupina 6b: 2K1C potkani na dietě s normálním obsahem soli, měření v ledvině za stenózou (n = 13)

Objem moči byl měřen gravimetricky. Koncentrace sodíku a draslíku byly stanoveny plamenovou fotometrií. Koncentrace inulinu a PAH byly měřeny kolorimetricky. Inulinová clearance byla použita jako index pro glomerulární filtraci (GF) a clearance PAH sloužila jako index pro průtok plazmy ledvinou (PPL), výsledné hodnoty byly udávány na gram ledvinné tkáně.

Úkol č. 2:

Stanovení plazmatických a renálních koncentrací ANG II u bdělých zvířat

52 denní potkani výše uvedených experimentálních skupin (n = 10/skupina) byli dekapitováni bez předchozích renálních funkčních studií a anestézie. Bezprostředně po dekapitaci byla do předchlazené (4°C) zkumavky s inhibitory sbírána plná krev, poté byly odebrány obě ledviny a srdce. Další postup byl stejný jako u anestezizovaných zvířat.

Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Pro porovnání mezi skupinami byla použita one-way ANOVA. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$).

C. Výsledky

Úkol č. 1: Studie u anestetizovaných zvířat

Bazální hodnoty MAP, renální hemodynamiky a vylučování elektrolytů (průměr ze dvou kontrolních clearancových period) jsou shrnuty v tab. č. 1. Dle očekávání byl MAP u TGR na NS dietě, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů signifikantně vyšší než u HanSD krmených NS dietou. LS dieta neovlivnila MAP u HanSD (HanSD + LS + F), ale statisticky významně ho snížila u TGR (TGR + LS + F) a to až k normálním hladinám. GF a PPL ledviny za stenózou 2K1C potkanů byly signifikantně nižší v porovnání s ostatními experimentálními skupinami. Tok moči i absolutní a frakční vylučování sodíku byly u 2K1C potkanů s měřenou ledvinou za stenózou statisticky významně nižší než u 2K1C potkanů s měřenou kontralaterální ledvinou a u HanSD i TGR na NS dietě. Tato data potvrzují předchozí zjištění, že ledvina za stenózou u 2K1C potkanů vykazuje sníženou renální hemodynamiku a vylučování sodíku [Huang et al. 1982, Huang et al. 1983]. Váhy kontralaterálních ledvin byly signifikantně větší v porovnání s ledvinami za stenózou, ale i v porovnání s ostatními vyšetřovanými skupinami. Absolutní a frakční vylučování sodíku u ANG II-infundovaných potkanů bylo signifikantně nižší než u normotenzních kontrolních zvířat (HanSD + NS), ale tok moči se nelišil. Tato zjištění jsou v souladu s předchozími záznamy, které ukazují, že ANG II-infundovaní hypertenzní potkani mají sníženou schopnost vylučovat sodík, což je spojeno se zhoršeným tlakově-natriuretickým mechanismem [Wang et al. 2000, Van der Mark and Kline 1994].

Jak je zobrazeno v grafu č. 1, koncentrace ANG II v plazmě byly signifikantně vyšší u HanSD na NS dietě než u TGR na NS dietě, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů (198 ± 21 vs. 74 ± 11 , 101 ± 9 a 93 ± 12 fmol/ml, $p < 0,05$). LS dieta zvýšila plazmatické koncentrace u HanSD, ale neovlivnila je u TGR v porovnání se stejnými skupinami na NS dietě (424 ± 31 a 68 ± 9 fmol/ml, $p < 0,05$).

Z grafu č. 2 lze odečíst, že koncentrace ANG II v ledvinách HanSD na NS dietě a 2K1C potkanů s měřenou ledvinou za stenózou se statisticky nelišily (363 ± 38 vs. 268 ± 17 fmol/g tk., $p < 0,05$), ale obě hodnoty byly signifikantně vyšší než u TGR na NS dietě, TGR na LS + F dietě, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů s měřenou kontralaterální ledvinou (363 ± 38 a 268 ± 17 vs. 186 ± 17 , 158 ± 14 , 144 ± 17 a 162 ± 24 fmol/g tk., $p < 0,05$). LS dieta výrazně zvýšila renální koncentrace ANG II u HanSD, ale nezměnila je u TGR (628 ± 29 a 158 ± 14 fmol/g tk., $p < 0,05$).

Tabulka č. 1: Bazální hodnoty krevního tlaku, renální hemodynamiky, vylučovaných elektrolytů (jako průměr dvou kontrolních clearancových period) a indexy váhy srdce a ledvin ku tělesné hmotnosti u jednotlivých experimentálních skupin

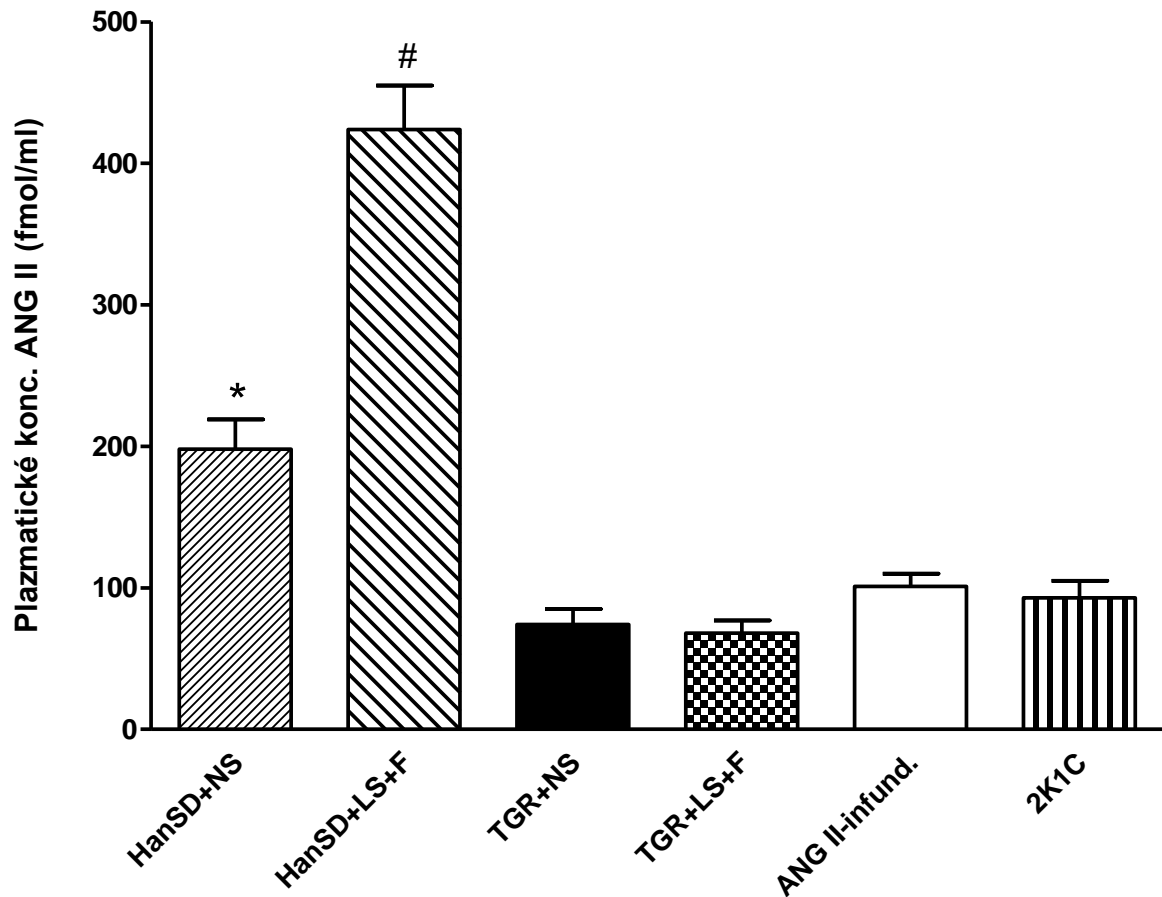
	HanSD + NS	HanSD + LS + F	TGR + NS	TGR + LS + F	ANG II infundovaní	2K1C neklip.l.	2K1C klip.l.
N	11	13	11	12	11	12	13
MAP (mmHg)	116,00 ± 2,00	120,00 ± 4,00	160,00 ± 3,00 ^a	127,00 ± 8,00	159,00 ± 4,00 ^a	161,00 ± 4,00 ^a	163,00 ± 3,00 ^a
GF (ml.min⁻¹.g⁻¹)	0,95 ± 0,05	0,99 ± 0,09	0,90 ± 0,07	0,94 ± 0,08	0,84 ± 0,04	0,83 ± 0,06	0,56 ± 0,08 ^a
PPL (ml.min⁻¹.g⁻¹)	2,09 ± 0,09	2,16 ± 0,19	2,25 ± 0,22	2,42 ± 0,16	2,05 ± 0,09	1,99 ± 0,11	1,07 ± 0,08 ^a
U_{Na}V (μmol.min⁻¹.g⁻¹)	0,39 ± 0,08	0,07 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,09	0,04 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,50 ± 0,16	0,03 ± 0,02 ^a
FE_{Na} (%)	0,35 ± 0,07	0,06 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,08	0,03 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,04 ^a	0,41 ± 0,11	0,05 ± 0,02 ^a
U_KV (μmol.min⁻¹.g⁻¹)	0,69 ± 0,15	0,73 ± 0,19	0,61 ± 0,11	0,66 ± 0,15	0,58 ± 0,23	0,67 ± 0,13	0,59 ± 0,22
FE_K (%)	18,9 ± 4,20	20,90 ± 2,70	21,90 ± 3,10	18,7 ± 2,80	24,7 ± 3,40	22,5 ± 2,50	19,40 ± 1,9
V (μl.min⁻¹.g⁻¹)	7,64 ± 1,84	7,44 ± 1,41	7,65 ± 1,24	7,55 ± 1,37	6,13 ± 1,29	9,16 ± 0,95	4,56 ± 0,39 ^a
HW/BW (mg/g)	3,81 ± 0,19	3,72 ± 0,09	5,13 ± 0,22 ^b	4,44 ± 0,25 ^a	4,65 ± 0,17 ^a	4,45 ± 0,06 ^a	4,51 ± 0,09 ^a
KW/BW (mg/g)	4,74 ± 0,21	4,56 ± 0,12	4,88 ± 0,20	4,81 ± 0,15	4,85 ± 0,22	5,39 ± 0,09 ^b	3,54 ± 0,10 ^a

MAP = střední arteriální tlak; GF = glomerulární filtrace; PPL = průtok plazmy ledvinou; U_{Na}V = absolutní vylučování sodíku; FE_{Na} = frakční vylučování sodíku; U_KV = absolutní vylučování draslíku; FE_K = frakční vylučování draslíku; V = objem moči; HW/BW = váha srdce/tělesná hmotnost; KW/BW = váha ledviny/tělesná hmotnost

^ap<0,05 ... daná hodnota vs. neoznačené hodnoty, v rámci sledovaného parametru, u ostatních skupin

^bp<0,05 ... daná hodnota vs. ostatní hodnoty, v rámci sledovaného parametru, u jednotlivých skupin

Graf č. 1: Plazmatické koncentrace ANG II u anestezizovaných HanSD, TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů



HanSD+NS = normotenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

HanSD+LS+F = normotenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

TGR+NS = transgenní hypertenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

TGR+LS+F = transgenní hypertenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

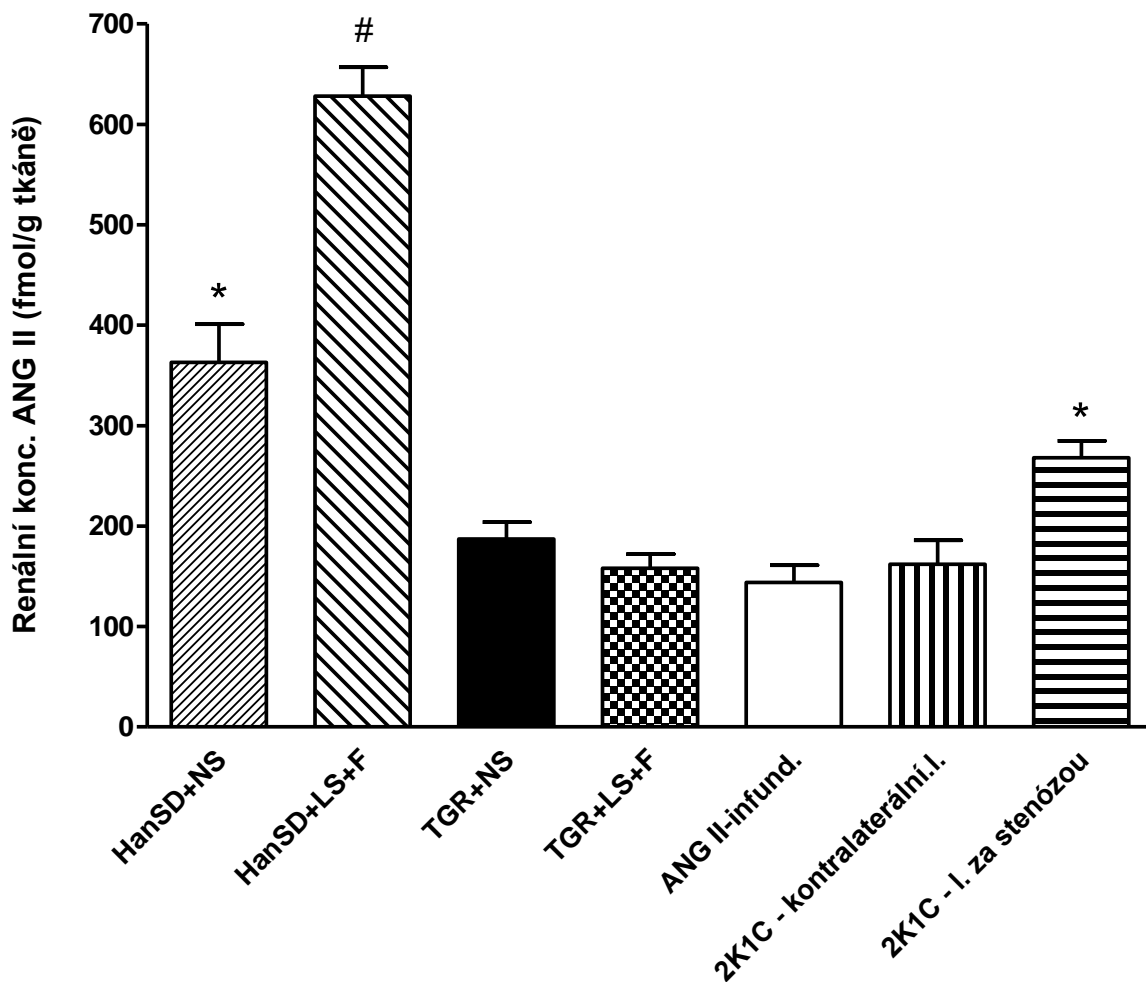
ANG II-infund. = angiotenzin II infundování hypertenzní potkani na dietě s normálním obsahem soli;

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů

* $p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota neoznačené skupiny

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota ostatních skupin

Graf č. 2: Renální koncentrace ANG II u anestetizovaných HanSD, TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů



HanSD+NS = normotenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

HanSD+LS+F = normotenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

TGR+NS = transgenní hypertenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

TGR+LS+F = transgenní hypertenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

ANG II-infund. = angiotenzin II infundování hypertenzní potkani na dietě s normálním obsahem soli;

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů, měření v kontralaterální ledvině

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů, měření v ledvině za stenózou

* $p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota neoznačené skupiny

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota ostatních skupin

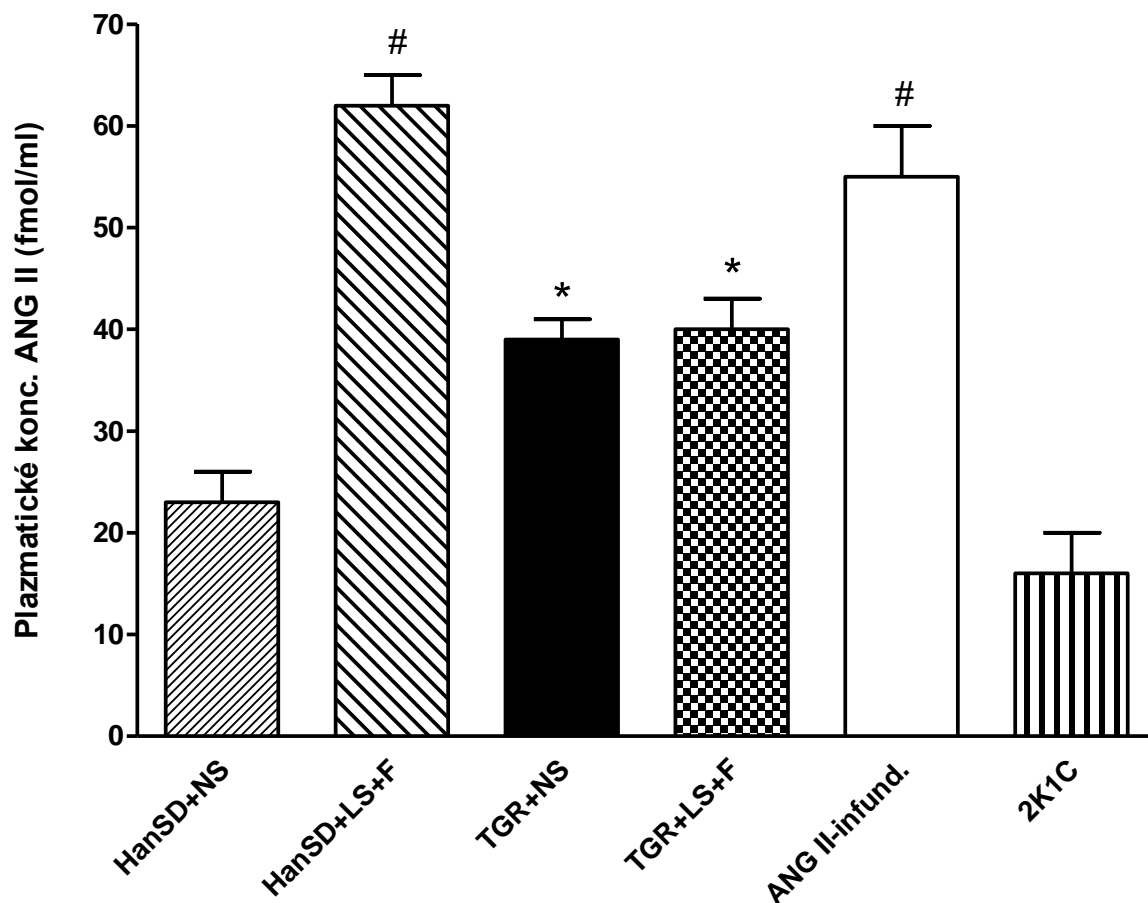
Úkol č. 2: Studie u bdělých zvířat

Graf č. 3 ukazuje, že plazmatické koncentrace ANG II u HanSD na NS dietě a u 2K1C potkanů se statisticky nelišily (23 ± 3 vs. 16 ± 4 fmol/ml, $p < 0,05$), ale obě hodnoty byly signifikantně nižší než u HanSD na LS + F dietě, TGR na NS dietě, TGR na LS + F dietě a ANG II-infundovaných potkanů (23 ± 3 a 16 ± 4 vs. 62 ± 3 , 39 ± 2 , 40 ± 3 a 55 ± 5 fmol/ml, $p < 0,05$). LS dieta vyvolala signifikantní zvýšení plazmatických koncentrací ANG II u HanSD, ale ne u TGR (62 ± 3 a 40 ± 3 fmol/ml, $p < 0,05$). Koncentrace ANG II v plazmě u HanSD na LS + F dietě a ANG II-infundovaných potkanů byly statisticky významně vyšší v porovnání s TGR na NS dietě i TGR na LS + F dietě (62 ± 3 a 55 ± 5 vs. 39 ± 2 a 40 ± 3 fmol/ml, $p < 0,5$).

Koncentrace ANG II v ledvinách HanSD potkanů krměných NS dietou a v kontralaterálních ledvinách 2K1C potkanů se statisticky nelišily (graf č. 4), ale byly signifikantně nižší než v ledvinách HanSD na LS + F dietě, TGR na NS dietě, TGR na LS + F, ANG II-infundovaných či v ledvinách za stenózou u 2K1C potkanů (44 ± 3 a 50 ± 4 vs. 98 ± 3 , 76 ± 5 , 73 ± 4 , 99 ± 13 a 106 ± 9 fmol/g tk., $p < 0,05$). LS dieta vedla k signifikantnímu zvýšení renálních koncentrací ANG II u HanSD v porovnání s HanSD na NS dietě (98 ± 3 vs. 44 ± 3 fmol/g tk., $p < 0,05$), ale neovlivnila koncentrace ANG v ledvinách u TGR ve srovnání s TGR na NS dietě (73 ± 4 vs. 76 ± 5 fmol/g tk., $p < 0,05$).

Grafy č. 5 a 6 znázorňují účinek anestézie na plazmatické a renální koncentrace ANG II, který je vyjádřen jako poměr koncentrací ANG II u anestetizovaných vs. bdělých zvířat. Poměr plazmatických koncentrací ANG II u HanSD na NS dietě, HanSD na LS + F dietě a 2K1C potkanů byl stejný a zároveň signifikantně vyšší v porovnání s TGR na NS dietě, TGR na LS + F a ANG II-infundovanými potkany ($8,61 \pm 0,73$; $6,84 \pm 0,68$ a $5,81 \pm 0,69$ vs. $1,91 \pm 0,16$; $1,72 \pm 0,19$ a $1,84 \pm 0,14$; $p < 0,05$). Poměr renálních koncentrací ANG II byl statisticky významně vyšší u HanSD na NS dietě a HanSD na LS + F dietě než u TGR na NS dietě, TGR na LS + F, ANG II-infundovaných, obou skupin 2K1C potkanů ($8,25 \pm 0,92$ a $6,41 \pm 0,66$ vs. $2,45 \pm 0,32$; $2,16 \pm 0,27$; $1,46 \pm 0,09$; $3,24 \pm 0,29$ a $2,52 \pm 0,18$; $p < 0,05$). Avšak na rozdíl od poměru plazmatických koncentrací ANG II byl poměr renálních koncentrací ANG II u ANG II-infundovaných potkanů signifikantně nižší v porovnání s TGR na NS dietě i s TGR na LS + F dietě ($1,46 \pm 0,09$ vs. $2,45 \pm 0,32$ a $2,16 \pm 0,27$; $p < 0,05$).

Graf č. 3: Plazmatické koncentrace ANG II u bdělých HanSD, TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů



HanSD+NS = normotenzní potkani krmění dietou s normálním obsahem soli;

HanSD+LS+F = normotenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

TGR+NS = transgenní hypertenzní potkani krmění dietou s normálním obsahem soli;

TGR+LS+F = transgenní hypertenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

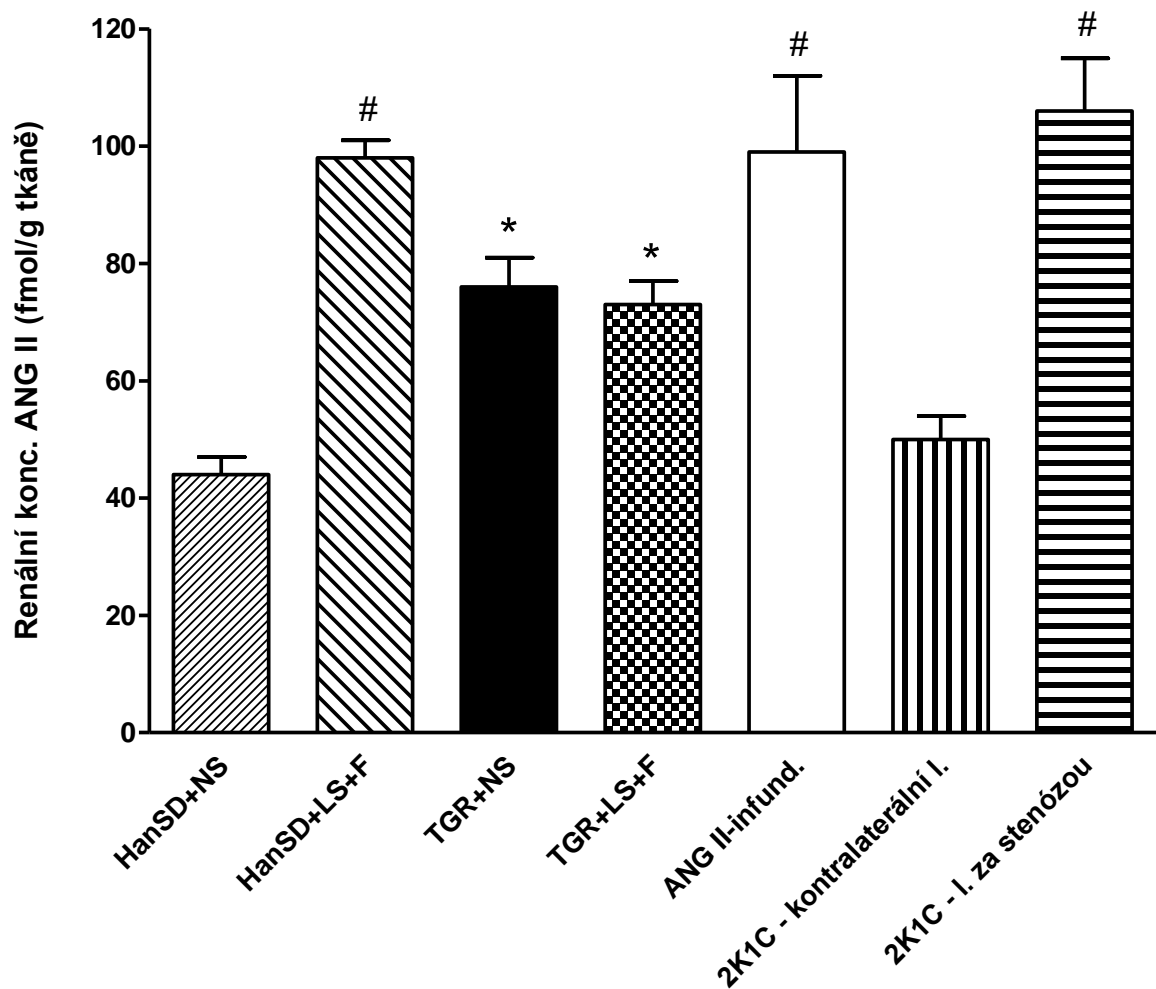
ANG II-infund. = angiotenzin II infundovaní hypertenzní potkani na dietě s normálním obsahem soli;

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů

* $p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota neoznačené skupiny

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota ostatních skupin

Graf č. 4: Renální koncentrace ANG II u bdělých HanSD, TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů



HanSD+NS = normotenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

HanSD+LS+F = normotenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

TGR+NS = transgenní hypertenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

TGR+LS+F = transgenní hypertenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

ANG II-infund. = angiotenzin II infundování hypertenzní potkani na dietě s normálním obsahem soli;

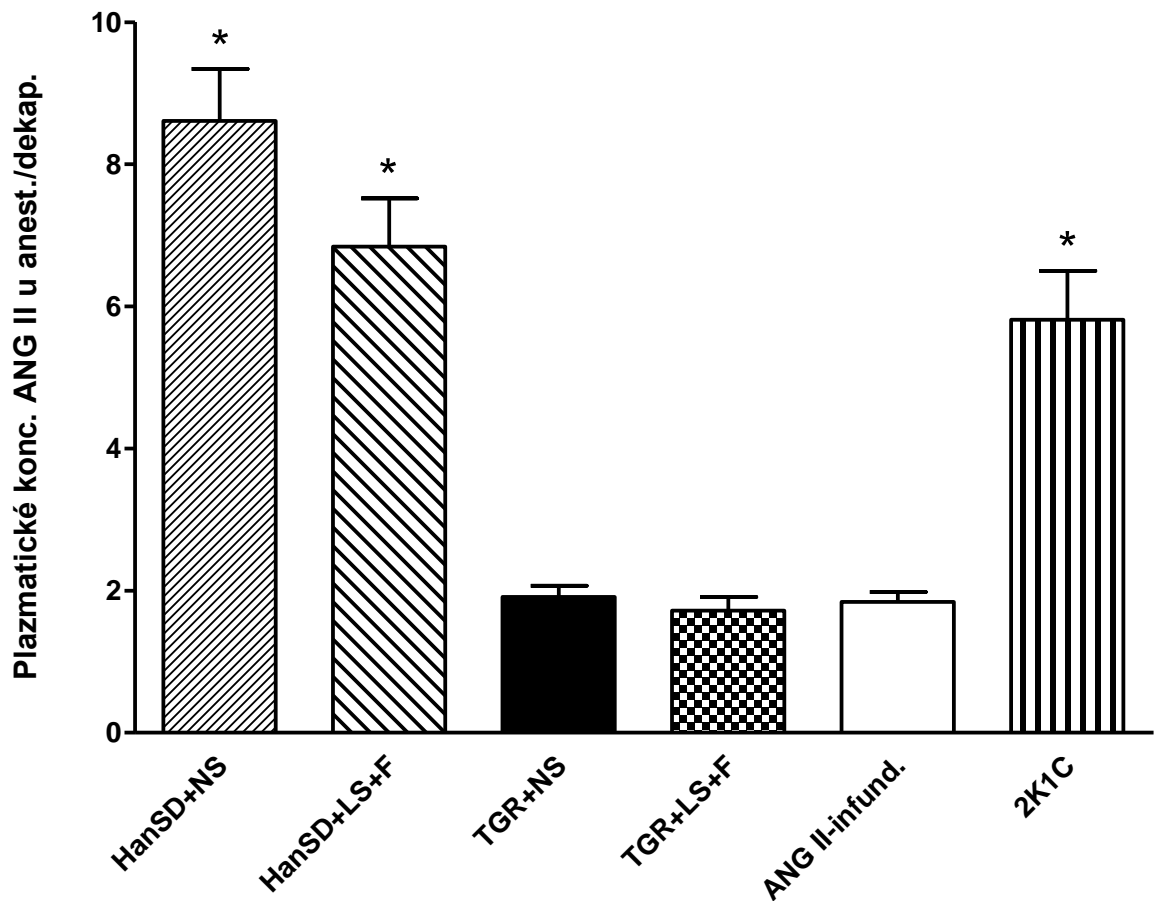
2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů, měření v kontralaterální ledvině

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů, měření v ledvině za stenózou

* $p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota neoznačené skupiny

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota ostatních skupin

Graf č. 5: Poměr plazmatických koncentrací ANG II u anestezovaných vs. bdělých HanSD, TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů



HanSD+NS = normotenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

HanSD+LS+F = normotenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

TGR+NS = transgenní hypertenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

TGR+LS+F = transgenní hypertenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

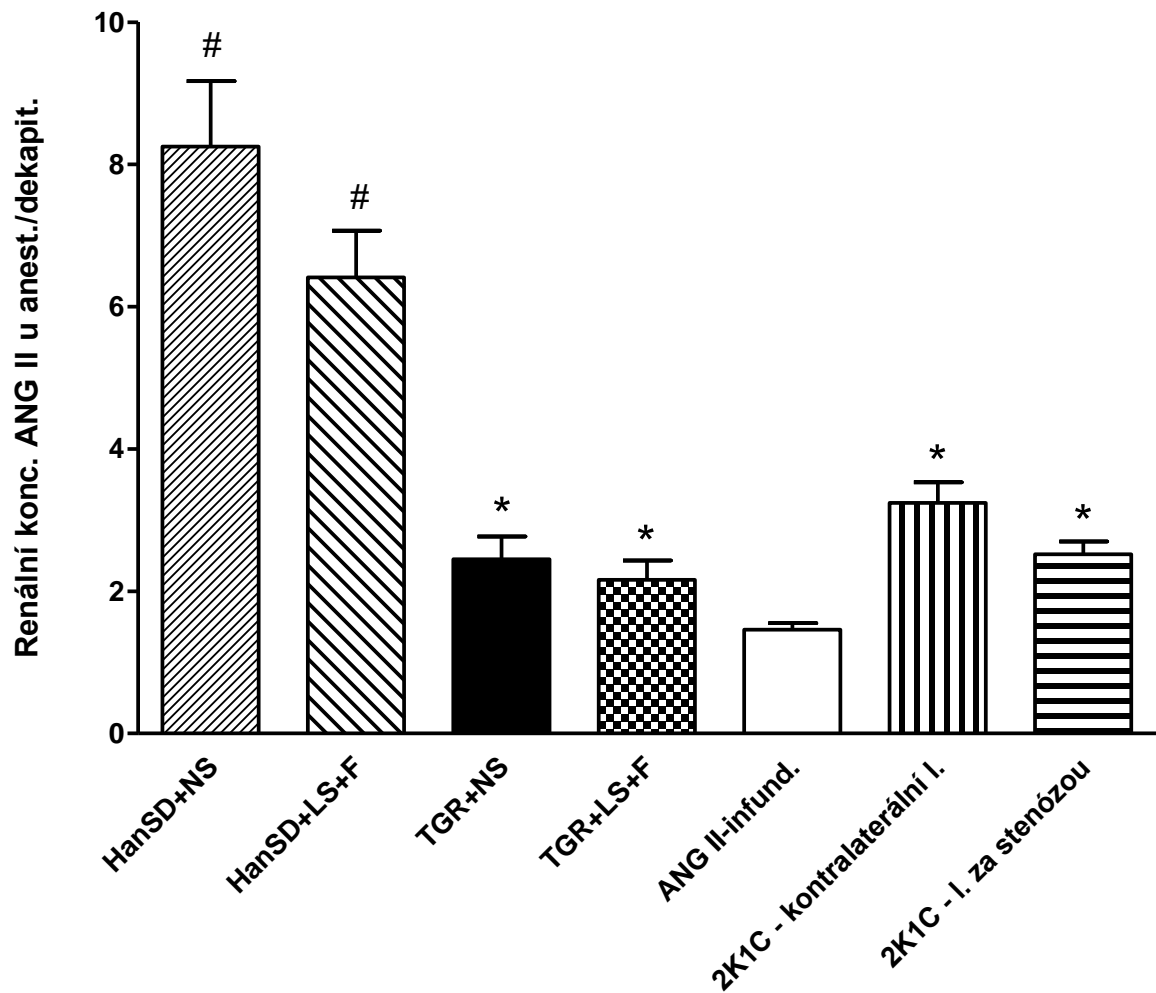
ANG II-infund. = angiotenzin II infundovaní hypertenzní potkani na dietě s normálním obsahem soli;

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů

* $p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota neoznačené skupiny

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota ostatních skupin

Graf č. 6: Poměr renálních koncentrací ANG II u anestezovaných vs. bdělých HanSD, TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů



HanSD+NS = normotenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

HanSD+LS+F = normotenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

TGR+NS = transgenní hypertenzní potkani krmení dietou s normálním obsahem soli;

TGR+LS+F = transgenní hypertenzní potkani na dietě s nízkým obsahem soli a s podáním furosemidu;

ANG II-infund. = angiotenzin II infundování hypertenzní potkani na dietě s normálním obsahem soli;

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů, měření v kontralaterální ledvině

2K1C = „two-kidney, one-clip“ Goldblattův hypertenzní kmen potkanů, měření v ledvině za stenózou

* $p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota neoznačené skupiny

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota ostatních skupin

D. Diskuse

Pokud je nám známo, je toto první souhrnná studie hodnotící plazmatické a renální koncentrace ANG II u normotenzních potkanů a u experimentálních modelů ANG II-dependentní hypertenze, u kterých byly sbírány vzorky krve a tkání jednak od anestetizovaných potkanů po chirurgické přípravě a následných renálních funkčních studiích, a zároveň od bdělých potkanů. Předchozí studie ukázaly, že pokud je krev odebrána u anestetizovaných zvířat po chirurgickém zásahu, ovlivňuje to uvolňování reninu a PRA. Pentobarbitalová anestézie vyvolává 2 – 6 násobné zvýšení uvolňování reninu a PRA u normotenzních a 2K1C Goldblattových hypertenzních potkanů [Johnson and Malvin 1975, Leenen et al. 1973, Yun et al. 1978, Pettinger et al. 1975, Pettinger and Augusto 1971a]. Dále bylo prokázáno, že reakce na anestézii jsou vysoce variabilní a nezávisí na dávce anestetik [Weber et al. 1973, Hodge et al. 1966, Johnson and Malvin 1975, Yun et al. 1978, Pettinger et al. 1971b]. Mimoto pentobarbitalová anestézie eliminuje supresi PRA, která byla vyvolána podáním DOCA a dietou s vysokým obsahem soli; pentobarbital snižuje PRA až k hladinám pozorovaným u zvířat na dietě s normálním obsahem soli [Pettinger et al. 1971b]. Bylo také zjištěno, že pentobarbitalová anestézie zvyšuje odezvu krevního tlaku na ANG II a prodlužuje poločas rozpadu ANG II [Chapman et al. 1980]. Vzhledem k těmto výsledkům a předchozím zjištěním, že koncentrace reninu v ledvinách TGR, ANG II-infundovaných a kontralaterálních ledvinách 2K1C potkanů jsou sniženy až ke stěží detekovatelným hladinám [El-Dahr et al. 1993, Guan et al. 1992, von Thun et al. 1994b, Mullins et al. 1990] a že renální reninová aktivita je zvýšená u normotenzních potkanů se solnou deplecí a v ledvinách za stenózou u 2K1C potkanů [von Thun et al. 1994b, Leenen et al. 1973, Corman et al. 1995], jsme si dali za cíl stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II u pentobarbitalem anestetizovaných potkanů, abychom lépe pronikli do podstaty koncentrací ANG II u zvířat připravených na renální funkční studie a porovnat je s hodnotami získanými u bdělých zvířat.

Prvním důležitým výsledkem této studie je zjištění, že plazmatické koncentrace ANG II byly u všech anestetizovaných zvířat, u kterých se po předchozí chirurgické přípravě provedly renální funkční studie, signifikantně vyšší v porovnání se zvířaty bdělými. Nicméně anestetizovaní HanSD na dietě s normálním obsahem soli a na dietě s nízkým obsahem soli měli signifikantně vyšší plazmatické koncentrace ANG II

než ostatní zkoumané experimentální skupiny. Naopak u bdělých zvířat měli HanSD potkani na dietě s normálním obsahem soli statisticky významně nižší plazmatické koncentrace ANG II v porovnání s HanSD na dietě s nízkým obsahem soli, s TGR na dietě s normálním obsahem soli, s TGR na dietě s nízkým obsahem soli a s ANG II-infundovanými potkany, ale od koncentrací ANG II v plazmě u 2K1C potkanů se nelišili. Pokud jsme tyto výsledky hodnotili vzhledem k citlivosti vaskulárního RAS k anestézii a k chirurgickým postupům – vyhodnoceno jako poměr plazmatických koncentrací ANG II u anestezizovaných vs. bdělých zvířat (graf č. 5) – zjistili jsme, že HanSD potkani na dietě s normálním obsahem soli i na dietě s nízkým obsahem soli a 2K1C Goldblattovi hypertenzní potkani jsou nejcitlivější, tj. dochází u nich až k 6-ti násobnému zvýšení plazmatických koncentrací ANG II; TGR na dietě s normálním obsahem soli, TGR na dietě s nízkým obsahem soli a ANG II-infundovaní potkani mají jen mírně zvýšené plazmatické koncentrace ANG II, tj. méně než dvakrát. Základní mechanismus zodpovědný za tato zvýšení plazmatických koncentrací ANG II zůstává zatím neznámý. Avšak je zde nutné poznamenat, že ačkoliv jsme v této studii neurčovali PRA, předchozí studie přesvědčivě prokázaly, že normotenzní anestezizovaní potkani vykazují nezávisle na příjmu soli velmi vysokou PRA a že pentobarbitalová anestézie značně stimuluje uvolňování reninu z ledviny za stenózou do cirkulace, což ukazuje, že mají vysoké koncentrace reninu [El-Dahr et al. 1993, von Thun et al. 1994b, Corman et al. 1995, Cholewa et al. 2005]. Je tudíž možné, že normotenzní potkani a 2K1C hypertenzní potkani reagují na anestézii značným zvýšením PRA s následným zvýšením produkce cirkulujícího ANG II. Tento předpoklad je v souladu se zjištěním, že PRA je výrazně potlačena u TGR a ANG II-infundovaných potkanů a že se vlivem diety s nízkým obsahem soli u TGR nezmění [Wang et al. 2003, von Thun et al. 1994b, Mullins et al. 1990, Rubattu et al. 1994]. Tato fakta pravděpodobně vysvětlují nižší plazmatické koncentrace ANG II u anestezizovaných TGR na dietě s normálním obsahem soli i na dietě s nízkým obsahem soli a u ANG II-infundovaných potkanů v porovnání s normotenzními HanSD a 2K1C Goldblattovskými hypertenzními potkany.

Druhým důležitým výsledkem je naše zjištění, že koncentrace ANG II v ledvinách anestezizovaných HanSD krmných dietou s normálním obsahem soli a v ledvinách za stenózou u 2K1C potkanů byly signifikantně vyšší než v ledvinách TGR na dietě s normálním obsahem soli i na dietě s nízkým obsahem soli, ANG II-infundovaných potkanů a v kontralaterálních ledvinách 2K1C Goldblattovských

hypertenzních potkanů. Dieta s nízkým obsahem soli vyvolala výrazné zvýšení renálních koncentrací ANG II u anestezovaných HanSD, ale neovlivnila je u anestezovaných TGR. Avšak u bdělých zvířat jsme zjistili, že koncentrace ANG II v ledvinách HanSD potkanů na dietě s normálním obsahem soli a v kontralaterálních ledvinách 2K1C potkanů se vzájemně statisticky neliší, ale jsou signifikantně nižší než koncentrace ANG II v ledvinách HanSD potkanů na dietě s nízkým obsahem soli, TGR na dietě s normálním obsahem soli i na dietě s nízkým obsahem soli, ANG II-infundovaných potkanů a v ledvinách za stenózou u 2K1C potkanů. Vzhledem k citlivosti renálního RAS k anestézii a k operačnímu stresu – vyjádřeno jako poměr renálních koncentrací ANG II u anestezovaných vs. bdělých potkanů (graf č. 6) – jsou HanSD potkani nejcitlivější, tj. jejich renální koncentrace ANG II jsou bez ohledu na přísun soli 6 – 8 násobně zvýšené. Zajímavostí je zjištění, že koncentrace ANG II v kontralaterálních ledvinách bdělých 2K1C Goldblattových hypertenzních potkanů nejenže nejsou signifikantně rozdílné od hodnot naměřených u HanSD krmených dietou s normálním obsahem soli – přestože je dle uveřejněných prací koncentrace reninu v ledvinách potlačena – ale kontralaterální ledvina si také udržuje schopnost reagovat na anestézii a chirurgii produkcí ANG II [El-Dahr et al. 1993, von Thun et al. 1994b]. Tato zjištění spolu s našimi poznatky, že renální koncentrace ANG II u bdělých TGR, kteří představují jiný dobře definovaný hypertenzní model se značně potlačenou intrarenální reninovou aktivitou [Mullins et al. 1990, Rubattu et al. 1994], jsou zvýšené v porovnání s HanSD potkany na dietě s normálním obsahem soli, jasně ukazují disociaci mezi koncentracemi reninu a ANG II v ledvinách. Souhrnně tato zjištění ukazují, že nedostatek reninu v ledvinách není automaticky spojován se snížením renálních koncentrací ANG II a naznačují, že podobně jako u 2K1C hypertenzních potkanů také u TGR může být na reninu nezávislý mechanismus zodpovědný za zvýšenou intrarenální tvorbu ANG II [Navar and Nishiyama 2004b, Navar 2004a, Navar et al. 1998b]. Vzhledem k podobným intrarenálním koncentracím ANG II u TGR a ANG II-infundovaných potkanů, u kterých je renální koncentrace reninu potlačena dokonce do větší míry a u kterých byla AT_1 -receptory zprostředkovaná internalizace ANG II z cirkulace označena jako klíčový mechanismus odpovědný za zvýšené intrarenální koncentrace ANG II [Navar and Nishiyama 2004b, Navar and Harrison-Bernard 2000], je možné, že by se tento mechanismus mohl vyskytovat i u TGR. Nicméně jsou zapotřebí další studie, které by se věnovaly tomuto problému. Dále jsme také zjistili, že renální koncentrace ANG II u všech experimentálních skupin potkanů,

nezávisle na tom, zda vzorky byly odebírány u anestezizovaných či bdělých zvířat, byly signifikantně vyšší v porovnání s odpovídajícími plazmatickými koncentracemi ANG II. Tato data podporují teorii, že intrarenální koncentrace ANG II jsou za všech známých podmínek, tj. normotenze, hypertenze a dietní úpravy hladiny soli, vyšší než by mohlo být vysvětleno na základě jednoduchého vyvážení s hladinami cirkulujícího ANG II [Navar and Nishiyama 2004b]. Zajímavé je také naše zjištění, že ANG II-infundovaní potkani vykazují nejmenší zvýšení renálních koncentrací ANG II jako odpověď na anestézii a chirurgickou přípravu. Důvod by mohl být ten, že hladiny renální reninové mRNA a aktivita reninu v ledvinách jsou u těchto potkanů potlačeny do větší míry, tj. téměř k nedetekovatelným mezím, v porovnání s reninovou mRNA v ledvině TGR a v kontralaterální ledvině 2K1C potkanů [von Thun et al. 1994b, Mullins et al. 1990]. Proto reakce na anestézii a operační stres může být u ANG II-infundovaných potkanů mnohem mírnější.

V této studii jsme dále zjistili, že plazmatické koncentrace ANG II zůstávají v „normálních“ mezích u bdělých 2K1C potkanů, ale u TGR a ANG II-infundovaných potkanů jsou vyšší. Podobně koncentrace ANG II v kontralaterální ledvině 2K1C potkanů byly v „normálu“, kdežto u TGR a ANG II-infundovaných potkanů byly renální koncentrace ANG II zvýšené navzdory trvale zvýšenému krevnímu tlaku. Tyto výsledky se shodují s poznatkem, že nepřiměřeně vysoké plazmatické a renální koncentrace ANG II způsobují funkční poruchy ledvin a ohrožují tlakově-natriuretický mechanismus ledvin, který vede k rozvoji a přetrvávání hypertenze u těchto ANG II-dependentních modelů [Navar 2004a, Navar and Harrison-Bernard 2000, Navar et al. 1998b, Cervenka et al. 1999c, Wang et al. 2003, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005, Cervenka and Navar 1999b, Wang et al. 1997, Navar et al. 1999, Wang et al. 2000, Van der Mark and Kline 1994]. Dále naše závěry, že plazmatické a renální koncentrace ANG II u anestezizovaných TGR, ANG II-infundovaných a 2K1C potkanů jsou podstatně nižší (2 – 3x nižší) než u anestezizovaných normotenzních potkanů, podporují teorii, že funkční reakce ledvin na farmakologickou inhibici RAS jsou u těchto ANG II-dependentních hypertenzních potkanů srovnatelné s reakcemi normotenzních potkanů [Cervenka et al. 1999c, Kopkan et al. 2004, Kopkan et al. 2005, Cervenka and Navar 1999b, Wang et al. 1997, Huang et al. 1982, Huang and Navar 1983]; tato data jasně ukazují, že funkce ledvin je u ANG II-dependentních hypertenzních potkanů pod nepřiměřeně vysokou kontrolou ANG II.

Třetím dílčím závěrem této studie je zjištění, že vážná solná deplece u TGR navozená podáním diuretika v pitné vodě a následnou přísnou dietou s nízkým obsahem soli způsobuje prudké snížení krevního tlaku až k hodnotám, které se signifikantně neliší od hodnot krevního tlaku HanSD potkanů na dietě s normálním obsahem soli. Kromě toho dieta s nízkým obsahem soli nevyvolala u TGR statisticky významné změny v plazmatických a renálních koncentracích ANG II. Tyto výsledky jsou v souladu s naším nedávným zjištěním, že akutní solná deplece podstatně snižuje nárůst krevního tlaku během časné fáze hypertenze u 52 denních TGR [Burgelova et al. 2005] a že dlouhodobé podávání diety s nízkým obsahem soli heterozygotním TGR započaté ihned po odstavu značně snižuje krevní tlak až téměř k normotenzním hodnotám [Vaneckova et al. 2004, Vaneckova et al. 2005]. Je známo, že aktivita RAS je nepřímo úměrná přísunu soli a že zvýšená aktivita RAS během sníženého příjmu soli představuje kompenzační mechanismus vedoucí k udržování stálého OECT a krevního tlaku [Mitchell and Navar 1989, Hall and Brands 2000, Ingert et al. 2002a]. Vzhledem k těmto znalostem naše zjištění, že TGR nereagují na solnou depleci přiměřeným zvýšením plazmatických a renálních koncentrací, poukazuje na to, že TGR vykazují sůlsenzitivní složku hypertenze, která je spojována se ztrátou přiměřených regulačních účinků sníženého přísunu soli na plazmatické a renální koncentrace ANG II. Naopak snížený přísun sodíku u HanSD potkanů neovlivnil krevní tlak, ale měl za následek zvýšení plazmatických a renálních koncentrací ANG II, což potvrzuje skutečnost, že normotenzní HanSD potkani vykazují fyziologické reakce vaskulárního i renálního RAS na solnou depleci.

E. Souhrn výsledků

1. Pentobarbitalová **anestézie a chirurgická příprava zvířete** na renální funkční studie **zvyšuje** plazmatické a renální koncentrace ANG II u HanSD ve větší míře než u ANG II-dependentních modelů hypertenze.
2. **Koncentrace ANG II v plazmě a v ledvinách bdělých TGR, ANG II-infundovaných potkanů a v ledvině za stenózou u 2K1C potkanů jsou značně zvýšené a že koncentrace ANG II v kontralaterální ledvině 2K1C potkanů je stejná jako u normotenzních potkanů.** Proto lze předpokládat, že různá citlivost normotenzních a ANG II-indukovaných hypertenzních potkanů na anestézii a operační postupy může vést k odlišným hodnotám krevního tlaku a k rozdílným reakcím ledvin na farmakologickou inhibici RAS. Tudíž výsledky jednotlivých studií na anestetizovaných zvířatech by měly být interpretovány s opatrností.
3. Snížený přísun soli u TGR snižuje TK, ale nezvyšuje přiměřeně plazmatické a renální koncentrace ANG II, což naznačuje, že **TGR vykazují důležitou sůl senzitivní složku hypertenze.**

Na základě výsledků této studie lze uzavřít, že **nepřiměřeně vysoké plazmatické a renální koncentrace ANG II a nepřetržitý silný vliv ANG II na ledviny pravděpodobně představují nejdůležitější mechanismus vedoucí k rozvoji a přetrvávání hypertenze u ANG II-dependentních modelů hypertenze.**

5. Studie č. 2:

Po zjištění, že anestézie sice ovlivňuje koncentrace ANG II u ANG II-dependentních modelů hypertenze, ale v menší míře než u normotenzních HanSD potkanů, nás zajímalo, jakou roli hrají plazmatické a renální koncentrace ANG II v rozvoji hypertenze, tj. během prehypertenze, časně a pozdní fáze hypertenze. Jako vhodný model jsme použili hypertenzní transgenní kmen TGR(mRen2)²⁷, který představuje geneticky přesně definovaný model ANG II-dependentní formy hypertenze. Je známo, že aktivita RAS je nepřímo úměrná množství přijaté soli. V předchozí studii jsme potvrdili, že TGR potkani vykazují sůl-senzitivní složku hypertenze, na snížený přísun soli nereagovali přiměřeným zvýšením ANG II koncentrací. V následující studii jsme se rozhodli ověřit účinky zvýšeného i sníženého příjmu soli na hladiny ANG II během rozvoje hypertenze.

Vliv změn sodíkové rovnováhy na plazmatické a renální koncentrace ANG II u anestezovaných a bdělých Ren-2 transgenních potkanů



Cíle studie:

- **Stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II** v průběhu rozvoje hypertenze u anestezovaných a bdělých TGR.
- **Zjistit vliv anestézie** na plazmatické a renální koncentrace ANG II.
- **Zjistit vliv změn dietního příjmu soli** na výši TK a na hladiny ANG II.

A. Úvod

Kmen transgenních potkanů TGR(mRen2)²⁷ (zkráceně TGR) je prvním přesně definovaným monogenním modelem hypertenze [Mullins et al. 1990]. Ačkoliv je hypertenze u TGR spojená s inzercí myšího Ren-2 reninového genu, **přesný patofyziologický mechanismus rozvoje hypertenze zůstává nejasný**. Dalo by se očekávat, že je výsledkem zvýšené plazmatické či tkáňové reninové aktivity nebo kombinací obou s následnou zvýšenou produkcí cirkulujícího a tkáňového ANG II. Ačkoliv předchozí studie ukazují, že hypertenze u tohoto modelu je na ANG II závislá a že aktivace AT₁ receptorů podstatně přispívá k jejímu rozvoji [Bóhm et al. 1995, Gross et al. 1995, Mitchell and Mullins 1995, Langheinrich et al. 1996], data týkající se reninové aktivity a koncentrací ANG II jsou sporná.

Na jedné straně prvotní studie popisující tento model [Mullins et al. 1990] ukazuje, že plazmatická a renální reninová aktivita je značně nižší u TGR v porovnání s transgen-negativními potkany kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD), hladiny ANG II v plazmě se však neliší. Kromě toho byly u heterozygotních TGR samců i samic s prokázanou hypertenzí naměřeny normální nebo nízké plazmatické reninové koncentrace a nižší hladiny ANG II než u stejně starých HanSD [Lee et al. 1995, Hilgers et al. 1992, Peters et al. 1996]. Navíc naše pracovní skupina i jiní vědci zjistili, že během vývojové a časné fáze hypertenze nejsou u TGR zvýšené hladiny ANG II v plazmě a v ledvinách [Peters et al. 1996, Kopkan et al. 2004, Mitchell et al. 1997, Kopkan et al. 2005]. Nedávno bylo také prezentováno, že se hypertenze u TGR nevztahuje ke kinetice reninu [Rong et al. 2003]. Výše uvedené výsledky ukazují, že rozvoj hypertenze u TGR nemůže být jednoduše vysvětlen na základě zvýšené produkce ANG II s následnou hyperaktivací AT₁ receptorů, a proto by měly být zváženy i jiné mechanismy.

Na straně druhé se ukázalo, že i když byl endogenní potkaní reninový gen i transgenní myší reninový gen potlačen ve spojení se sníženou intrarenální reninovou aktivitou, plazmatická reninová aktivita byla výrazně zvýšena [Bohlender et al. 1998, Véniant et al. 1995, Tokita et al. 1995]. Dále byla zjištěna překvapivě zvýšená exprese reninového transgenu a tkáňová reninová aktivita v nadledvinách, v mozku, v srdci a v cévních stěnách TGR a většina aktivního plazmatického reninu byla myšího původu [Bohlender et al. 1998, Senanayake et al. 1998]. Podobně Tokita a spol. ukázali,

že plazmatická reninová aktivita a koncentrace ANG II u TGR jsou zvýšené v porovnání s HanSD a že nadledviny jsou u těchto zvířat hlavním zdrojem cirkulujícího reninu [Tokita et al. 1994a]. Mimoto také naznačili, že rozvoj hypertenze u TGR může být způsobený kinetikou reakce mezi myším reninem a potkaním angiotenzinogenem [Tokita et al. 1994b]. Několik studií udává, že hypertenze u TGR je doprovázena vyšší plazmatickou a tkáňovou koncentrací ANG II v porovnání s normotenzními HanSD [Tokita et al. 1995, Senanayake et al. 1998, Campbell et al. 1995, Senanayake 1994]. Tato zjištěná data naznačují, že zvýšená tvorba cirkulujícího a tkáňového ANG II by mohla být hlavní patofyziologickou hnací silou pro rozvoj a přetrvávání hypertenze u TGR.

Zatím neexistuje všeobecná shoda, co se týče role plazmatických a renálních koncentrací ANG II v rozvoji hypertenze u TGR. Je nutno poznamenat, že rozdíly ve výsledcích by mohly souviset s rozdílným věkem a pohlavím zvířat použitých ve výše zmíněných studiích. V některých studiích byla zvířata před odběrem krve a tkání pro stanovení reninové aktivity a koncentrací ANG II anestezována, v jiných studiích byla dekapitována. Proto je možné, že rozdíly v navržení experimentu a v metodice by mohly mít za následek odlišné závěry předchozích studií.

Ačkoliv je nyní zřejmé, že několik angiotenzinových peptidů vykazuje důležité vazoaktivní účinky, nejdůležitější roli v patofyziologii hypertenze hraje Ang II [Reudelhuber 2005]. Proto jsme se rozhodli proměřit koncentrace ANG II v cirkulaci a vzhledem k rostoucím poznatkům o klíčové roli intrarenálního ANG II [Hall and Brands 2000, Burns and Li 2003, Navar 2004a] v dlouhodobé regulaci krevního tlaku také v tkáni ledvin.

Jelikož je všeobecně známo, že plazmatické a renální koncentrace ANG II u anestezovaných zvířat jsou vyšší než u potkanů bdělých a protože bylo prokázáno, že normotenzní potkani vykazují větší zvýšení sekrece reninu jako odpověď na anestézii a chirurgický zákrok než ANG II-indukovaní hypertenzní potkani [Navar 2004a, Wang et al. 2003, Zou et al. 1996, Zou et al. 1998, Fox et al. 1992], stanovovali jsme v této studii plazmatické a renální koncentrace ANG II během prehypertenzní, časně a pozdní fáze hypertenze u anestezovaných a bdělých TGR a HanSD potkanů.

Vzhledem k významu plazmatického a tkáňového ANG II v rozvoji sůl-senzitivní hypertenze u potkanů [Osborn et al. 2003, Howard et al. 2005, Lombardi et al. 1999, Ingert et al. 2002a, Hodge et al. 2002, Franco et al. 2001] a vzhledem ke zjištění, že TGR mají taktéž sůl-senzitivní složku hypertenze [Callahan et al. 1996,

Opočenský et al. 2004, Vaněčková et al. 2004, Vaněčková et al. 2005], bylo dalším cílem této práce určit účinky diety s vysokým a s nízkým obsahem soli na krevní tlak a na plazmatické a renální koncentrace ANG II u TGR a HanSD potkanů.

B. Experimentální část

Materiál a metody

Před vlastním experimentem byli heterozygotní HanSD a TGR samci krmeni dietou s normálním obsahem soli (NS; 0,6 g NaCl/100 g krmiva) nebo dietou s vysokým obsahem soli (HS; 2 g/100 g krmiva) po dobu čtyř dnů. Potkanům na dietě s nízkým obsahem soli byl nejdříve po dobu jednoho dne podáván furosemid (F) v pitné vodě (40 mg/l, Furon; Merckle Corp., Blaubeuren, Germany) a poté byli čtyři dny krmeni dietou s nízkým obsahem soli (LS; <0.01 g NaCl/100 g krmiva; Altromin, Lage, Germany). Dřívější studie ukázaly, že takovéto snížení příjmu sodíku vede k silné stimulaci renin-angiotenzinového systému [Ingert et al. 2002a, Ingert et al. 2002b, Burgelová et al. 2005, Imig et al. 1999]. Až do vlastního experimentu měla zvířata neomezený přísun krmiva a pitné vody. Experimenty byly provedeny na anestezovaných a bdělých HanSD potkanech a TGR. Plazmatické i renální koncentrace ANG II byly měřeny u třech věkově rozdílných skupin TGR po deseti zvířatech, tj. během prehypertenze (32 denní), časně (52 denní) a pozdní (90-ti denní) fáze hypertenze a u třech skupin stejně starých HanSD potkanů.

Úkol č. 1:

Určení plazmatických a renálních koncentrací ANG II u anestezovaných zvířat

Po anestézii thiopentalem sodným (v dávce 60 mg/kg i.p.) byli potkani umístěni na vyhřívaný stoleček, díky němuž byla teplota těla udržována v rozmezí 37-37,5°C. K zajištění dýchání byla provedena tracheostomie (95% O₂/5% CO₂). Pro infuzi roztoků, dodatečných anestetik a intravenózně podávaných léků byl do pravé v. jugularis zaveden katetr (PE-50). Poté byla zakanylována pravá a. femoralis pro kontinuální měření arteriálního krevního tlaku a sběr vzorků krve. Střední arteriální tlak (MAP) byl měřen pomocí tlakového snímače (model MLT 1050) a zaznamenáván do počítače díky automatizovanému systému sběru dat (PowerLab/4SP, ADInstruments, UK).

Po předchozí chirurgické přípravě a 25-ti minutové vyrovnávací periodě byl po dobu 20-ti minut monitorován MAP. Poté byl proveden ventrální řez (řez středem břicha), na levou renální arterii byl naložen klip (jako prevence snížení renálního perfuzního tlaku) a levá ledvina byla odstraněna. Ihned po odebrání ledviny byla do předchlazené zkumavky s inhibitory (5 mM EDTA, 10 μ M pepstatin, 1,25 mM 1,10-phenanthrolin) sbírána arteriální krev. Poté byla odebrána i druhá ledvina a srdce. Čas odběru nepřesáhl 30 sekund. Obě ledviny byly po odběru osušeny a zváženy. Levá ledvina byla homogenizována v předchlazeném (4°C) metanolu. Srdce bylo osušeno a zváženo. Odebraná krev i homogenáty z ledvin byly centrifugovány po dobu 10 minut při 3 000 x g a 4°C. 1 ml plazmy byl vysrážen čtyřnásobným množstvím předchlazeného (4°C) etanolu a vše bylo centrifugováno při 3 000 x g, 4°C, po dobu 10 minut. Supernatanty ze vzorků krve i ledvin byly vysušeny ve vakuové centrifuze (Speedvac concentrator SPD101B, Savant Instruments, New York, USA) a uchovány při -80°C před vlastním stanovením koncentrací ANG II. Rekonstituované odparky ledvinných homogenátů byly přečištěny na SPE kolonkách (BondElut[®] PH, Varian, Harbor City, CA, USA), jak bylo uvedeno v předchozí studii této práce. Získané eluáty byly vysušeny a uchovány při -80°C. Koncentrace ANG II v plazmě i v ledvinách byly stanoveny radioimunologicky (EURIA-Angiotensin II RIA kit, EURO-DIAGNOSTICA AB, Malmö, Sweden), dle návodu přiloženého u kitu.

Úkol č. 2:

Stanovení plazmatických a renálních koncentrací ANG II u bdělých zvířat

U bdělých zvířat byl měřen systolický krevní tlak (SBP) pletysmograficky na ocase (MC 4000; Hatteras Instruments Co.) [Kopkan et al. 2005, Vaneckova et al. 2005]. Poté byli bdělí TGR a HanSD potkani dekapitováni. Bezprostředně po dekapitaci byla do předchlazené (4°C) zkumavky s inhibitory sbírána plná krev, poté byly odstraněny obě ledviny a srdce. Další postup byl shodný jako u anestetizovaných zvířat.

Statistická analýza

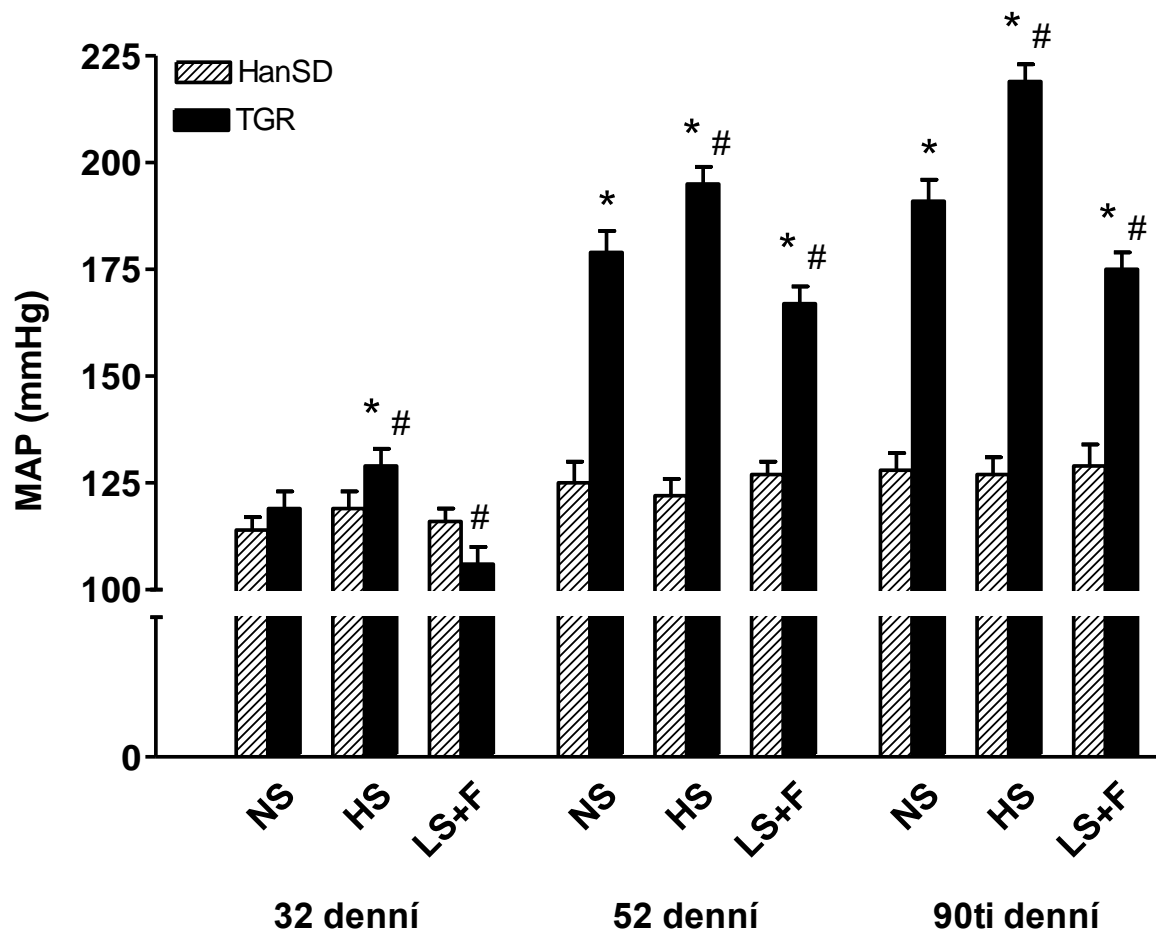
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Pro vyhodnocení rozdílů mezi stejně starými TGR a HanSD potkany, vystavenými stejným podmínkám, byl použit nepárový t-test. Hladina statistické významnosti byla definována úrovní $p < 0,05$.

C. Výsledky

Úkol č. 1: Studie u anestetizovaných zvířat

Hodnoty MAP jsou graficky znázorněny v grafu č. 7. Mezi 32 denními TGR a HanSD na NS dietě nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (119 ± 4 mmHg vs. 114 ± 3 mmHg). Naopak MAP u 52 a 90-ti denních TGR krmených NS dietou byl signifikantně vyšší v porovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (179 ± 5 mmHg vs. 125 ± 5 mmHg a 191 ± 5 mmHg vs. 128 ± 4 mmHg, $p < 0,05$). HS dieta nevyvolala významné zvýšení MAP u experimentálních skupin HanSD potkanů. Avšak u všech věkových skupin TGR způsobila HS dieta signifikantní zvýšení MAP v porovnání s 32, 52 i 90-ti denními TGR na NS dietě (129 ± 4 mmHg vs. 119 ± 4 mmHg, 195 ± 4 mmHg vs. 179 ± 5 mmHg a 219 ± 4 mmHg vs. 191 ± 5 mmHg, $p < 0,05$). Podobně LS dieta neovlivnila MAP u skupin HanSD potkanů, ale způsobila statisticky významné snížení MAP u TGR všech věkových skupin v porovnání s 32, 52 i 90-ti denními TGR na NS dietě (106 ± 4 mmHg vs. 119 ± 4 mmHg, 167 ± 4 mmHg vs. 179 ± 5 mmHg a 175 ± 4 mmHg vs. 191 ± 5 mmHg, $p < 0,05$).

Graf č. 7: Střední arteriální tlak (MAP) u 32, 52 a 90-ti denních HanSD a TGR



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)27

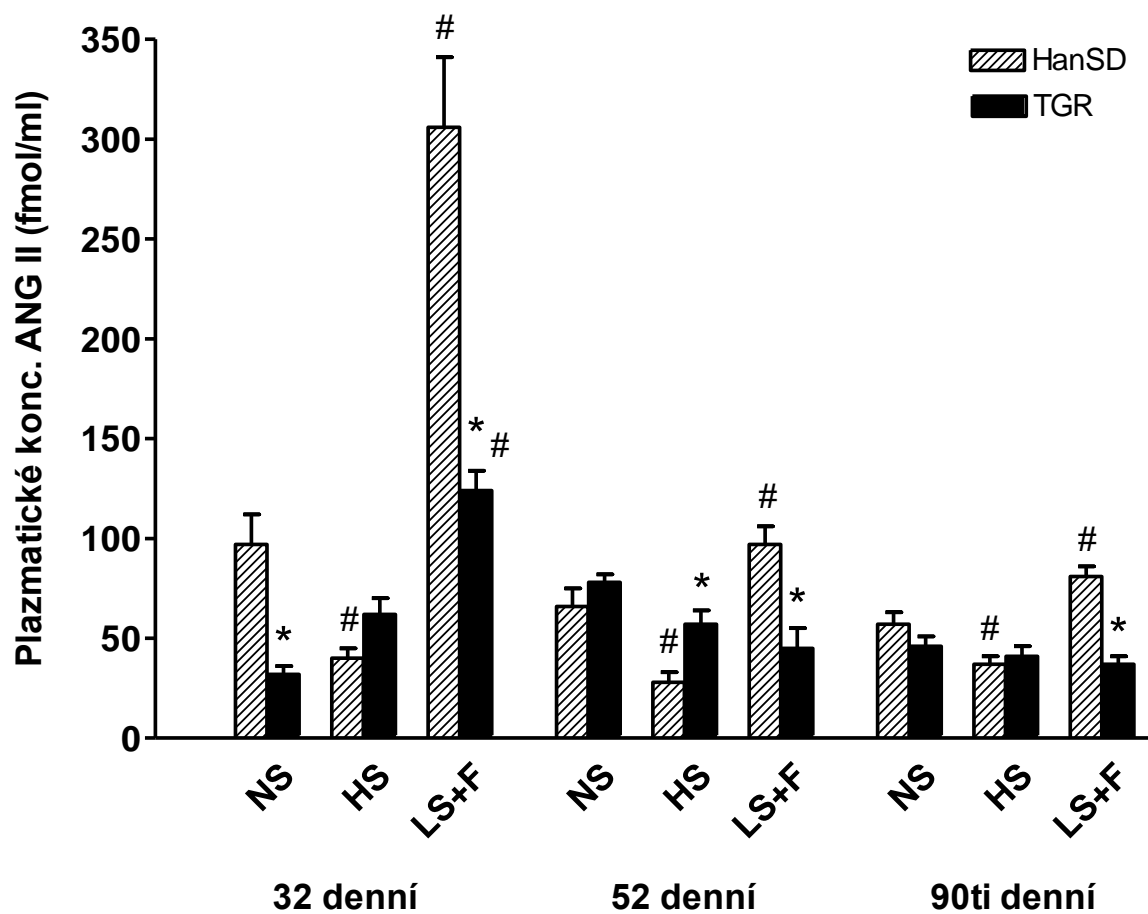
* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Plazmatické koncentrace ANG II naměřené u anestetizovaných samců jsou shrnuty v grafu č. 8. Hladiny ANG II v plazmě byly signifikantně vyšší u 32 denních HanSD krmených NS dietou v porovnání se stejně starými TGR na stejné dietě (97 ± 15 vs. 32 ± 4 fmol/ml, $p < 0,05$). Plazmatické koncentrace ANG II u 52 a 90-ti denních HanSD krmených NS dietou nebyly statisticky významně rozdílné v porovnání se stejně starými TGR na NS dietě (66 ± 9 vs. 78 ± 4 a 57 ± 6 vs. 46 ± 5 fmol/ml, $p < 0,05$). HS dieta neovlivnila koncentrace ANG II v plazmě u skupin TGR v porovnání s TGR na NS dietě. Avšak u 32, 52 i 90-ti denních HanSD potkanů HS dieta snížila plazmatické koncentrace ANG II v porovnání se stejně starými HanSD potkany na NS dietě (40 ± 5 vs. 97 ± 15 , 28 ± 5 vs. 66 ± 9 a 37 ± 4 vs. 57 ± 6 fmol/ml, $p < 0,05$). LS dieta zvýšila hladiny ANG II v plazmě u 32 denních TGR ve srovnání s 32 denními TGR na NS dietě (124 ± 10 vs. 32 ± 4 fmol/ml, $p < 0,05$), ale u 52 a 90-ti denních TGR tyto hladiny významně neovlivnila. Naopak u HanSD potkanů LS dieta vyvolala signifikantní zvýšení plazmatických koncentrací ANG II u všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (306 ± 35 vs. 97 ± 15 , 97 ± 9 vs. 66 ± 9 a 81 ± 5 vs. 56 ± 7 fmol/ml, $p < 0,05$).

Koncentrace ANG II v ledvinách jsou znázorněny v grafu č. 9. Obsah ANG II v ledvinách u 32 a 90-ti denních HanSD potkanů krmených NS dietou nebyl rozdílný od hodnot naměřených u stejně starých TGR na téže dietě (90 ± 6 vs. 68 ± 12 a 171 ± 22 vs. 156 ± 21 fmol/g tk., $p < 0,05$). Naproti tomu skupina 52 denních HanSD potkanů krmených NS dietou vykazovala statisticky významně nižší renální koncentrace ANG II v porovnání se stejně starými TGR na NS dietě (63 ± 12 vs. 245 ± 16 fmol/g tk., $p < 0,05$). HS dieta neovlivnila renální koncentrace ANG II u 32 denních TGR, ale signifikantně snížila koncentrace ANG II v ledvinách u 52 a 90-ti denních TGR v porovnání se stejně starými TGR na NS dietě (64 ± 7 vs. 245 ± 16 a 59 ± 10 vs. 156 ± 21 fmol/g tk., $p < 0,05$). U HanSD potkanů HS dieta zapříčinila statisticky významné snížení renálních koncentrací u všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (52 ± 6 vs. 90 ± 6 , 37 ± 4 vs. 63 ± 12 a 79 ± 9 vs. 171 ± 22 fmol/g tk., $p < 0,05$). LS dieta zvýšila obsah ANG II v ledvinách u 32 denních TGR ve srovnání s 32 denními TGR na NS dietě (244 ± 11 vs. 68 ± 12 fmol/g tk., $p < 0,05$), ale nezměnila hladiny ANG II v ledvinách u 52 a 90-ti denních TGR v porovnání se stejně starými TGR krmených NS dietou. U všech věkových skupin HanSD potkanů LS dieta vyvolala signifikantní zvýšení renálních koncentrací ANG II v porovnání s HanSD na NS dietě (257 ± 36 vs. 90 ± 6 , 109 ± 9 vs. 63 ± 12 a 263 ± 19 vs. 171 ± 22 fmol/g tk., $p < 0,05$).

Graf č. 8: Plazmatické koncentrace ANG II u anestetizovaných HanSD a TGR



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

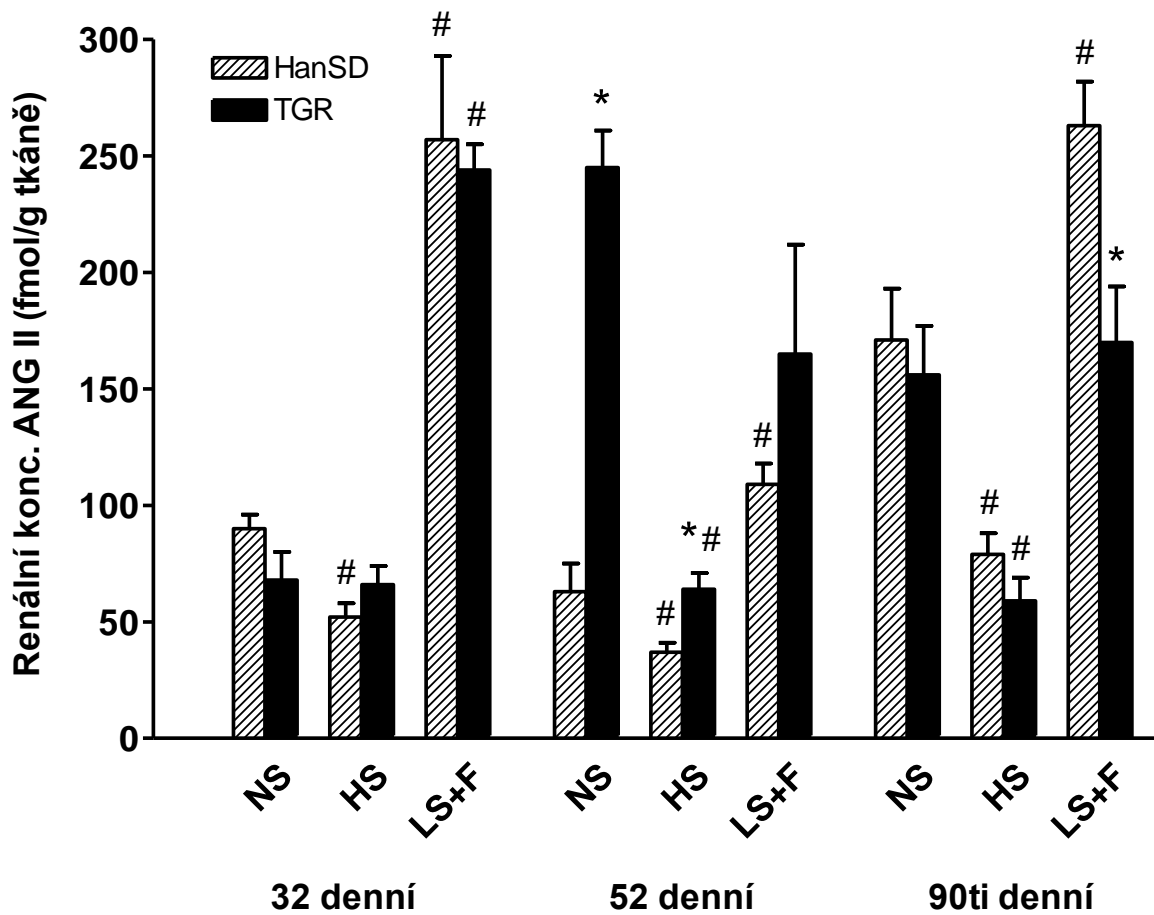
HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)27

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 9: Renální koncentrace ANG II u anestetizovaných HanSD a TGR



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)27

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

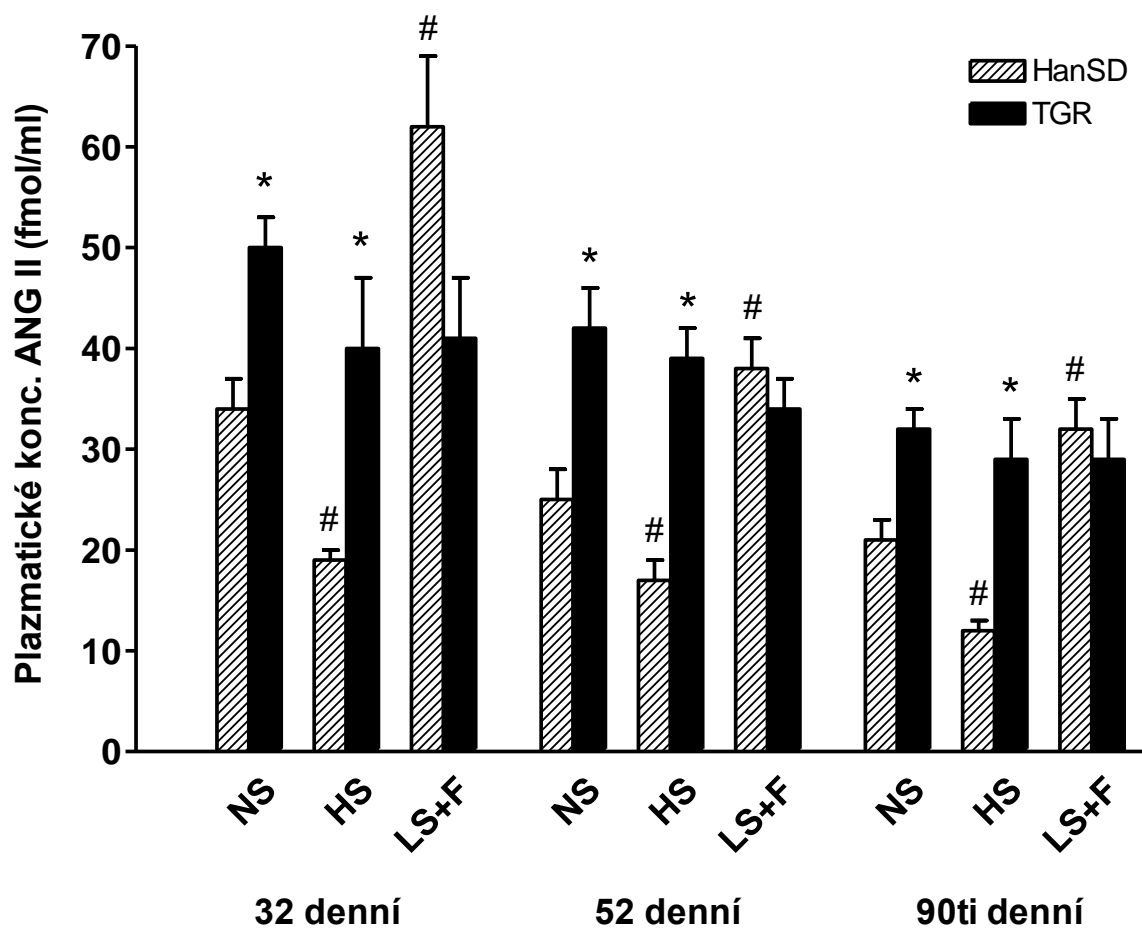
Úkol č. 2: Studie u bdělých zvířat

Podobně jako u anestetizovaných TGR zůstal SBP u 32 denních bdělých TGR krmených NS dietou v normotenzních mezích a nebyl signifikantně odlišný od hodnot SBP stejně starých HanSD (128 ± 5 vs. 123 ± 5 mmHg, $p < 0,05$). Avšak 52 denní TGR byli již výrazně hypertenzní v porovnání se stejně starými HanSD potkany (198 ± 5 vs. 136 ± 4 mmHg, $p < 0,05$). HanSD potkani nereagovali změnou v SBP na HS dietu ani na LS dietu. Naopak TGR zareagovali na zvýšený přísun soli statisticky významným zvýšením SBP u všech věkových skupin a na LS dietu signifikantním snížením SBP u 52 a 90-ti denních TGR.

Koncentrace ANG II naměřené v plazmě bdělých zvířat jsou znázorněny v grafu č. 10. U 32, 52 i 90-ti denních HanSD krmených NS dietou byly plazmatické koncentrace ANG II signifikantně nižší v porovnání se stejně starými TGR na stejné dietě (34 ± 3 vs. 50 ± 3 , 25 ± 3 vs. 42 ± 4 a 21 ± 2 vs. 32 ± 2 fmol/ml, $p < 0,05$). HS dieta statisticky významně snížila koncentraci ANG II v plazmě u HanSD všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (19 ± 1 vs. 34 ± 3 , 17 ± 2 vs. 25 ± 3 a 12 ± 1 vs. 21 ± 2 fmol/ml, $p < 0,05$), ale neovlivnila plazmatické koncentrace ANG II u TGR v porovnání s TGR na NS dietě. LS dieta naopak signifikantně zvýšila plazmatické koncentrace ANG II u HanSD všech věkových skupin ve srovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (62 ± 7 vs. 34 ± 3 , 38 ± 3 vs. 25 ± 3 a 32 ± 3 vs. 21 ± 2 fmol/ml, $p < 0,05$), ale taktéž neměla vliv na koncentrace ANG II v plazmě u TGR.

Obdobný trend byl zaznamenán u koncentrací ANG II naměřených v ledvinách (graf č. 11). Ve všech věkových skupinách HanSD krmených NS dietou byly renální koncentrace ANG II statisticky významně nižší v porovnání se stejně starými TGR na NS dietě (49 ± 3 vs. 109 ± 10 , 44 ± 3 vs. 69 ± 4 a 35 ± 2 vs. 55 ± 3 fmol/g tk., $p < 0,05$). HS dieta opět významně snížila koncentrace ANG II v ledvinách u 32, 52 i 90-ti denních HanSD v porovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (35 ± 3 vs. 49 ± 3 , 32 ± 2 vs. 44 ± 3 a 25 ± 2 vs. 35 ± 2 fmol/g tk., $p < 0,05$), ale neovlivnila koncentrace ANG II v ledvinách u skupin TGR v porovnání s TGR na NS dietě. Na rozdíl od HS diety vedla LS dieta k signifikantnímu zvýšení renálních koncentrací ANG II u HanSD všech věkových skupin ve srovnání se stejně starými HanSD na NS dietě (88 ± 4 vs. 49 ± 3 , 81 ± 8 vs. 44 ± 3 a 51 ± 3 vs. 35 ± 2 fmol/g tk., $p < 0,05$), ale také neměla vliv na koncentrace ANG II v ledvinách u TGR.

Graf č. 10: Plazmatické koncentrace ANG II u bdělých HanSD a TGR



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

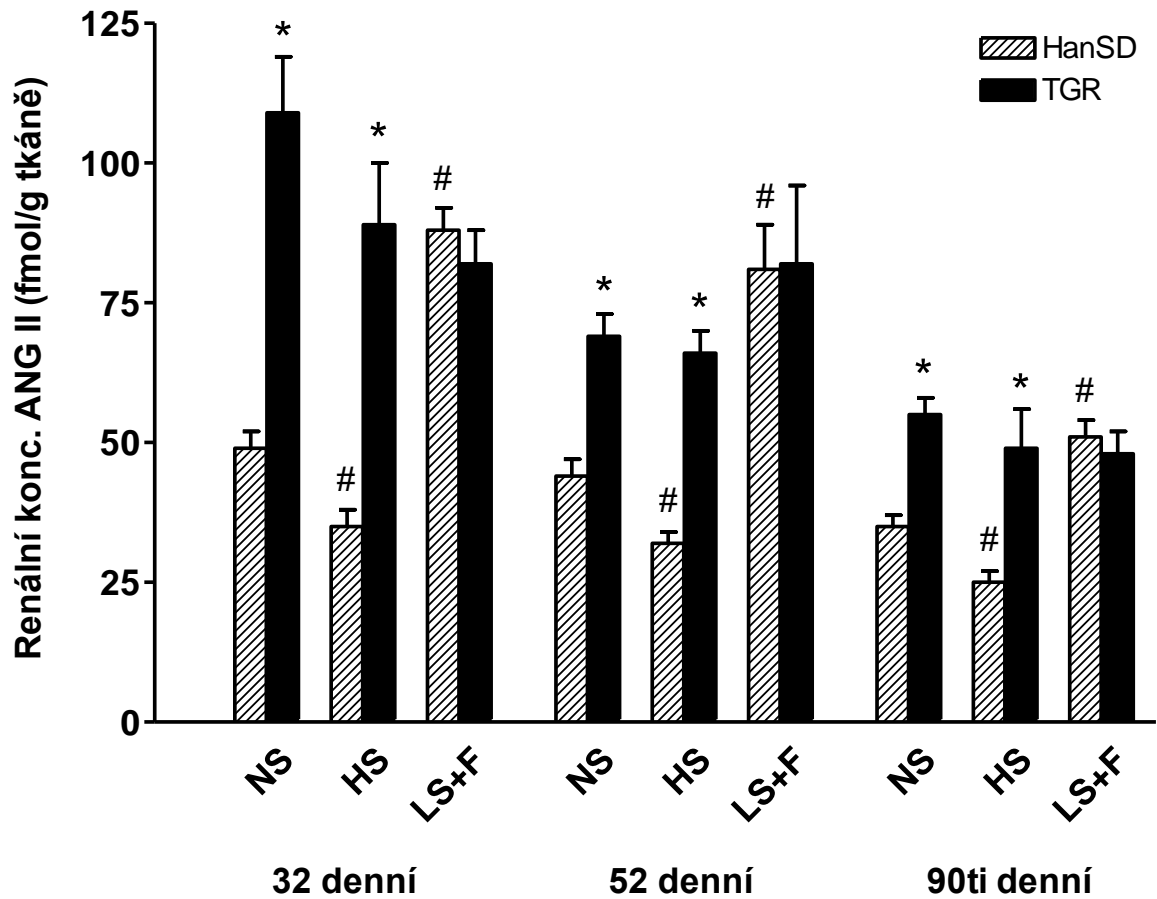
HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)²⁷

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 11: Renální koncentrace ANG II u bdělých HanSD a TGR



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)²⁷

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

D. Diskuse

Prvním cílem této studie bylo stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II během jednotlivých fází rozvoje hypertenze u anestezovaných TGR a zjištěná data porovnat s hodnotami naměřenými u stejně starých anestezovaných HanSD potkanů. Zjistili jsme, že plazmatické koncentrace ANG II byly nižší u 32 denních TGR v porovnání se stejně starými HanSD, ale mezi 52 i 90-ti denními TGR a stejně starými HanSD nebyl nalezen rozdíl. Renální koncentrace ANG II byly několikanásobně vyšší u anestezovaných TGR v časně fázi hypertenze (52 denní), ale nebyly rozdílné u anestezovaných TGR v prehypertenzní (32 denní) a pozdní (90-ti denní) fázi hypertenze v porovnání se stejně starými anestezovanými HanSD potkany. Tato zjištění, že plazmatické koncentrace ANG II u anestezovaných TGR zůstávají v kontrolních mezích a že intrarenální koncentrace ANG II u 52 denních TGR byly vyšší než u normotenzních 52 denních HanSD navzdory přetrvávajícímu vzestupu krevního tlaku, jsou kompatibilní s představou, že nepřiměřeně vysoké plazmatické a intrarenální koncentrace ANG II zhoršují tlakově-natriuretický mechanismus v ledvinách TGR, což pak přispívá k rozvoji a přetrvávání hypertenze u tohoto modelu [Navar 2004a]. Nicméně tyto naše poznatky jsou v protikladu k dřívějším zjištěním, včetně výsledků naší předchozí studie, které ukazují, že plazmatické a renální koncentrace ANG II jsou u hypertenzních TGR sniženy v porovnání s normotenzními HanSD [Mullins et al. 1990, Lee et al. 1995, Hilgers et al. 1992, Peters et al. 1996, Kopkan et al. 2004, Mitchell et al. 1997]. Avšak je nutné poznamenat, že téměř všechny předchozí studie byly dělány u anestezovaných, chirurgickým zákrokem stresovaných zvířat a jak již bylo uvedeno výše, je známo, že anestézie a chirurgický zákrok výrazně stimulují uvolňování reninu a následně aktivitu RAS [Yun et al. 1978, Pettinger et al. 1975, Johnson and Malvin 1975]. Od té doby bylo přesvědčivě prokázáno, že ledviny TGR jsou prosté reninu [Mullins et al. 1990, Lee et al. 1995, Bohlender et al. 1998]. Je možné, že RAS je vlivem anestézie a rozsáhlejších chirurgických postupů, tj. příprava zvířat pro funkční a mikropunkční studie ledvin [Kopkan et al. 2004, Mitchell et al. 1997, Kopkan et al. 2005], aktivován ve větší míře u HanSD s neporušenou syntézou a uvolňováním reninu než u TGR. Tato teorie je v souladu s výsledky skupiny badatelů Mitchell a spol. [Mitchell et al. 1997], kteří zjistili, že pokud jsou renální koncentrace ANG II měřeny ve vzorcích získaných po krátké anestézii, mají hypertenzní TGR

a normotenzní HanSD podobné hodnoty. Avšak pokud jsou koncentrace ANG II v ledvinách měřeny u zvířat, která podstoupila mikropunkční postupy, pak TGR vykazují nižší koncentrace než normotenzní HanSD [Mitchell et al. 1997]. Tento názor byl dále podpořen nedávným zjištěním Wanga a spol. [Wang et al. 2003], kteří ukázali, že ANG II-infundovaní hypertenzní potkani, což je jiný model hypertenze se silně potlačenou aktivitou intrarenálního reninu, mají díky přípravě na mikropunkci nižší plazmatické a renální koncentrace ANG II v porovnání s kontrolními zvířaty. Bylo také zjištěno, že u ANG II-infundovaných potkanů, kteří nebyli podrobena rozsáhlejší chirurgii nebo u bdělých zvířat, byly koncentrace ANG II vyšší než u kontrolních skupin [Zou et al. 1996, Zou et al. 1998]. Mimoto jsme v naší nedávné studii pozorovali, že plazmatické a renální koncentrace ANG II byly nižší u anestetizovaných prehypertenzních TGR v porovnání se stejně starými anestetizovanými HanSD, ale pokud byly vzorky odebrány zvířatům ihned po dekapitaci, byly získány opačné výsledky [Kopkan et al. 2005].

Proto dalším úkolem bylo ověřit předpoklad, že odlišné reakce na anestézii a chirurgický zákrok mohou pozměnit plazmatické a renální koncentrace ANG II. Vyhodnocovali jsme koncentrace ANG II ve vzorcích krve a ledvinné tkáni odebraných ihned po dekapitaci zvířete. Zjistili jsme, že plazmatické a renální koncentrace ANG II byly signifikantně vyšší u TGR všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD potkany. Ačkoliv nám tato data neumožňují určit specifický mechanismus odpovědný za zvýšené koncentrace ANG II v plazmě i v ledvinách, lze uvážit několik možností. Je možné, že zvýšené plazmatické koncentrace ANG II u TGR jsou výsledkem zvýšené plazmatické reninové aktivity, která vede ke zvýšení tkáňové exprese myšího reninového genu a jeho zvýšenému uvolňování do cirkulace, jak bylo popsáno v dřívějších studiích [Hilgers et al. 1992, Bohlender et al. 1998, Senanayake et al. 1998, Langheinrich et al. 1996]. S ohledem na zvýšené intrarenální koncentrace ANG II u TGR je důležité vědět, že data získaná u 2K1C („two-kidney, one-clip“) Goldblattovských hypertenzních potkanů jasně ukazují disociaci mezi koncentrací reninu a koncentrací ANG II v kontralaterální ledvině. Tato zjištění naznačují, že ztráta (deplece) reninu v ledvinách není nutně spojená se ztrátou ANG II v ledvinné tkáni [Navar et al. 1998b]. Naopak bylo zaznamenáno, že koncentrace ANG II v kontralaterálních ledvinách 2K1C hypertenzních potkanů zůstávají zvýšené, přestože koncentrace reninu v ledvinách byla potlačena [Navar et al. 1998b, Cervenka et al. 1999c, El-Dahr et al. 1993, Tokuyama et al. 2002, Bruna et al. 1995, Sadjadi et al.

2002]. Tyto poznatky podporují skutečnost, že na reninu nezávislý mechanismus může být také odpovědný za zvýšenou tvorbu ANG II v ledvinné tkáni TGR chudé na renin. Podobně bylo prokázáno, že u ANG II-dependentních modelů hypertenze, u nichž je obsah reninu v ledvinách značně potlačen, je AT₁ receptory-zprostředkovaná internalizace ANG II z cirkulace důležitým mechanismem zodpovědným za zvýšené intrarenální koncentrace ANG II [Zou et al. 1996, Zou et al. 1998, Ingert et al. 2002b, Navar and Nishiyama 2004b]. Tento mechanismus by se také mohl uplatňovat u TGR. Nicméně jsou zapotřebí další studie, které by se zabývaly touto otázkou.

Dřívější studie ukazují, že dlouho trvající infúze subpresorických dávek ANG II [Osborn et al. 2003, deClue et al. 1978, Hall 1986, Hall et al. 1980, Hall and Brands 2000], nebo krátkodobé působení presorických dávek ANG II [Howard et al. 2005, Lombardi et al. 1999, Franco et al. 2001] vyvolávají u experimentálních zvířat sůl-dependentní hypertenzi. Neschopnost přiměřené regulace snižováním plazmatických a renálních koncentrací ANG II jako odpověď na zvýšený příjem soli by mohla být klíčovým faktorem v rozvoji sůl-senzitivních složek hypertenze [Hodge et al. 2002, Hall et al. 1980]. Kromě toho předchozí studie dokázaly, že aktivita RAS je nepřímo úměrná množství přijaté soli a že zvýšená aktivita RAS při nedostatku sodíku představuje kompenzační mechanismus schopný udržet v rovnováze hladinu sodíku, stálý objem extracelulárních tekutin (OECT) a krevní tlak (TK) [Hall and Brands 2000, Hall 1986, Hall et al. 1980, Cervenka et al. 1999a, Cholewa et al. 2005]. Dále bylo zjištěno, že heterozygotní TGR reagují na zvýšený přísun soli vyšší úrovní hypertenze [Callahan et al. 1996, Opocensky et al. 2004] a naopak na solnou depleci reagují zmírněním rozvoje hypertenze [Vaneckova et al. 2004, Vaneckova et al. 2005]. Tato zjištění naznačují, že TGR vykazují důležitou sůl-senzitivní složku hypertenze. Proto dalším cílem této naší studie bylo určit vliv diety s vysokým a s nízkým obsahem soli na výši krevního tlaku a na plazmatické a renální koncentrace ANG II u TGR i HanSD potkanů v průběhu rozvoje hypertenze.

Zjistili jsme, že dieta s vysokým obsahem soli vyvolala signifikantní zvýšení krevního tlaku u TGR všech věkových skupin v porovnání se stejně starými TGR na dietě s normálním obsahem soli, ale neovlivnila výši krevního tlaku u HanSD. Jelikož je dobře známo, že anestézie může pozměnit krevní tlak [Vatner 1978], měřili jsme TK také u bdělých zvířat. Získané hodnoty SBP bdělých zvířat potvrdily hodnoty MAP naměřené u anestezovaných zvířat. Dále dieta s vysokým obsahem soli snížila plazmatické a renální koncentrace ANG II u HanSD všech věkových skupin, ale u TGR

tyto koncentrace neovlivnila. Dieta s nízkým obsahem soli podstatně snížila krevní tlak u transgenních potkanů, avšak neovlivnila plazmatické a renální koncentrace ANG II u TGR všech věkových skupin. Tyto výsledky odpovídají našemu nedávno uvedenému poznatku, že dlouhodobé podávání diety s nízkým obsahem soli, započaté ihned po odstavu, sníží krevní tlak u heterozygotních TGR až téměř k normotenzním hladinám [Vaneckova et al. 2004, Vaneckova et al. 2005]. Na druhou stranu u HanSD všech věkových skupin dieta s nízkým obsahem soli neovlivnila výši krevního tlaku, ale signifikantně zvýšila plazmatické a renální koncentrace ANG II. Pozorované změny v koncentracích ANG II po podání diety s vysokým nebo s nízkým obsahem soli HanSD potkanům jsou v souladu s předchozími záznamy a svědčí o tom, že transgen-negativní normotenzní HanSD vykazují fyziologické reakce RAS na změny v příjmu množství soli [Fox et al. 1992, Ingert et al. 2002a, Ingert et al. 2002b, Imig et al. 1999]. Naměřená data ukazují, že heterozygotní TGR potkani vykazují důležitou sůl-senzitivní složku hypertenze, která je spojována se ztrátou přiměřených regulačních účinků zvýšené či snížené dávky soli na plazmatické a renální koncentrace ANG II.

Zajímavé je naše zjištění, že plazmatické a renální koncentrace ANG II u TGR se postupem času snižují, což ukazuje, že TGR představují model věkově-závislé aktivace RAS. Toto tvrzení je v souladu s předchozími studii, které udávají, že systémová i intrarenální aktivita RAS je nejvyšší po narození a snižuje se během postnatálního života a stárnutí [Yosipiv and El-Dahr 1996, Zicha and Kunes 1999].

E. Souhrn výsledků

1. **Anestézie** thiopentalem sodným **zvyšuje** plazmatické a renální koncentrace ANG II ve větší míře u HanSD v porovnání s TGR. Dále **plazmatické a renální koncentrace ANG II u bdělých heterozygotních TGR samců jsou značně zvýšené.**
2. **Dieta s vysokým obsahem soli u TGR zvyšuje krevní tlak, ale nesnižuje přiměřeně plazmatické a renální koncentrace ANG II, naopak dieta s nízkým obsahem soli u TGR snižuje krevní tlak, ale nezvyšuje plazmatické a renální koncentrace ANG II.** Tudíž lze předpokládat, že zvýšené koncentrace cirkulujícího ANG II přímo přispívají ke zvětšení periferní vaskulární rezistence a ke zvýšení krevního tlaku u TGR. Je také možné, že zvýšené intrarenální koncentrace ANG II ohrožují schopnost ledvin vylučovat přiměřené množství sodíku za normálního krevního tlaku. Mimoto naše naměřená data vypovídají o tom, že **TGR potkani vykazují důležitou sůl-senzitivní složku hypertenze,** což se projevuje narušenou regulací plazmatických a renálních koncentrací ANG II vlivem změněné dávky soli. Tato skutečnost možná brání ledvinám, aby reagovaly na ANG II-zprostředkované zvýšení krevního tlaku odpovídajícím zvýšením ve vylučování sodíku, což může přispět k hypertenzi u TGR.

Na základě našich výsledků můžeme říct, že **TGR mají narušenou interakci mezi sodíkovou rovnováhou a řízením aktivity RAS. Následkem je pak ztráta schopnosti regulovat TK u tohoto modelu.**

6. Studie č. 3:

V řadě studií jsou u experimentálních modelů hypertenze popisovány rozdíly mezi samci a samicemi v rozvoji a v průběhu hypertenze, tj. rozdílná exprese a aktivita jednotlivých složek RAS, u samců vyšší TK a vážnější orgánové poškození, u samic ve stáří spontánní návrat TK až k normotenzní hodnotám. Vzhledem k vyskytujícím se pohlavním rozdílům, je možné očekávat odlišnou reakci samic na anestézii a chirurgický stres, jakož i na změny v dietním příjmu soli.

Účinky zvýšeného a sníženého příjmu soli na průběh hypertenze a na koncentrace angiotenzinu II u Ren-2 transgenních samic



Cíle studie:

- Stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II u anestezovaných a bdělých heterozygotních TGR samic.
- Ověřit vliv změn dietního příjmu soli na výši krevního tlaku (TK) a na koncentrace ANG II u TGR a HanSD samic.

A. Úvod

Vzhledem ke zjištění, že rozdíly v aktivitě RAS samců a samic mohou hrát roli v kontrole TK a v rozvoji hypertenze u různých geneticky a experimentálně vyvolaných modelů hypertenze [Reckellhoff 2001, Maris et al. 2005, Xue et al. 2005, Crofton et al.

1993, Maric 2005, Ganten et al. 1989, Haywood and Hinojosa-Laborde 1997, Ouchi et al. 1987] a jelikož byl potvrzen značný sexuální dimorfismus ve změnách TK [Lee et al. 1996], lze předpokládat, že by transgenní samice mohly reagovat odlišně na anestézii a na změny v sodíkové rovnováze v porovnání s transgenními samci.

Proto prvním cílem naší studie bylo stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II během prehypertenze (32 denní), vývojové (38 denní), časně (52 denní) a pozdní (90-ti denní) fáze hypertenze u anestezovaných a bdělých (dekapitovaných) heterozygotních transgenních samic a stejně starých kontrolních HanSD samic. Jelikož existují práce ukazující, že TGR potkani vykazují sůl-senzitivní složku hypertenze [Callahan et al. 1996, Opočenský et al. 2004, Vaněčková et al. 2004, Vaněčková et al. 2005, Burgelova et al. 2005] a protože jsme nedávno prokázali, že tato citlivost vůči soli je u heterozygotních TGR samců spojována se ztrátou běžných regulačních účinků měněných dávek přijímané soli na produkci ANG II [předcházející studie uvedená v této práci], bylo druhým cílem této studie ověřit vliv diety s vysokým a s nízkým obsahem soli na výši krevního tlaku a na plazmatické a renální koncentrace ANG II u TGR a HanSD samic.

B. Experimentální část

Materiál a metody

Linie heterozygotních TGR byly vytvářeny pářením homozygotních TGR samců s HanSD samicemi. Stejně HanSD samice se následně nechaly spářit s HanSD samci za vzniku HanSD potomků, kteří představují stejně staré transgen-negativní kontroly. Tento pářicí algoritmus byl vybrán, aby redukoval potenciální variabilitu v genetickém pozadí. Všichni potkani byli odstaveni ve věku 28 dní. HanSD a TGR samice z několika vrhů byly náhodně zařazeny do jednotlivých experimentálních skupin a to tak, aby v jedné skupině nepřevládala zvířata z jednoho vrhu. Před vlastním experimentem byly heterozygotní TGR a HanSD samice krmeny dietou s normálním obsahem soli (NS; 0,6 g NaCl/100 g krmiva) nebo dietou s vysokým obsahem soli (HS; 2 g/100 g krmiva) po dobu čtyř dnů. Samicím na dietě s nízkým obsahem soli byl nejdříve po dobu jednoho dne podáván furosemid (F) v pitné vodě (40 mg/l, Furon; Merckle Corp., Blaubeuren, Germany) a poté byly čtyři dny krmeny dietou s nízkým obsahem soli (LS; <0.01 g NaCl/100 g krmiva; Altromin, Lage, Germany). Dřívější studie ukázaly, že taková solná deplece vede k silné stimulaci renin-angiotenzinového systému [Ingert et al. 2002a, Ingert et al. 2002b, Burgelová et al. 2005, Imig et al. 1999, předchozí výše uvedená studie]. Až do vlastního experimentu měla zvířata neomezený přísun krmiva a pitné vody. Experimenty byly provedeny na anestetizovaných a bdělých HanSD potkanech a TGR. Plazmatické i renální koncentrace ANG II byly měřeny u čtyř věkově rozdílných skupin TGR po deseti zvířatech, tj. během prehypertenzní (32 denní), vývojové (38 denní), časně (52 denní) a pozdní (90-ti denní) fáze hypertenze. Jako kontroly byly použity čtyři skupiny stejně starých anestetizovaných a bdělých HanSD samic po deseti zvířatech.

Úkol č. 1:

Určení plazmatických a renálních koncentrací ANG II u anestetizovaných zvířat

Následující postup byl stejný jako u předcházející studie na TGR samcích provedené v rámci této dizertační práce.

Úkol č. 2:

Stanovení plazmatických a renálních koncentrací ANG II u bdělých zvířat

U bdělých zvířat byl měřen systolický krevní tlak (SBP) pletysmograficky na ocase (MC 4000; Hatteras Instruments Co.) [Kopkan et al. 2005, Vaneckova et al. 2005, Dvořák et al. 2004]. Poté byli bdělí TGR a HanSD potkani dekapitováni. Bezprostředně po dekapitaci byla do předchlazené (4°C) zkumavky s inhibitory sbírána plná krev, poté byly odstraněny obě ledviny a srdce. Další postup byl shodný jako u anestetizovaných zvířat.

Statistická analýza

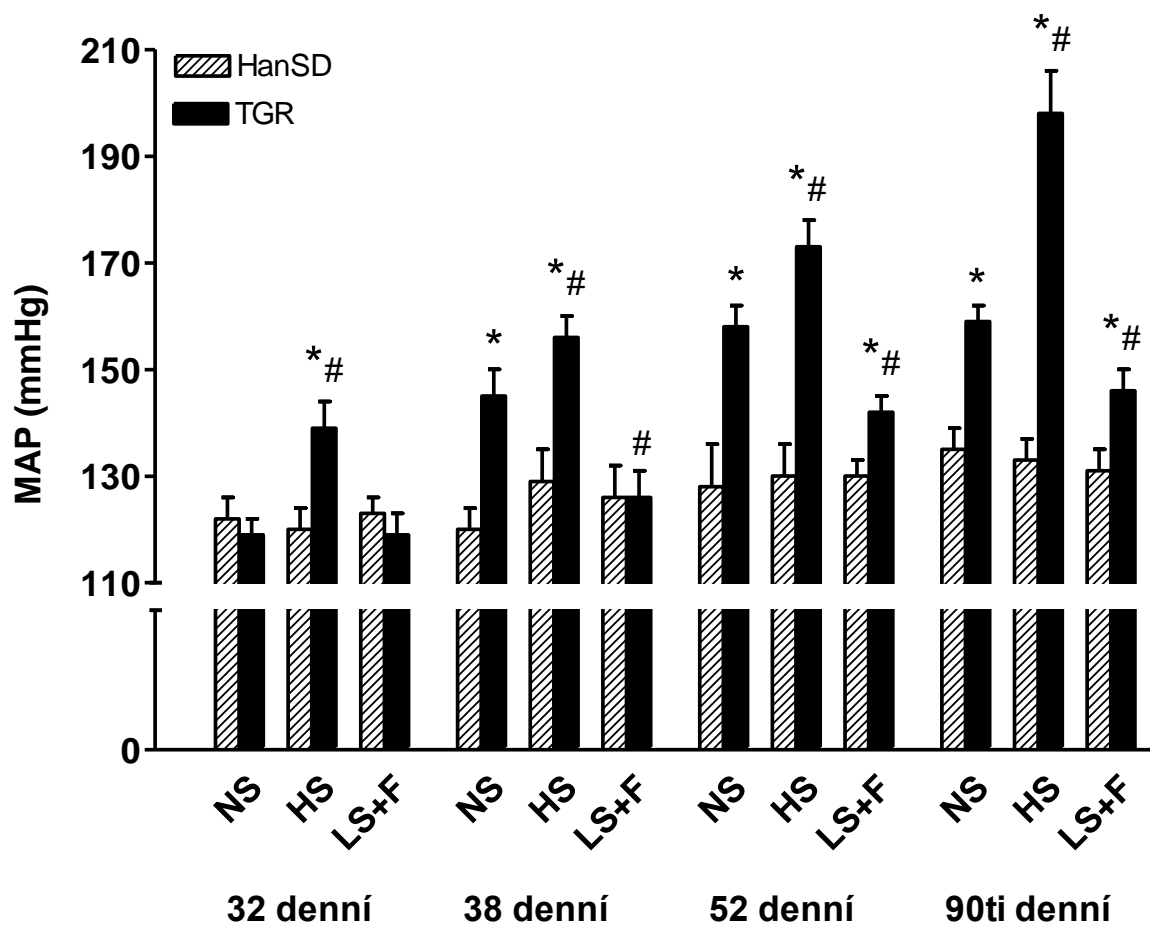
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Pro vyhodnocení rozdílů mezi stejně starými TGR a HanSD potkany vystavenými stejným podmínkám (anestézie nebo dekapitace), byl použit nepárový t-test. Hladina statistické významnosti byla definována úrovní $p < 0,05$.

C. Výsledky

Úkol č. 1: TK, plazmatické a renální konc. ANG II u anestetizovaných zvířat

Hodnoty MAP jsou znázorněny v grafu č. 12. MAP u 32 denních TGR na NS dietě nebyl statisticky významně odlišný od stejně starých HanSD (119 ± 3 vs. 122 ± 4 mmHg). Avšak u 38, 52 a 90-ti denních TGR na NS dietě byl MAP signifikantně vyšší v porovnání se stejně starými HanSD potkany (145 ± 5 vs. 120 ± 4 , 158 ± 4 vs. 128 ± 8 a 159 ± 3 vs. 135 ± 4 mmHg, $p < 0,05$). HS dieta nezměnila MAP u žádné věkové skupiny HanSD potkanů. Avšak HS dieta vyvolala signifikantní zvýšení MAP u 32, 38, 52 i 90-ti denních transgenních samic až k hladinám 139 ± 5 , 156 ± 4 , 173 ± 5 resp. 196 ± 8 mmHg ($p < 0,05$) v porovnání s TGR samicemi na NS dietě. LS dieta statisticky významně neovlivnila MAP u HanSD samic všech věkových skupin ani u 32 denních TGR samic. Nicméně u 38, 52 i 90-ti denních transgenních samic LS dieta signifikantně snížila MAP až k hodnotám 126 ± 5 , 142 ± 3 a 146 ± 4 mmHg ($p < 0,05$) v porovnání s TGR samicemi krmenými NS dietou.

Graf č. 12: Střední arteriální tlak u 32, 38, 52 a 90-ti denních HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)27

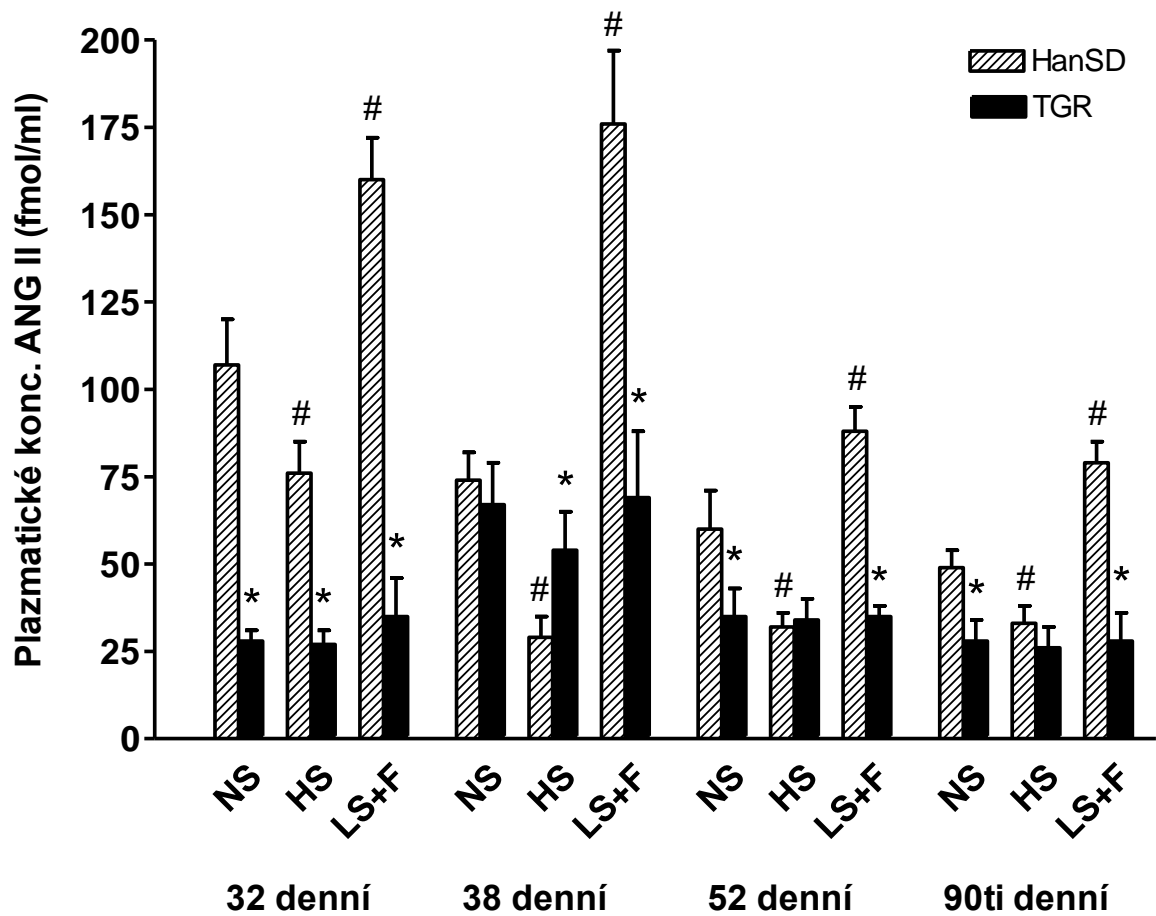
* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 13 shrnuje plazmatické koncentrace ANG II u anestezovaných samic. Plazmatické koncentrace ANG II byly signifikantně vyšší u 32, 52 a 90-ti denních HanSD na NS dietě než u stejně starých TGR krmených NS dietou, u 38 denních HanSD a TGR na NS dietě se koncentrace ANG II v plazmě nelišily. HS dieta snížila hladiny ANG II v plazmě u HanSD samic všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě (76 ± 9 vs. 107 ± 13 , 29 ± 6 vs. 74 ± 8 , 32 ± 4 vs. 60 ± 11 a 33 ± 5 vs. 49 ± 5 fmol/ml, $p < 0,05$). LS dieta vyvolala statisticky významné zvýšení plazmatických koncentrací ANG II u 32, 38, 52 i 90-ti denních HanSD samic v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě (160 ± 12 vs. 107 ± 13 , 176 ± 21 vs. 74 ± 8 , 88 ± 7 vs. 60 ± 11 a 79 ± 6 vs. 49 ± 5 fmol/ml, $p < 0,05$). U transgenních samic všech věkových skupin HS ani LS dieta statisticky významně neovlivnila koncentrace ANG II v plazmě.

Renální koncentrace ANG II naměřené u anestezovaných samic jsou znázorněny v grafu č. 14. Koncentrace ANG II v ledvinách 32, 38, 52 i 90-ti denních HanSD samic nebyly signifikantně rozdílné od stejně starých TGR samic na NS dietě (118 ± 24 vs. 114 ± 12 , 122 ± 12 vs. 94 ± 11 , 64 ± 6 vs. 79 ± 5 a 87 ± 10 vs. 74 ± 7 fmol/g tkáň, $p < 0,05$). HS dieta neovlivnila renální koncentrace ANG II u TGR, ale signifikantně snížila koncentrace ANG II v ledvinách u 32, 38, 52 i 90-ti denních HanSD samic v porovnání se stejně starými HanSD samicemi krmenými NS dietou (64 ± 16 vs. 118 ± 24 , 46 ± 6 vs. 122 ± 12 , 34 ± 5 vs. 64 ± 6 a 49 ± 5 vs. 87 ± 10 fmol/g tkáň, $p < 0,05$). LS dieta nezměnila hladiny ANG II v ledvinách u TGR samic, ale vyvolala statisticky významné zvýšení renálních koncentrací ANG II u HanSD samic všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě (244 ± 27 vs. 118 ± 24 , 195 ± 16 vs. 122 ± 12 , 125 ± 8 vs. 64 ± 6 a 139 ± 7 vs. 87 ± 10 fmol/g tkáň, $p < 0,05$).

Graf č. 13: Plazmatické konc. ANG II u anestetizovaných HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

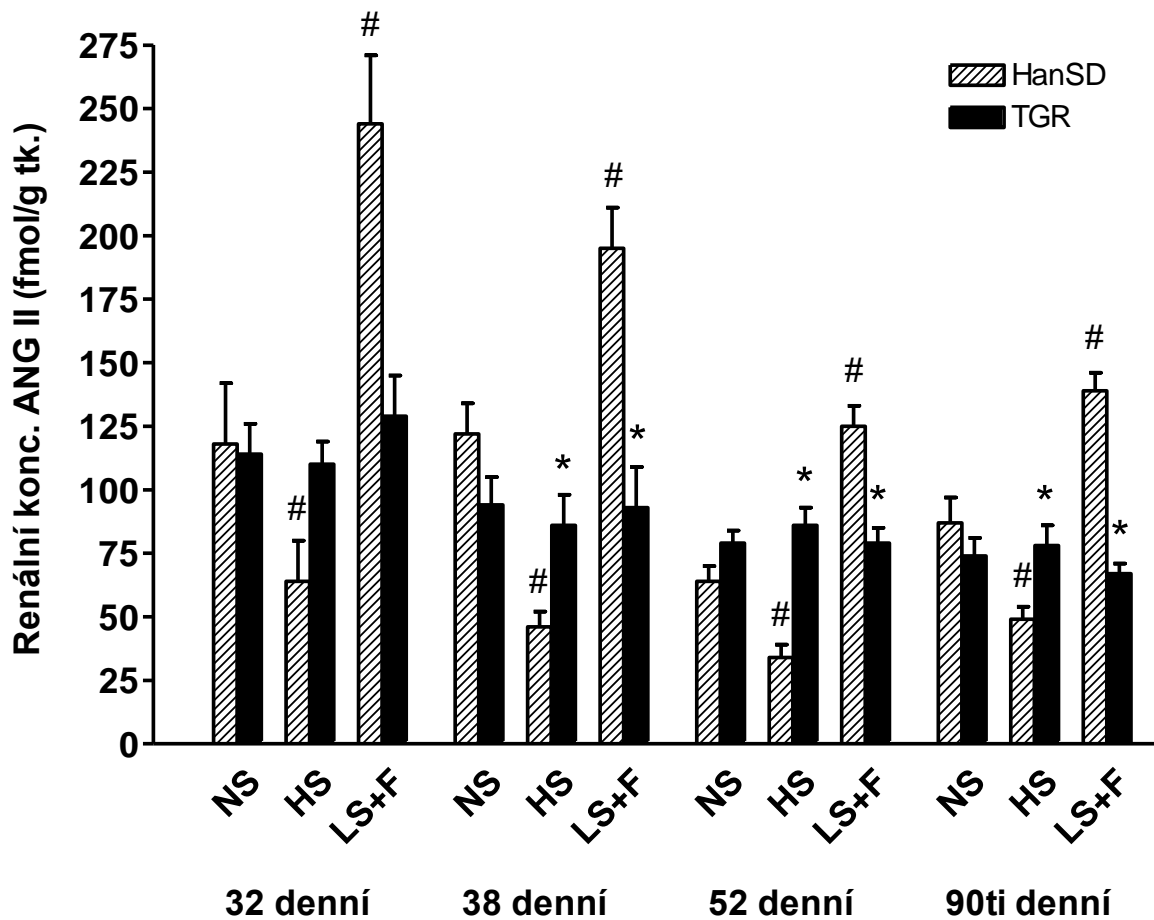
HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)²⁷

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 14: Renální koncentrace ANG II u anestezovaných HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)²⁷

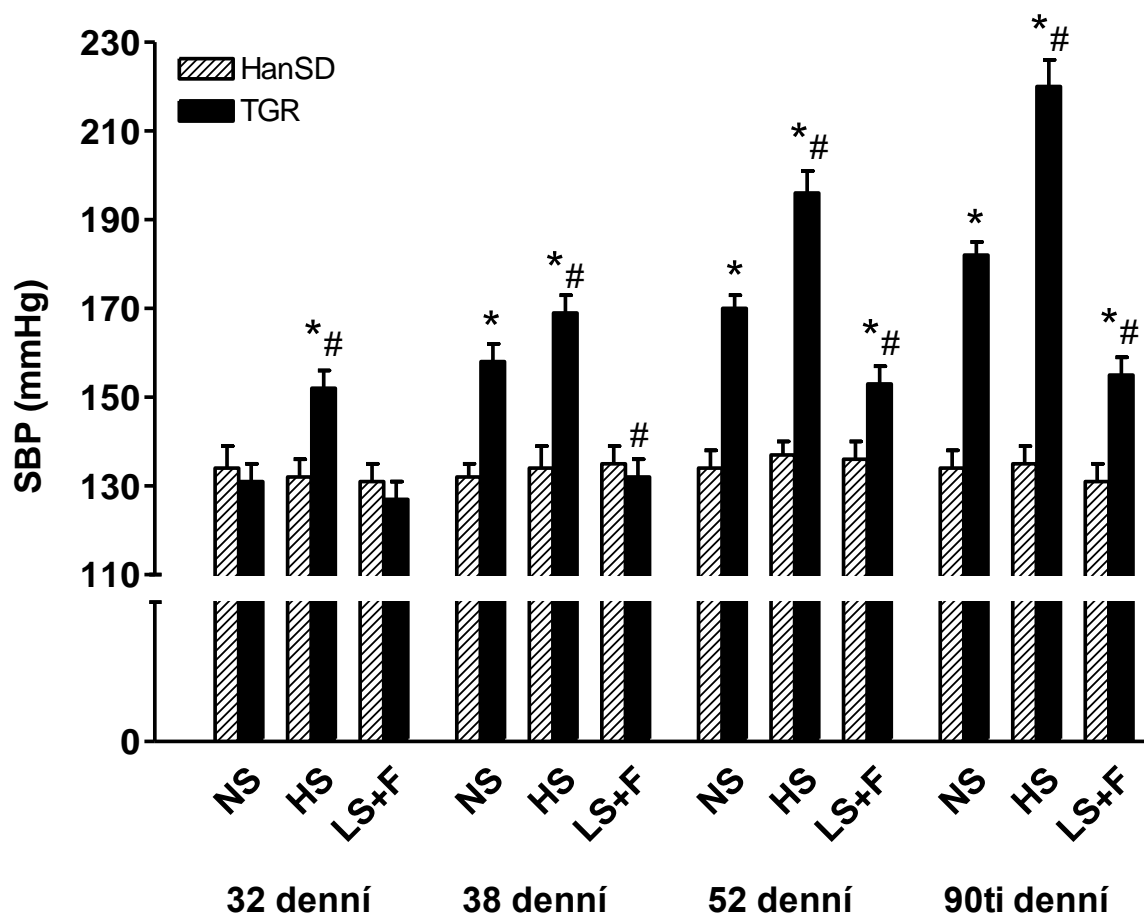
* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Úkol č. 2: TK, plazmatické a renální koncentrace ANG II u bdělých zvířat

Co se týče rozvoje hypertenze a citlivosti TK na změny v sodíkové rovnováze, údaje o SBP naměřené u bdělých HanSD a TGR samic potvrdily informace o MAP získané u stejných skupin anestetizovaných zvířat. Hodnoty SBP bdělých samic jsou znázorněny v grafu č. 15. SBP u 32 denních TGR samic krmených NS dietou se držel v mezích normotenze, statisticky významně se nelišil od SBP stejně starých HanSD na NS dietě (131 ± 4 vs. 134 ± 5 mmHg, $p < 0,05$). Avšak 38 denní transgenní samice krmené NS dietou již byly jasně hypertenzní v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě (158 ± 4 vs. 132 ± 3 mmHg, $P < 0,05$). Kontrolní HanSD samice nereagovaly významnou změnou v SBP na HS ani na LS dietu. Heterozygotní transgenní samice všech věkových skupin reagovaly na HS dietu signifikantním zvýšením v SBP. Na LS dietu reagovaly 38, 52 a 90-ti denní TGR samice statisticky významným snížením v SBP.

Graf č. 15: Systolický krevní tlak u 32, 38, 52 a 90-ti denních HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)27

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

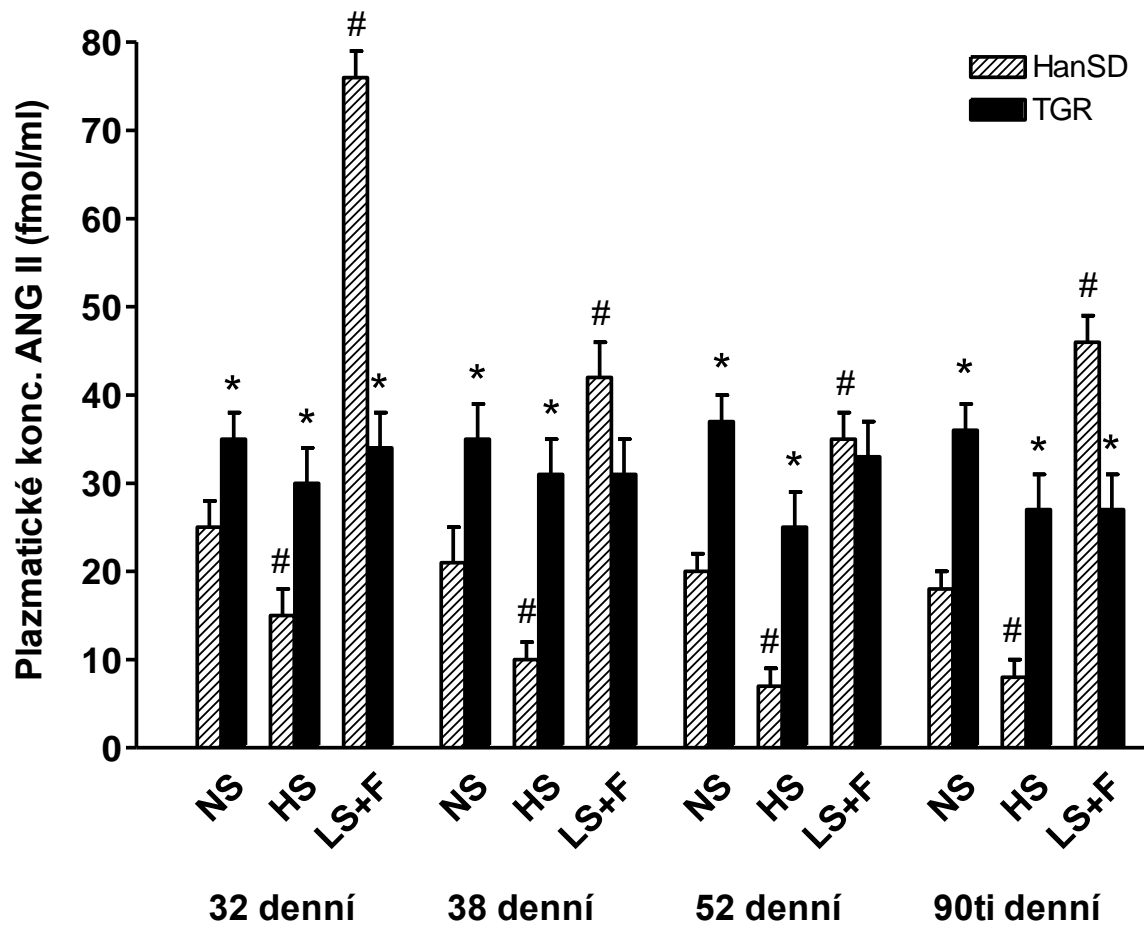
$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 16 shrnuje plazmatické koncentrace ANG II stanovené u bdělých HanSD a TGR samic. Plazmatické koncentrace ANG II u 32, 38, 52 i 90-ti denních HanSD samic krmených NS dietou byly signifikantně nižší v porovnání se stejně starými TGR samicemi na NS dietě (25 ± 3 vs. 35 ± 3 , 21 ± 4 vs. 35 ± 4 , 20 ± 2 vs. 37 ± 3 a 18 ± 2 vs. 36 ± 3 fmol/ml, $p < 0,05$). HS dieta významně snížila a LS dieta naopak značně zvýšila koncentrace ANG II v plazmě u HanSD samic všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD na NS dietě. U všech experimentálních skupin TGR samic HS dieta ani LS dieta neovlivnily plazmatické koncentrace ANG II.

Renální koncentrace ANG II jsou znázorněny v grafu č. 17. Koncentrace ANG II v ledvinách byly statisticky významně nižší u HanSD samic všech věkových skupin krmených NS dietou než u stejně starých TGR na NS dietě (39 ± 2 vs. 49 ± 4 , 39 ± 4 vs. 57 ± 4 , 30 ± 5 vs. 49 ± 4 a 29 ± 3 vs. 46 ± 4 fmol/g tkáně, $p < 0,05$). HS dieta opět snížila renální koncentrace ANG II u všech experimentálních skupin HanSD samic v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě, ale neovlivnila je u TGR samic. LS dieta signifikantně zvýšila koncentrace ANG II v ledvinách u HanSD samic všech věkových skupin v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě, ale neovlivnila je u transgenních samic.

Graf č. 18 znázorňuje rozvoj srdeční hypertrofie u TGR samic (vyjádřené jako poměr váhy srdce ku tělesné hmotnosti; graf zahrnuje hodnoty naměřené u anestetizovaných i bdělých zvířat). 32 denní TGR samice krmené NS dietou nevykazovaly srdeční hypertrofii v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě ($4,01 \pm 0,11$ vs. $3,93 \pm 0,06$; $p < 0,05$). Avšak u 38, 52 a 90-ti denních transgenních samic na NS dietě již byla zjištěna významná srdeční hypertrofie v porovnání se stejně starými HanSD samicemi na NS dietě ($4,38 \pm 0,09$ vs. $3,98 \pm 0,05$; $4,07 \pm 0,06$ vs. $3,63 \pm 0,07$ a $3,47 \pm 0,04$ vs. $3,05 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Změny v množství přijímané soli (zvýšené či snížené) neovlivnily poměr váhy srdce ku tělesné hmotnosti (HW/BW) u HanSD samic všech experimentálních skupin. Na druhou stranu HS dieta zvýšila HW/BW poměr u TGR samic všech věkových skupin a LS dieta tento poměr naopak snížila u 38, 52 a 90-ti denních transgenních samic v porovnání se stejně starými TGR samicemi na NS dietě.

Graf č. 16: Plazmatické konc. ANG II u bdělých HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

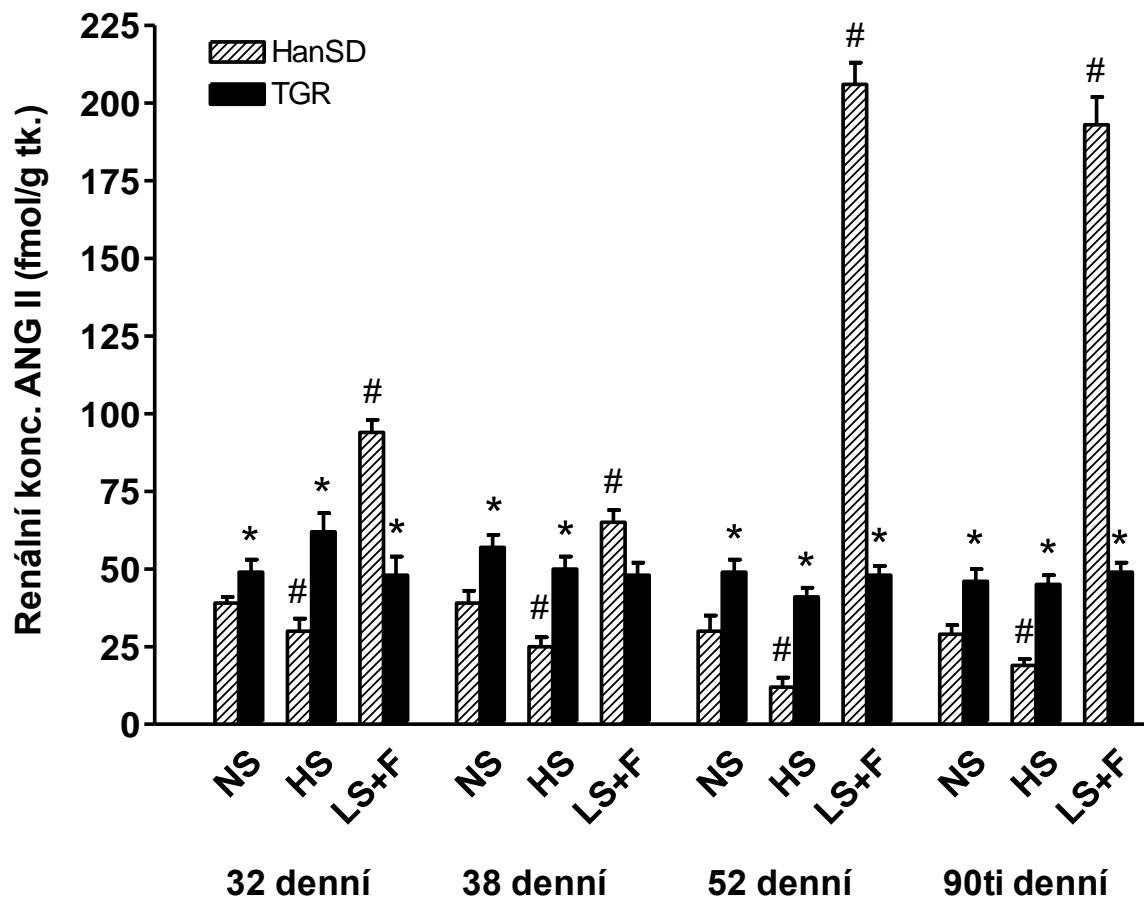
HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)27

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 17: Renální koncentrace ANG II u bdělých HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

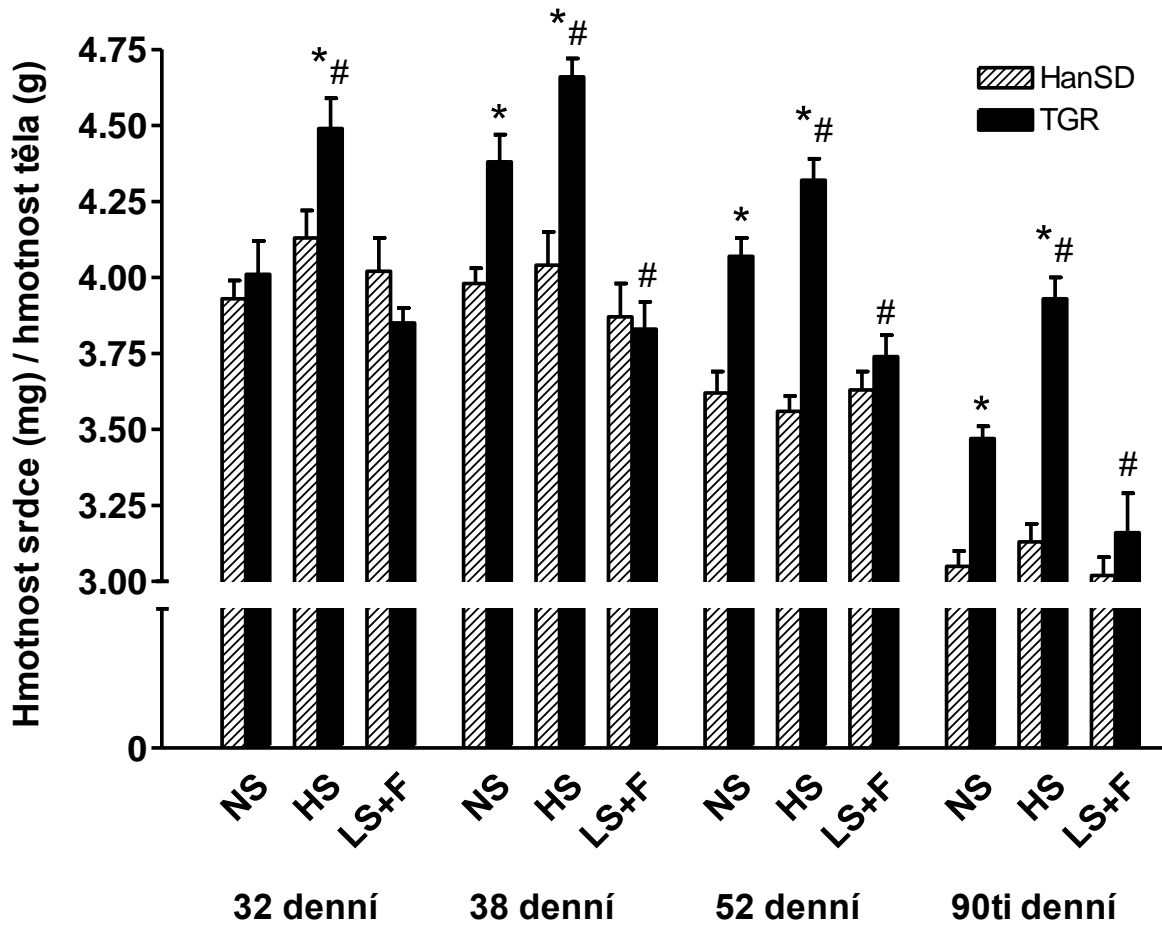
HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)²⁷

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

Graf č. 18: Poměr váhy srdce ku tělesné hmotnosti u HanSD a TGR samic



NS = dieta s normálním obsahem soli

HS = dieta s vysokým obsahem soli

LS = dieta s nízkým obsahem soli + furosemid

HanSD = normotenzní potkani kmene Hannover-Sprague Dawley

TGR = transgenní hypertenzní potkani kmene TGR(mRen2)²⁷

* $p < 0,05$... značí statisticky významný rozdíl TGR vs. HanSD na téže dietě

$p < 0,05$... hodnota dané skupiny vs. hodnota stejné věkové skupiny na NS dietě

D. Diskuse

Předchozí studie na genetických a experimentálních modelech hypertenze popisují značné rozdíly v závislosti na pohlaví, co se týče rozvoje a průběhu hypertenze [Reckellhoff 2001, Maris et al. 2005, Xue et al. 2005, Crofton et al. 1993, Maric 2005, Ganten et al. 1989, Haywood and Hinojosa-Laborde 1997, Ouchi et al. 1987]. Zcela nedávno bylo zjištěno, že existují značné pohlavní rozdíly v rozvoji ANG II-indukované hypertenze a že odstranění vaječnicků, hlavního zdroje estrogenů u samic, zhorší průběh ANG II-dependentní hypertenze [Xue et al. 2005, Tatchum-Talom et al. 2005]. Dále bylo zaznamenáno, že ovarektomie zvyšuje expresi AT₁ receptorů a snižuje expresi AT₂ receptorů v cévním řečišti a v různých tkáních včetně ledvin a mozku [Harrison-Bernard et al. 2003, Baiardi et al. 2005, Silva-Antonialli et al. 2004]. Naopak se zjistilo, že dodání estradiolu snižuje expresi AT₁ receptorů a zvyšuje expresi AT₂ receptorů [Baiardi et al. 2005, Silva-Antonialli et al. 2004, Kisley et al. 1999, Nickenig et al. 1998]. Kromě toho bylo prokázáno, že ovarektomie snižuje prahovou úroveň pro hypertenzogenní účinek HS diety u sůl-senzitivních modelů hypertenze [Harrison-Bernard 2003, Hinojosa-Laborde et al. 2000, Hinojosa-Laborde 2004] a má za následek rozvoj sůl-senzitivní hypertenze u spontánně hypertenzní potkanů (SHR) [Fang et al. 2001]. Všechny tyto studie ukazují, že existují značné pohlavní rozdíly v expresi a/nebo v aktivitě jednotlivých komponent RAS, které by mohly být jedním ze základních mechanismů odpovědných za pohlavní rozdíly v kontrole TK u hypertenzních potkanů.

U TGR také existuje značný sexuální dimorfismus s ohledem na stupeň hypertenze, poněvadž samci mají vyšší TK než samice a do tohoto sexuálního dimorfismu jsou zahrnuty poměrně vyšší koncentrace ANG II u samců [Lee et al. 1996, Langheinrich et al. 1996]. Proto jsme si v této naší studii dali za cíl zaprvé – stanovit plazmatické a renální koncentrace ANG II během čtyř po sobě jdoucích fází vývoje hypertenze u anestezovaných a bdělých TGR a HanSD samic a zadruhé – ověřit závislost TK na sodíkové rovnováze. Zjistili jsme, zaprvé, že plazmatické koncentrace ANG II u 32, 52 a 90-ti denních anestezovaných transgenních samic byly nižší než u stejně starých HanSD samic. Renální koncentrace ANG II u anestezovaných TGR a HanSD samic všech věkových skupin se významně nelišily. Kromě toho jsme zjistili, že koncentrace ANG II v plazmě a v ledvinné tkáni odebrané bezprostředně po dekapitaci jsou signifikantně vyšší u TGR samic všech experimentálních skupin

v porovnání se stejně starými HanSD samicemi. Výsledky této studie potvrdily naše nedávná zjištění týkající se TGR samců, že zaprvé – thiopentalová anestézie a chirurgická příprava pro přímé měření TK zvyšují plazmatické a renální koncentrace ANG II u HanSD potkanů do větší míry než u TGR. Zadruhé, že plazmatické a renální koncentrace ANG II u bdělých hypertenzních heterozygotních TGR jsou signifikantně vyšší než u normotenzních HanSD. Tyto závěry jsou ve shodě s představou, že nepřiměřeně vysoké hladiny ANG II v plazmě a v ledvinách u TGR potkanů přímo přispívají ke zvýšené renální a periferní vaskulární rezistenci [Mitchell et al. 1997] a navíc zvýšené intrarenální koncentrace ANG II ohrožují tlakově-natriuretický mechanismus v ledvinách TGR, což pak vede k rozvoji a přetrvávání hypertenze u tohoto modelu [Kopkan et al. 2004, Mitchell et al. 1997, Kopkan et al. 2005, Navar 2004a]. Nicméně tato naše studie předkládá několik nových zajímavých zjištění, která rozšiřují naše znalosti týkající se rozvoje hypertenze u TGR. Zjistili jsme, že 38 denní heterozygotní TGR samice jsou již jasně hypertenzní a mají rozvinutou srdeční hypertrofií, zatímco v naší nedávné studii [Kopkan et al. 2005] jsme zjistili, že TK bdělých a anestezovaných heterozygotních TGR samců se drží v normotenzních hladinách až do 39. dne věku a začíná stoupat teprve od 40. dne věku potkana. Tudíž u heterozygotních transgenních samic se hypertenze rozvíjí dříve a prudčeji než u TGR samců. Tento postřeh je zajímavý, protože u většiny genetických modelů hypertenze, jako jsou SHR a Dahlovi sůl-senzitivní potkani, bylo zaznamenáno, že samci mají vyšší TK než stejně staré samice [Blizard et al. 1991, Calhoun et al. 1994, Bayorth et al. 2001, Grofton et al. 1989]. Kromě toho v dřívějších studiích bylo zjištěno, že TGR vykazují značný sexuální dimorfismus s ohledem na TK, protože TGR samice mají nižší TK než transgenní samci a jejich fáze ustálené hypertenze je následována spontánním poklesem TK [Lee et al. 1996, Opočenský et al. 2004, Langheinrich et al. 1996]. Námi získaná data neposkytují dostatečné vysvětlení pro toto protichůdné zjištění. Avšak lze uvažovat o jedné možnosti, co se týče rozvoje hypertenze u heterozygotních TGR. Mezi jednotlivci byla totiž prokázána značná variabilita v TK [Kreuz et al. 1998] a rozdíly v genetickém pozadí měnící kardiovaskulární fenotyp u tohoto modelu [Kantachuvesiri et al. 1999]. Proto by se dalo předpokládat, že tyto faktory jsou zodpovědné za zjištěné protichůdné výsledky. Nicméně k objasnění této otázky jsou zapotřebí další studie.

V druhé části této naší studie jsme zjistili, že dieta s vysokým obsahem soli významně zvyšuje a dieta s nízkým obsahem soli signifikantně snižuje krevní tlak u heterozygotních TGR samic, avšak ani jedna z diet významně neovlivňuje plazmatické a renální koncentrace ANG II. Tyto výsledky ukazují, že heterozygotní transgenní samice vykazují důležitou sůl-senzitivní složku, která je spojována se ztrátou přiměřené regulace plazmatických a renálních koncentrací ANG II jako odpověď na změny v sodíkové rovnováze. Naše zjištění jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují, že TGR samci vykazují také sůl-senzitivní složku hypertenze spojenou s dysregulací plazmatických a renálních koncentrací ANG II při reakci na změny v sodíkové rovnováze [Callahan et al. 1996, Opočenský et al. 2004, Vaneckova et al. 2004, Vaneckova et al. 2005, Burgelova et al. 2005, výše uvedená práce na TGR samcích]. Mimoto jsou naše závěry také ve shodě s výsledky studií na SHR a Dahlových sůl-senzitivních potkaních, které udávají, že se u těchto genetických modelů hypertenze také projevuje zvýšená citlivost TK vůči zvýšenému množství přijímané soli a to poruchou ve fyziologickém potlačení aktivity RAS v cirkulaci a v ledvinách [Hinojosa-Laborde et al. 2004, Hodge et al. 2002, Calhoun et al. 1995, Meng et al. 1995, Bayorth et al. 2005]. Konečně výsledky naší studie ukazují, že heterozygotní TGR samice jsou během prehypertenzní a pozdní fáze hypertenze citlivější ke zvýšenému množství přijímané soli než heterozygotní TGR samci. Zjistili jsme, že dieta s vysokým obsahem soli vyvolá u 32 a 90-ti denních transgenních samic signifikantně větší zvýšení v TK než u stejně starých transgenních samců [výše uvedená studie na TGR samcích], tj. o 20 ± 2 vs. 10 ± 2 a o 37 ± 3 vs. 28 ± 3 mmHg ($p < 0,05$).

E. Souhrn výsledků

1. Thiopentalová **anestézie zvyšuje** plazmatické a renální koncentrace ANG II do větší míry u HanSD samic než u TGR samic, **a tím zakrývá významné pohlavní rozdíly v aktivitě RAS u tohoto modelu hypertenze.**
2. Data získaná u TGR samic jsou podobná hodnotám naměřeným u TGR samců; **plazmatické a renální koncentrace ANG II u bdělých heterozygotních TGR samic jsou signifikantně vyšší v porovnání se stejně starými HanSD samicemi.**
3. TGR samice reagují na dietu s vysokým obsahem soli zvýšením TK a na dietu s nízkým obsahem soli snížením TK. Tyto změny v sodíkové rovnováze nejsou doprovázeny přiměřenou regulací plazmatických a renálních koncentrací ANG II.
4. **Heterozygotní TGR samice rozvíjejí hypertenzi dříve a prudčeji než TGR samci.** Během prehypertenzní a pozdní fáze hypertenze je sůl-senzitivní složka hypertenze zřetelnější u TGR samic v porovnání s TGR samci.

Zvýšené plazmatické a renální koncentrace ANG II během všech fází hypertenze pravděpodobně hrají hlavní roli v rozvoji a přetrvávání hypertenze u tohoto modelu.

7. Závěrečné shrnutí výsledků

Výsledky výše uvedených studií lze shrnout do několika bodů:

1. **Pentobarbitalová anestézie a stres vyvolaný chirurgickou přípravou zvířete zvyšují plazmatické a renální koncentrace ANG II u HanSD potkanů ve větší míře než u ANG II-dependetních modelů experimentální hypertenze.**
2. **TGR potkani mají vyšší koncentrace ANG II v porovnání s HanSD potkany všech věkových stádií.**
3. **TGR potkani mají poruchu RAS v reakci na přijímané množství soli.**
4. Navzdory popisovaným rozdílům v rozvoji a v průběhu hypertenze u samců a samic nebyl mezi hodnotami naměřenými u transgenních samců a samic pozorován významný rozdíl, tudíž **RAS není zodpovědný za sexuální dimorfismus.**

Celkový závěr:

Aktivace renin-angiotenzinového systému u TGR potkanů není následována přiměřenou reakcí regulačních mechanismů, což vede k rozvoji a přetrvávání hypertenze u tohoto modelu experimentální hypertenze.

Literatura

1. ALBISTON A.L., McDOWALL S.G., MATSACOS D., SIM P., CLUNE E., MUSTAFA T., LEE J., MENDELSON F.A., SIMPSON R.J., CONNOLLY L.M. and CHAI S.Y. (2001). **Evidence that the angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase.** J Biol Chem 276: 48623-48626.
2. BAIARDI G., MACOVA M., ARMANDO I., ANDO H., TYURMIN D. and SAAVEDRA J.M. (2005). **Estrogen upregulates renal angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors in the rat.** Regul Pept 124: 7-17.
3. BAYORH M.A., SOCCI P.R., EATMAN D., WANG M. and THIERRY-PALMER M. (2001). **The role of gender in salt-induced hypertension.** Clin Exp Hypertens 23: 241-255.
4. BAYORH M.A., GANAFA A.A., EMMETT N., SOCCI R.R., EATMAN D. and FRIDIE I.L. (2005). **Alterations in aldosterone and angiotensin II levels in salt-induced hypertension.** Clin Exp Hypertens 27: 355-367.
5. BLIZARD D.A., PETERSON W.N., ISKANDAR S.S., SHIHABI Z.K. and ADAMS N. (1991). **The effect of a high NaCl diet and gender on blood pressure, urinary protein excretion and renal pathology in SHR rats.** Clin Exp Hypertens 13: 687-697.
6. BOHLENDER J., MENARD J., EDLING O., GANTEN D. and LUFT F.C. (1998). **Mouse and rat plasma renin concentration and gene expression in (mRen2)27 transgenic rats.** Am J Physiol 274: H1450-H1456.
7. BOHM M., LEE M., KREUTZ R., KIM S., SCHINKE M., DJAVIDANI B., WAGNER J., KALING M., WIENEN W., BADER M. et al. (1995). **Angiotensin II receptor blockade in TGR(mRen2)27: effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions.** J Hypertens 13: 891-899.
8. BRUNA R.D., BERNHARD I., GESS B., SCHRICKER K. and KURTZ A. (1995). **Renin gene and angiotensin II AT₁ receptor gene expression in the kidneys of normal and of two-kidney, one clip rats.** Pflügers Arch – Eur J Physiol 430: 265-272.
9. BRUNNER H.R., KIRSHMAN J.D. SEALEY J.E. and LARAGH J.H.. (1971). **Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms.** Science 174(16): 1344-1346.

10. BURGELOVA M., KRAMER H.J., TEPLAN V., THUMOVA M. and CERVENKA L. (2005). **Effects of angiotensin-(1-7) blockade on renal function in rats with enhanced intrarenal ANG II activity.** *Kidney Int* 67: 1453-1461.
11. BURNS K.D. and Li N. (2003). **The role of angiotensin II-stimulated renal tubular transport in hypertension.** *Curr Hypertens Rep* 5: 165-171.
12. BURRELL L.M., JOHNSTON C.I., TIKELLIS C. and COOPER M.E. (2004). **ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system.** *Trends Endocrinol Metab* 15: 166-169.
13. CALHOUN D.A., ZHU S., WYSS J.M. and OPARIL S. (1994). **Diurnal blood pressure variation and dietary salt in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 24: 1-8.
14. CALHOUN D.A., ZHU S.T., CHEN Y.F. and OPARIL S. (1995). **Gender and dietary NaCl in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats.** *Hypertension* 26: 285-289.
15. CALLAHAN M.F., LI P., FERRARIO C.M., GANTEN D. and MORRIS M. (1996). **Salt-sensitive hypertension in (mRen-2)²⁷ transgenic rats.** *Hypertension* 27: 573-577.
16. CAMPBELL D.J., BOUHNİK J., COEZY E., MENARD J. and CORVOL P. (1985). **Processing of rat and human angiotensinogen precursors by microsomal membranes.** *Mol Cell Endocrinol* 43: 31-40.
17. CAMPBELL D.J. (1987). **Circulating and tissue angiotensin systems.** *J Clin Invest* 79: 1-6.
18. CAMPBELL D.J., RONG P., KLADIS A., REES B., GANTEN D. and SKINNER S.L. (1995). **Angiotensin and bradykinin peptides in the TGR(mRen-2)²⁷ rat.** *Hypertension* 25: 1014-1020.
19. CAMPBELL D.J. **Bioactive angiotensin peptides other than angiotensin II,** in: EPSTEIN M. and BRUNNER H.R. (Eds.) (2001). **Angiotensin II Receptor Antagonists.** Hanley and Belfus Inc., Philadelphia, pp. 9-27.
20. CAMPBELL D.J. (2003). **The renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems.** *Int J Biochem Cell Biol* 35: 784-791.
21. CAREY R.M. and SIRAGY H.M. (2003a). **Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation.** *Endocr Rev* 24 (3): 261-271.

22. CAREY R.M. and SIRAGY H.M. (2003b). **The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy.** Trends Endocrinol Metab 14(6): 274-281.
23. CERQUA S. and SAMAAAN A. (1939). **Cure of experimental renal hypertension.** Clin Sci 40: 113-118.
24. CERVENKA L., WANG C.T. and NAVAR L.G. (1998). **Effects of acute AT₁ receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal function in rats.** Am J Physiol 274: F940-F945.
25. CERVENKA L., MITCHELL K.D., OLIVERIO M.I., COFFMAN T.M. and NAVAR L.G. (1999a). **Renal function in the AT_{1A} receptor knockout mouse during normal and volume-expanded conditions.** Kidney Int 56: 1855-1862.
26. CERVENKA L. and NAVAR L.G. (1999b). **Renal responses of the nonclipped kidney of two-kidney/one-clip Goldblatt hypertensive rats to type 1 angiotensin II receptor blockade with candesartan.** J Am Soc Nephrol 10 [Suppl 11]: S197-S201.
27. CERVENKA L., WANG C.T., MITCHELL K.D. and NAVAR L.G. (1999c). **Proximal tubular angiotensin II levels and renal functional responses to AT₁ receptor blockade in nonclipped kidneys of Goldblatt hypertensive rats.** Hypertension 33: 102-107.
28. CERVENKA L., HORACEK V., VANECKOVA I., HUBACEK J.A., OLIVERIO M.I., COFFMAN T.M. and Navar L.G. (2002). **Essential role of AT_{1A} receptor in the development of 2K1C hypertension.** Hypertension 40: 735-741.
29. CORMAN B., BARRAULT M.B., KLINGER C., HOUOT A.M., MICHEL J.B., DELLA BRUNA R., PINET F. and SOUBRIER F. (1995). **Renin gene expression in the aging kidney: effect of sodium restriction.** Mech Ageing Dev 84: 1-13.
30. CRACKOWER M.A., SARAO R., OUDIT G.Y., YAGIL C., KOZIERADZKI I., SCANGA S.E., OLIVEIRA-dos-SANTOS A.J., da COSTA J., ZHANG L., PEI Y., SCHOLEY J., FERRARIO C.M., MANOUKIAN A.S., CHAPPELL M.C., BACKX P.H., YAGIL Y and PENNINGER J.M. (2002). **Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.** Nature 417: 822-828.
31. CROFTON J.T., SHARE L. and BROOKS D.P. (1989). **Gonadectomy abolishes the sexual dimorphism in DOC-salt hypertension in the rat.** Clin Exp Hypertens 11: 1249-1261.

32. CROFTON J.T., OTA M. and SHARE L. (1993). **Role of vasopressin, the renin-angiotensin system and sex in Dahl salt-sensitive hypertension.** *J Hypertens* 11: 1031-1038.
33. DANSER A.H., van KATS J.P., ADMIRAAL P.J., DERKX F.H., LAMERS J.M., VERDOUW P.D., SAXENA P.R. and SCHALEKAMP M.A. (1994). **Cardiac renin and angiotensins: uptake from plasma versus in situ synthesis.** *Hypertension* 24: 37-48.
34. DANSER A.H., van KESTEREN C.A., BAX W.A., TAVENIER M., DERKX F.H., SAXENA P.R. and SCHALEKAMP M.A. (1997). **Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding.** *Circulation* 96: 220-226.
35. DeCLUE J.W., GUYTON A.C., COWLEY A.W Jr., COLEMAN T.G., NORMAN R.A. and McCAA R.E. (1978). **Subpressor angiotensin infusion, renal sodium handling, and salt-induced hypertension in the dog.** *Circ Res* 43: 503-512.
36. DEDDISH P.A., MARCIC B., JACKMAN H.L., WANG H.Z., SKIDGEL R.A. and ERDOS E.G. (1998). **N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE.** *Hypertension* 31: 912-917.
37. DINH D.T., FRAUMAN A.G., JOHNSTON C.I. and FABIANI M.E. (2001). **Angiotensin receptors: distribution, signalling and function.** *Clin Sci* 100: 481-492.
38. DONOGHUE M., HSIEH F., BARONAS E., GODBOUT K., GOSSELIN M., STAGLIANO N., DONOVAN M., WOLF B., ROBINSON K., JEYASEELAN R., BREITBART R.E. and ACTON S. (2000). **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE 2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.** *Circ Res* 87: E1-9.
39. DONOGHUE M., WAKIMOTO H., MAGUIRE C.T., ACTON S., HALES P., STAGLIANO N., FAIRCHILD-HUNTRESS V., XU J., LORENZ J.N., KADAMBI V., BERUL C.I. and BREITBART R.E. (2003). **Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins.** *J Mol Cell Cardiol* 35: 1043-1053.
40. DOSTAL D.E. and BAKER K.M. (1999). **The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function?** *Circ Res* 85: 643-650.

41. DOSTAL D.E. (2000). **The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function.** Regul Pept 91: 1-11.
42. DVORAK P., KRAMER H.J., BACKER A., MALY J., KOPKAN L., VANECKOVA I, VERNEROVA Z., OPOCENSKY M., TESAR V., BADER M., GANTEN D., JANDA J. and CERVENKA L. (2004). **Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive Ren-2 transgenic rats.** Kidney Blood Press Res 27: 248-258.
43. DZAU V.J. (1984). **Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hypothesis.** Am J Med 77: 31-36.
44. DZAU V.J. and RE R.N. (1987). **Evidence for the existence of renin in the heart.** Circulation 75: I134-I136.
45. EL-DAHR S.S., DIPP S., GUAN S. and NAVAR L.G. (1993). **Renin, angiotensinogen and kallikrein gene expression in two-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats.** Am J Hypertens 6: 914-919.
46. ENGELI S., NEGREL R. and SHARMA A.M. (2000). **Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system.** Hypertension 35: 1270-1277.
47. ENGLER S., PAUL M. and PINTO Y.M. (1998). **The TGR(mRen2)²⁷ transgenic rat model of hypertension.** Regul Pept 77: 3-8.
48. FANG Z., CARLSON S.H., CHEN Y.F., OPARIL S. and WYSS J.M. (2001). **Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats.** Am J Physiol 281: R1934-R1939.
49. FERRARIO C.M., AVERILL D.B., BROSNIHAN K.B., CHAPPELL M.C., ISKANDAR S.S., DEAN R.H. and DIZ D.I. (2002). **Vasopeptidase inhibition and Ang-(1-7) in the spontaneously hypertensive rat.** Kidney Int 62: 1349-1357.
50. FERRARIO C.M. and CHAPPELL M.C. (2004). **Novel angiotensin peptides.** Cell Mol Life Sci 61: 2720-2727.
51. FERRARIO C.M., TRASK A.J. and JESSUP J.A. (2005). **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 289: H2281-H2290.
52. FERRARIO C.M. (2006). **Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation.** Hypertension 47: 515-521.

53. FOX J., GUAN S., HYMEL A.A and NAVAR L.G. (1992). **Dietary Na and ACE inhibition effects on renal tissue angiotensin I and II and ACE activity in rats.** Am J Physiol 262: F902-F909.
54. FRANCO M., TAPIA E., SANTAMARIA J., ZAFRA I., GARCIA-TORRES R., GORDON K.L., PONS H., RODRIGUEZ-ITURBE B., JOHNSON R.J. and HERRERA-ACOSTA J. (2001). **Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt-sensitive hypertension after angiotensin II exposure.** J Am Soc Nephrol 12: 2263-2271.
55. FUKAMIZU A., TAKAHASHI S., SEO M.S., TADA M., TANIMOTO K., UEHARA S. and MURAKAMI K. (1990). **Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter.** J Biol Chem 265: 7576-7582.
56. GAILLARD I., CLAUSER E. and CORVOL P. (1989). **Structure of human angiotensinogen gene.** DNA 8: 87-99.
57. GANONG W.F. (1995). *Přehled lékařské fyziologie.* Vydalo nakladatelství a vydavatelství H&H, Jinočany.
58. GANTEN U., SCHRODER G., WITT M., ZIMMERMAN F., GANTEN D. and STOCK G. (1989). **Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment.** J Hypertens 7: 721-726.
59. GARVIN J.L. (1991). **Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat proximal straight tubules.** J Am Soc Nephrol 1: 1146-1152.
60. GROSS V., ROMAN J. and COWLEY A.W. (1994). **Abnormal pressure-natriuresis in transgenic renin gene rats.** J Hypertens 12: 1029-1034.
61. GROSS V., LIPPOLDT A., SCHNEIDER W. and LUFT F.C. (1995). **Effect of captopril and angiotensin II receptor blockade on pressure natriuresis in transgenic TGR(mRen2)27 rats.** Hypertension 26: 471-479.
62. GUAN S., FOX J., MITCHELL K.D. and NAVAR L.G. (1992). **Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one-clip hypertensive rats.** Hypertension 20: 763-767.
63. HALL J.E., GUYTON A.C., SMITH M.J. Jr. and COLEMAN T.G. (1980). **Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin.** Am J Physiol 239: F271-F280.
64. HALL J.E. (1986). **Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation.** Am J Physiol 250: R960-R972.

65. HALL J.E., BRANDS M.W. and HENEGAR J.R. (1999). **Angiotensin II and long-term arterial pressure regulation: the overriding dominance of the kidney.** *J Am Soc Nephrol* 10 [Suppl 12]: S258-S265.
66. HALL J.E. and BRANDS M.W. (2000) **The renin-angiotensin-aldosterone system: renal mechanisms and circulatory homeostasis.** In: SELDIN D.W. and GIEBISCH G. (eds) (2000). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1009-1046.
67. HARRISON-BERNARD L.M., NAVAR L.G., HO M.M., VINSON G.P. and EL-DAHR S.S. (1997). **Immunohistochemical localization of ANG II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody.** *Am J Physiol* 273: F170-F177.
68. HARRISON-BERNARD L.M., SCHULMAN I.H. and RAIJ L. (2003). **Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT₁ receptor and salt sensitivity.** *Hypertension* 42: 1157-1163.
69. HAYWOOD J.R. and HINOJOSA-LABORDE C. (1997). **Sexual dimorphism of sodium-sensitive renal-wrap hypertension.** *Hypertension* 30: 667-671.
70. HILGERS K.F., PETERS J., VEELKEN R., SOMMER M., RUPPRECHT G., GANTEN D., LUFT F.C. and MANN J.F. (1992). **Increased vascular angiotensin formation in female rats harboring the mouse Ren-2 gene.** *Hypertension* 19: 687-691.
71. HILGERS K.F., VEELKEN R., MULLER D.N., KOHLER H., HARTNER A., BOTKIN S.R., STUMPF C., SCHMIEDER R.E. and GOMEZ R.A. (2001). **Renin uptake by the endothelium mediates vascular angiotensin formation.** *Hypertension* 38: 243-248.
72. HINOJOSA-LABORDE C., LANGE D.L. and HAYWOOD J.R. (2000). **Role of female sex hormones in the development and reversal of Dahl hypertension.** *Hypertension* 35: 484-489.
73. HINOJOSA-LABORDE C., CRAIG T., ZHENG W., JI H., HAYWOOD J.R. and SANDBERG K. (2004). **Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats.** *Hypertension* 44: 405-409.
74. HODGE G., YE V.Z. and DUGGAN K.A. (2002). **Dysregulation of angiotensin II synthesis is associated with salt sensitivity in the spontaneous hypertensive rat.** *Acta Physiol Scand* 174: 209-215.

75. HODGE R.L., LOWE R.D. and VANE J.R. (1966). **The effects of alteration of blood-volume on the concentration of circulating angiotensin in anesthetized dogs.** *J Physiol* 185: 613-626.
76. HOWARD L.L., PATTERSON M.E., MULLINS J.J. and MITCHELL K.D. (2005). **Salt-sensitive hypertension develops after transient induction of ANG II-dependent hypertension in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats.** *Am J Physiol* 288: F810-F815.
77. HUANG W.-C., PLOTH D.W. and NAVAR L.G. (1982). **Effects of saralasin infusion on bilateral renal function in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats.** *Clin Sci* 62: 573-579.
78. HUANG W.-C. and NAVAR L.G. (1983). **Effects of unclipping and converting enzyme inhibition on bilateral renal function in Goldblatt hypertensive rats.** *Kidney Int* 23: 816-822.
79. HUENTELMAN M.J., GROBE J.L., VAZQUEZ J., STEWART J.M., MECCA A.P., KATOVICH M.J., FERRARIO C.M. and RAIZADA M.K. (2005). **Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats.** *Exp Physiol* 90(5): 783-790.
80. CHAPMAN B.J., BROOKS D.P. and MUNDAY K.A. (1980). **Half-life of angiotensin II in the conscious and barbiturate-anaesthetized rat.** *Br J Anaesth* 52: 389-393.
81. CHAPPELL M.C., DIZ D.I., YUNIS C. and FERRARIO C.M. (1998). **Differential actions of angiotensin (1-7) in the kidney.** *Kidney Int Suppl* 68: S3-S6.
82. CHOLEWA B.C., MEISTER C.J. and MATTSON D.L. (2005). **Importance of the renin-angiotensin system in the regulation of arterial blood pressure in conscious mice and rats.** *Acta Physiol Scand* 183: 309-320.
83. IMIG J.D., NAVAR G.L., ZOU L.X., O'REILLY K.C., ALLEN P.L., KAYSEN J.H., HAMMOND T.G. and NAVAR L.G. (1999). **Renal endosomes contain angiotensin peptides, converting enzyme, and AT_{1A} receptors.** *Am J Physiol-Renal Physiol* 277: F303-F311.
84. INGERT C., GRIMA M., COQUARD C., BARTHELMEBS M. and IMBS J.L. (2002a). **Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats.** *Am J Physiol* 283: F995-F1002.

85. INGERT C., GRIMA M., COQUARD C., BARTHELMEBS M. and IMBS J.L. (2002b). **Contribution of angiotensin II internalization to intrarenal angiotensin II levels in rats.** *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1003-F1010.
86. JOHNSON M.D. and MALVIN R.L. (1975). **Plasma renin activity during pentobarbital anesthesia and graded hemorrhage in dogs.** *Am J Physiol* 229: 1098-1101.
87. JOHNSTON C.I. (1992). **Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control.** *J Hypertens Suppl* 10: S13-S26.
88. KANTACHUVESIRI S., HALEY C.S., FLEMING S., KURIN K., WHITWORTH C.E., WENHAM P., KOTELEVTSSEV Y. and MULLINS J.J. (1999). **Genetic mapping of modifier loci affecting malignant hypertension in TGRmRen2 rats.** *Kidney Int* 56: 414-420.
89. KANTACHUVESIRI S., FLEMING S., PETERS J., PETERS B., BROOKER G., LAMMIE A.G., McGRATH I., KOTELEVTSSEV Y. and MULLINS J.J. (2001). **Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease.** *J Biol Chem* 276: 36727-36733.
90. KASPER S.O., CARTER C.S., FERRARIO C.M., GANTEN D., FERDER L.F., SONNTAG W.E., GALLAGHER P.E. and DIZ D.I. (2005). **Growth, metabolism, and blood pressure disturbances during aging in transgenic rats with altered brain renin-angiotensin systems.** *Physiol Genomics* 23: 311-317.
91. KIFOR I. and DZAU V.J. (1987). **Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins.** *Circ Res* 60: 422-428.
92. KISLEY L.R., SAKAI R.R. and FLUHARTY S.J. (1999). **Estrogen decreases hypothalamic angiotensin II AT₁ receptor binding and mRNA in the female rat.** *Brain Res* 844: 34-42.
93. KOBORI H., HARRISON-BERNARD L.M. and NAVAR L.G. (2001). **Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension.** *Hypertension* 37: 1329-1335.
94. KOLETSKY S., PAVLICKO K.M. and RIVERA VELEZ J.M. (1971). **Renin angiotensin activity in hypertensive rats with a single ischemic kidney.** *Lab Invest* 24(1): 41-44.
95. KOPKAN L., KRAMER H.J., HUSKOVA Z., VANOURKOVA Z., BACKER A., BADER M., GANTEN D. and CERVENKA L. (2004). **Plasma and kidney**

- angiotensin II levels and functional responses to AT(1) receptor blockade in hypertensive Ren-2 transgenic rats.** *J Hypertens* 22: 819-825.
96. KOPKAN L., KRAMER H.J., HUSKOVA Z., VANOURKOVA Z., SKAROUPKOVA P., THUMOVA M., and CERVENKA L. (2005). **The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats.** *J Hypertens* 23: 1531-1539.
97. KOSTENIS E., MILLIGAN G., CHRISTOPOULOS A, SANCHEZ-FERRER C.F., HERINGER-WALTHER S., SEXTON P.M., GEMBARDT F., KELLETT E., MARTINI L., VANDERHEYDEN P., SCHULTHEISS H.P. and WALTHER T. (2005). **G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor.** *Circulation* 111(14): 1806-1813.
98. KREUTZ R., FERNANDEZ-ALFONSO M.S., PAUL M. and PETERS J. (1998). **Differential development of early hypertension in heterozygous transgenic TGR(mRen2)27 rats.** *Clin Exp Hypertens* 20: 273-282.
99. KUCHAROWICZ I., PAWLAK R., MATYS T., CHABIELSKA E. and BUCZKO W. (2002). **Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system.** *J Physiol Pharmacol* 53: 533-540.
100. LANGHEINRICH M., LEE M.A., BOHM M., PINTO Y.M., GANTEN D. and PAUL M. (1996). **The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR(mRen2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects.** *Am J Hypertens* 9: 506-512.
101. LEE M.A., BOHM M., KIM S., BACHMANN S., BACHMANN J., BADER M. and GANTEN D. (1995). **Differential gene expression of renin and angiotensinogen in the TGR(mRen-2)27 transgenic rat.** *Hypertension* 25: 570-580.
102. LEE M.A., BOHM M., PAUL M., BADER M., GANTEN U. and GANTEN D. (1996). **Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mRen2)27.** *Am J Physiol* 270: E919-E929.
103. LEENEN F.H., de JONG W. and de WIED D. (1973). **Renal venous and peripheral plasma renin activity in renal hypertension in the rat.** *Am J Physiol* 225: 1573-1518.
104. LOMBARDI D., GORDON K.L., POLINSKY P., SUGA S., SCHWARTZ S.M. and JOHNSON R.J. (1999). **Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to angiotensin II.** *Hypertension* 33: 1013-1019.

105. MAGALDI A.J., CESAR K.R., de ARAUJO M., SIMOES e SILVA A.C. and SANTOS R.A. (2003). **Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors.** *Pflugers Arch* 447: 223-230.
106. MARCEAU F. and BACHVAROV D.R. (1998). **Kinin receptors.** *Clin Rev Allergy Immunol* 16: 385-401.
107. MARIC C. (2005). **Sex differences in cardiovascular disease and hypertension. Involvement of the renin-angiotensin system.** *Hypertension* 46: 475-476.
108. MARIS M.E., MELCHERT R.B., JOSEPH J. and KENNEDY R.H. (2005). **Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 35-39.
109. MENG Q.C., DURANT J., CHEN Y.F. and OPARIL S. (1995). **Effects of dietary salt on angiotensin peptides in kidney.** *Hypertension* 6: 1209-1215.
110. MITCHELL K.D. and NAVAR L.G. (1989). **The renin-angiotensin-aldosterone system in volume control.** In: BAYLIS P.H. (ed). *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism: water and salt homeostasis in health and disease.* Bailliere Tindall, London, Vol. 3, No. 2, pp 393-430.
111. MITCHELL K.D. and MULLINS J.J. (1995). **ANG II dependence of tubuloglomerular feedback responsiveness in hypertensive ren-2 transgenic rats.** *Am J Physiol* 268: F821-F828.
112. MITCHELL K.D., JACINTO S.M. and MULLINS J.J. (1997). **Proximal tubular fluid, kidney, and plasma levels of angiotensin II in hypertensive ren-2 transgenic rats.** *Am J Physiol* 273: F246-F253.
113. MITCHELL K.D. and MULLINS J.J. (2005). **Enhanced tubuloglomerular feedback in Cyp1a1-Ren2 transgenic rats with inducible ANG II-dependent malignant hypertension.** *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1210-F1216.
114. MIYATA N., PARK F., LI X.F. and COWLEY A.W. Jr. (1999). **Distribution of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat kidney.** *Am J Physiol* 277: F437-F446.
115. MORGAN L., BROUGHTON P. and KALSHEKER N. (1996). **Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology.** *Int J Biochem Cell Biol* 28 (11): 1211-1222.

116. MORTON J.J. and WALLACE E.C. (1983). **The importance of the renin-angiotensin system in the development and maintenance of hypertension in the two-kidney one-clip hypertensive rat.** Clin Sci 64: 359-370.
117. MULLINS J.J., PETERS J. and GANTEN D. (1990). **Fulminant hypertension in transgenic rats harboring the mouse Ren-2 gene.** Nature 344: 541-544.
118. NAKAMURA S., AVERILL D.B., CHAPPELL M.C., DIZ D.I., BROSNIHAN K.B. and FERRARIO C.M. (2003). **Angiotensin receptors contribute to blood pressure homeostasis in salt-depleted SHR.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284: R164-R173.
119. NAVAR L.G., LEWIS L., HYMEL A., BRAAM B. and MITCHELL K.D. (1994). **Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats.** J Am Soc Nephrol 5: 1153-1158.
120. NAVAR L.G., INSCHO E.W., MAJID S.A., IMIG J.D., HARRISON-BERNARD L.M. and MITCHELL K.D. (1996). **Paracrine regulation of the renal microcirculation.** Physiol Rev 76: 425-536.
121. NAVAR L.G., IMIG J.D., ZOU L. and WANG C.T. (1997). **Intrarenal production of angiotensin II.** Semin Nephrol 17: 412-422.
122. NAVAR L.G., HARRISON-BERNARD L.M. and IMIG J.D. (1998a). **Compartmentalization of intrarenal angiotensin II.** In: ULFENDAHL H.R. and AURELL M. (eds). *Renin-Angiotensin*. London, Portland Press: 193-208.
123. NAVAR L.G., ZOU L., von THUN A., WANG C.T., IMIG J.D. and MITCHELL K.D. (1998b). **Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension.** News Physiol Sci 13: 170-176.
124. NAVAR L.G., HARRISON-BERNARD L.M., IMIG J.D., WANG C.T., CERVENKA L. and MITCHELL K.D. (1999). **Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT₁ receptor blockade.** J Am Soc Nephrol 10 [Suppl 11]: S266-S272.
125. NAVAR L.G. and HARRISON-BERNARD L.M. (2000). **Intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II dependent hypertension.** Hypertens Res 23: 291-301.
126. NAVAR L.G. and NISHIYAMA A. (2001). **Intrarenal formation of angiotensin II.** In: WOLF G. (ed). *The renin-angiotensin system and progression of renal diseases*. Contrib Nephrol. Basel, Karger: 1-15.

127. NAVAR L.G., HARRISON-BERNARD L.M., NISHIYAMA A. and KOBORI H. (2002). **Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension.** Hypertension 39: 316-322.
128. NAVAR L.G. (2004a). **The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension.** Kidney Int. 65: 1522-1532.
129. NAVAR L.G. and NISHIYAMA A. (2004b). **Why are angiotensin concentrations so high in the kidney?** Curr Opin Nephrol Hypertens 13: 107-115.
130. NERI SERNERI G.G., BODDI M., COPPO M., CHECHI T., ZARONE N., MOIRA M., POGGESI L., MARGHERI M. and SIMONETTI I. (1996). **Evidence for the existence of a functional cardiac renin-angiotensin system in humans.** Circulation 94: 1886-1893.
131. NEVES L.A., WILLIAMS A.F., AVERILL D.B., FERRARIO C.M., WALKUP M.P. and BROSNIHAN K.B. (2003). **Pregnancy enhances the angiotensin (Ang)-(1-7) vasodilator response in mesenteric arteries and increases the renal concentration and urinary excretion of Ang-(1-7).** Endocrinology 114: 3338-3343.
132. NGUYEN G., DELARUE F., BURCKLE C., BOUZHIR L., GILLER T. and SRAER J.D. (2002). **Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin.** J Clin Invest 109: 1417-1427.
133. NGUYEN G., BURCKLE C.A. and SRAER J.D. (2004). **Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance.** Curr Hypertens Rep 6: 129-132.
134. NICKENIG G., BAUMER A.T., GROHE C., KAHLERT S., STREHLOW K., ROSENKRANZ S., STABLEIN A., BECKERS F., SMITS J.F., DAEMEN M.J., VETTER H. and BOHM M. (1998). **Estrogen modulates AT₁ receptor gene expression in vitro and in vivo.** Circulation 97: 2197-2201.
135. NISHIYAMA A., SETH D.M. and NAVAR L.G. (2002). **Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats.** Hypertension 39: 129-134.
136. OMORO S.A., MAJID D.S., EL-DAHR S.S. and NAVAR L.G. (2000). **Roles of Ang II bradykinin in the renal regional blood flow responses to ACE inhibition in sodium-depleted dogs.** Am J Physiol Renal Physiol 279: F289-F293.
137. OPOCENSKY M., DVORAK P., MALY J., KRAMER H.J., BACKER A., KOPKAN L., VERNEROVA Z., TESAR V., ZIMA T., BADER M., GANTEN D.,

- JANDA J. and VANECKOVA I. (2004). **Chronic endothelin receptor blockade reduces end-organ damage independently of blood pressure effects in salt-loaded heterozygous Ren-2 transgenic rats.** *Physiol Res* 53: 581-593.
138. OSBORN J.W., ARIZA-NIETO P., COLLISTER J.P., SOUCHERAY S., ZIMMERMAN B. and KATZ S. (2003). **Responsiveness vs. basal activity of plasma ANG II as a determinant of arterial pressure salt sensitivity.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2142-H2149.
139. OUCHI Y., SHARE L., CROFTON J.T., IITAKE K. and BROOKS D.P. (1987). **Sex differences in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat.** *Hypertension* 9: 172-177.
140. OZONO R., WANG Z.O., MOORE A.F., INAGAMI T., SIRAGY H.M. and CAREY R.M. (1997). **Expression of the subtype-2 angiotensin (AT₂) receptor protein in the rat kidney.** *Hypertension* 30: 1238-1246.
141. PATTERSON M.E., MOUTON C.R., MULLIN J.J. and MITCHELL K.D. (2005). **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* 289: F754-F759.
142. PAUL M., WAGNER J., HOFFMANN S., URATA H. and GANTEN D. (1994). **Transgenic rats: new experimental models for the study of candidate genes in hypertension research.** *Annu Rev Physiol* 56: 811-829.
143. PETERS J., MUNTER K., BADER M., HACKENTHAL E., MULLINS J.J. and GANTEN D. (1993). **Increased adrenal renin in transgenic hypertensive rats, TGR(Ren2)27, and its regulation by cAMP, angiotensin II and calcium.** *J Clin Invest* 91: 742-747.
144. PETERS J., HILGERS K.F., MASER-GLUTH C. and KREUTZ R. (1996). **Role of the circulating renin-angiotensin system in the pathogenesis of hypertension in transgenic rats TGR(mRen2)27.** *Clin Exp Hypertens* 18: 933-948.
145. PETTINGER W.A. and AUGUSTO L. (1971a). **Relevance of the rat as a laboratory model of human renin physiology.** *Clin Res* 19: 544-546.
146. PETTINGER W.A., MARCHELLE M. and AUGUSTO L. (1971b). **Renin suppression by DOC and NaCl in the rat.** *Am J Physiol* 221: 1071-1074.

147. PETTINGER W.A., TANAKA K., KEETON K., CAMPBELL W.B. and BROOKS S.N. (1975). **Renin release, an artifact of anesthesia and its implications in rats.** Proc Soc Exp Biol Med 148: 625-630.
148. PINTO Y.M., PAUL M. and GANTEN D. (1998). **Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering.** Cardiovasc Res 39: 77-88.
149. PLOTH D.W. (1983). **Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one clip renal vascular hypertension.** Am J Physiol 245: F131-F141.
150. QUAN A. and BAUM M. (1996). **Endogenous production of ANG II modulates rat proximal tubule transport.** J Clin Invest 97: 2878-2882.
151. RECKELHOFF J. (2001). **Gender differences in the regulation of blood pressure.** Hypertension 37: 1199-1208.
152. REUDELHUBER T.L. (2005). **The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II.** Curr Opin Nephrol Hypertens 14: 155-159.
153. RONG P., CAMPBELL D.J. and SKINNER S.L. (2003). **Hypertension in the (mRen2)27 rat is not explained by enhanced kinetics of transgenic Ren-2 renin.** Hypertension 42: 523-527.
154. ROSENTHAL J., THURNREITER M., PLASCHKE M., GEYER M., REITER W. and DAHLHEIM H. (1990). **Reninlike enzymes in human vasculature.** Hypertension 15: 848-853.
155. RUBATTU S., ENEA I., GANTEN D., SALVATORE D., CONDORELLI G., CONDORELLI G., RUSSO R., ROMANO M., GIGANTE B., TRIMARCO B. and VOLPE M. (1994). **Enhanced adrenal renin and aldosterone biosynthesis during sodium restriction in TGR(mRen2)27.** Am J Physiol 267: E515-E520.
156. SADJADI J., PUTTAPARTHI K., WELBORN M.B. 3rd, ROGERS T.E., MOE O., CLAGETT G.P., TURNAGE R.H., LEVI M. and MODRALL J.G. (2002). **Upregulation of autocrine-paracrine renin-angiotensin systems in chronic renovascular hypertension.** J Vasc Surg 36: 386-392.
157. SANTOS R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J. and ANDRADE S.P. (2000). **Angiotensin (1-7): an update.** Regul Pept 91: 45-62.
158. SANTOS R.A., SIMOES e SILVA A.C., MARIC C., SILVA D.M.R., MACHADO R.P., de BUHR I., HERINGER-WALTHER S., PINHEIRO S.V., LOPES M.T., BADER M., MENDES E.P., LEMOS V.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., SCHULTHEISS H.-P., SPETH R. and WALTHER T. (2003).

- Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas.** Proc Natl Acad Sci USA 100: 8258-8263.
159. SENANAYAKE P. deS., MORIGUCHI A., KUMAGAI H., GANTEN D., FERRARIO C.M. and BROSNIHAN K.B. (1994). **Increased expression of angiotensin peptides in the brain of transgenic hypertensive rats.** Peptides 15: 919-926.
160. SENANAYAKE P. deS., SMEBY R.R., MARTINS A.S., MORIGUCHI A., KUMAGAI H., GANTEN D. and BROSNIHAN K.B. (1998). **Adrenal, kidney, and heart angiotensins in female murine Ren-2 transfected hypertensive rats.** Peptides 19: 1685-1694.
161. SCHIAVONE M.T., SANTOS R.A.S., BROSNIHAN K.B., KHOSLA M.C. and FERRARIO C.M. (1988). **Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide.** Proc Natl Acad Sci USA 85: 4095-4098.
162. SILVA-ANTONIALLI M.M., TOSTES R.C., FERNANDES L., FIOR-CHADI D.R., AKAMINE E.H., CARVALHO M.H., FORTES Z.B. and NIGRO D. (2004). **A lower ratio of AT₁/AT₂ receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats.** Cardiovasc Res 62: 587-593.
163. SIRAGY H.M., HOWELL N.L., RAGSDALE N.V. and CAREY R.M. (1995). **Renal interstitial fluid angiotensin: modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion and renin inhibition.** Hypertension 25: 1021-1024.
164. SIRAGY H.M. and CAREY R.M. (1999). **Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model.** Hypertension 33: 1237-1242.
165. SIRAGY H.M., XUE C., ABADIR P. and CAREY R.M. (2005). **Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation.** Hypertension 45: 133-137.
166. SIRAGY H.M. (2006). **Angiotensin II compartmentalization within the kidney: effects of salt diet and blood pressure alterations.** Curr Opin Nephrol Hypertens 15: 50-53.
167. SWALES J.D. and TANGE J.D. (1971). **The influence of acute sodium depletion on experimental hypertension in the rat.** J Lab Clin Med 78(3): 369-379.

168. TATCHUM-TALOM R., EYSTER K.M. and MARTIN D.S. (2005). **Sexual dimorphism in angiotensin II-induced hypertension and vascular alterations.** Can J Physiol Pharmacol 83: 413-422.
169. TIPNIS S.R., HOOPER N.M., HYDE R., KARRAN E., CHRISTIE G. and TURNER A.J. (2000). **A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.** J Biol Chem 275: 33238-33243.
170. TOKITA Y., FRANCO-SAENZ R., MULROW P.J. and GANTEN D. (1994a). **Effects of nephrectomy and adrenalectomy on the renin-angiotensin system of transgenic rats TGR(mRen2)27.** Endocrinology 134: 253-257.
171. TOKITA Y., FRANCO-SAENZ R., REIMANN E.M. and MULROW P.J. (1994b). **Hypertension in the transgenic rat TGR(mRen-2)27 may be due to enhanced kinetics of the reaction between mouse renin and rat angiotensinogen.** Hypertension 23: 422-427.
172. TOKITA Y., FRANCO-SAENZ R. and MULROW P.J. (1995). **Reversal of the suppressed kidney renin level in the hypertensive transgenic rat TGR(mRen-2)27 by angiotensin converting enzyme inhibition.** Am J Hypertens 8: 1031-1039.
173. TOKUYAMA H., HAYASHI K., MATSUDA H., KUBOTA E., HONDA M., OKUBO K., TAKAMATSU I., TATEMATSU S., OZAWA Y., WAKINO S. and SARUTA T. (2002). **Differential regulation of elevated renal angiotensin II in chronic renal ischemia.** Hypertension 40: 34-40.
174. TURNER A.J., HISCOX J.A. and HOOPER N.M. (2004). **ACE2: from vasopeptidase to SARS virus receptor.** Trends Pharmacol Sci 25: 291-294.
175. URATA H., BOEHM K.D., PHILIP A., KINOSHITA A., GABROVSEK J., BUMPUS F.M. and HUSAIN A. (1993). **Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart.** J Clin Invest 91: 1269-1281.
176. van der MARK J. and KLINE R.L. (1994). **Altered pressure natriuresis in chronic angiotensin II hypertension in rats.** Am J Physiol 266: F739-F748.
177. VANECKOVA I., CAHOVA M., KRAMER H.J., HUSKOVA Z., SKAROUPKOVA P., KOMERS R., BADER M., GANTEN D. and CERVENKA L. (2004). **Acute effects of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in**

- heterozygous Ren-2 transgenic rats on normal or low sodium intake.** *Kidney Blood Press Res* 27: 203-210.
178. VANECKOVA I., SKAROUPKOVA P., DVORAK P., CERTIKOVA CHABOVA V., TESAR V., BADER M., GANTEN D. and KRAMER H.J. (2005). **Effects of sodium restriction and cyclooxygenase-2 inhibition on the course of hypertension, proteinuria and cardiac hypertrophy in Ren-2 transgenic rats.** *Physiol Res* 54: 17-24.
179. VATNER S.F. (1978). **Effects of anesthesia on cardiovascular control mechanisms.** *Environ Health Perspect* 26: 193-206.
180. VENIANT M., WHITWORTH C.E., MENARD J., SHARP M.G., GONZALES M.F., BRUNEVALL P. and MULLINS J.J. (1995). **Developmental studies demonstrate age-dependent elevation of renin activity in TGR(mRen2)27 rats.** *Am J Hypertens* 8: 1167-1176.
181. von LUTTEROTTI N., CATANZARO D.F., SEALEY J.E. and LARAGH J.H. (1994). **Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues.** *Circulation* 89: 458-470.
182. von THUN A.M., EL-DAHR S.S., VARI R.C. and NAVAR L.G. (1994a). **Modulation of renin-angiotensin and kallikrein gene expression in experimental hypertension.** *Hypertension* 23, Suppl. I: I-131-I-136.
183. von THUN A.M., VARI R.C., EL-DAHR S.S. and NAVAR L.G. (1994b). **Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion.** *Am J Physiol* 266: F120-F128.
184. WANG T. and GIEBISCH G. (1996). **Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in the rat kidney.** *Am J Physiol* 271: F143-F149.
185. WANG C.T., ZOU L.X. and NAVAR L.G. (1997). **Renal responses to AT₁ blockade in angiotensin II-induced hypertensive rats.** *J Am Soc Nephrol* 8: 535-542.
186. WANG C.T., CHIN S.Y. and NAVAR L.G. (2000). **Impairment of pressure-natriuresis and renal autoregulation in ANG II-infused hypertensive rats.** *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F319-F325.
187. WANG C.T., NAVAR L.G. and MITCHELL K.D. (2003). **Proximal tubular fluid angiotensin II levels in angiotensin II-induced hypertensive rats.** *J Hypertens* 21: 353-360.

188. WEBER M.A., THORNELL I.R. and STOKES G.S. (1973). **Effects of hemorrhage with and without fluid replacement on plasma renin activity.** *Am J Physiol* 225: 1161-1164.
189. WELCHES W.R., BROSNIHAN K.B. and FERRARIO C.M. (1993). **A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11.** *Life Sci* 52: 1461-1480.
190. WOLF G. and NEILSON E.G. (1993). **Angiotensin II as a renal growth factor.** *J Am Soc Nephrol* 3: 1531-1540.
191. XUE B., PAMIDIMUKKALA J. and HAY M. (2005). **Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2177-2184.
192. YOSIPIV I.V. and EL-DAHR S.S. (1996). **Activation of angiotensin-generating systems in the developing rat kidney.** *Hypertension* 27: 281-286.
193. YUN J.C., KELLY G.D., BARTTER F.C. and TATE J.E. (1978). **Mechanism for the increase in plasma renin activity by pentobarbital anesthesia.** *Life Sci* 22: 1545-1554.
194. ZHAO Y., BADER M., KREUTZ R., FERNANDEZ-ALFONSO M., ZIMMERMANN F., GANTEN U., METZGER R., GANTEN D., MULLINS J.J. and PETERS J. (1993). **Ontogenetic regulation of mouse Ren-2d renin gene in transgenic hypertensive rats, TGR(mRen2)27.** *Am J Physiol* 265: E699-E707.
195. ZICHA J. and KUNES J. (1999). **Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat.** *Physiol Rev* 79: 1227-1282.
196. ZOU L.X., IMIG J.D., von THUN A.M., HYMEL A., ONO H. and NAVAR L.G. (1996). **Receptor-mediated intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II-infused rats.** *Hypertension* 28: 669-677.
197. ZOU L.X., IMIG J.D., HYMEL A. and NAVAR L.G. (1998). **Renal uptake of circulating angiotensin II in Val⁵-angiotensin II infused rats is mediated by AT₁ receptor.** *Am J Hypertens* 11: 570-578.

Publikace

1. KOPKAN L., KRAMER H.J., **HUSKOVA Z.**, VANOURKOVA Z., BACKER A., BADER M., GANTEN D. and CERVENKA L. (2004). **Plasma and kidney angiotensin II levels and functional response to AT1 receptor blockade in hypertensive Ren-2 transgenic rats.** J Hypertens 22: 819-825.
2. VANECKOVÁ I., CAHOVA M., KRAMER H.J., **HUSKOVA Z.**, SKAROUPKOVA P., KOMERS R., BADER M., GANTEN D. and CERVENKA L. (2004). **Acute effects of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in heterozygous Ren-2 transgenic rats.** Kidney Blood Press Res 27: 203-210.
3. KOPKAN L., KRAMER H.J., **HUSKOVA Z.**, VANOURKOVA Z., SKAROUPKOVA P., THUMOVA M., and CERVENKA L. (2005). **The role of intrarenal angiotensin II in the development of hypertension in Ren-2 transgenic rats.** J Hypertens 23: 1531-1539.
4. **HUSKOVA Z.**, KRAMER H.J., THUMOVA M., VANOURKOVA Z., BURGELOVA M., TEPLAN V. and CERVENKA L. (2006). **Effects of anaesthesia on plasma and kidney ANG II levels in normotensive and ANG II-dependent hypertensive rats.** Kidney Blood Press Res 29: 74-83.
5. **HUSKOVA Z.**, KRAMER H.J., VANOURKOVA Z. and CERVENKA L. (2006). **Effects of changes in sodium balance on plasma and kidney angiotensin II levels in anesthetized and conscious Ren-2 transgenic rats.** J Hypertens 24: 517-527.
6. VANOURKOVA Z., KRAMER H.J., **HUSKOVA Z.**, VANECKOVA I., OPOCENSKY M., CHABOVA V.C., TESAR V., SKAROUPKOVA P., THUMOVA M., DOHNALOVA M., MULLINS J.J. and CERVENKA L. (2006). **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. 24: 2465-2472.
7. **HUSKOVA Z.**, VANECKOVA I. and CERVENKA L. (2006). **Renin-angiotenzinový systém.** Česk Fyziol 55: 96-105.
8. **HUSKOVA Z.**, KRAMER H.J., VANOURKOVA Z. and CERVENKA L. (2006). **Effects of enhanced dietary salt load and salt restriction on the course of hypertension and angiotensin II levels in female Ren-2 transgenic rats.** In press