

UNIVERZITA KARLOVA

2.lékařská fakulta

INSTITUT KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY

Pracoviště experimentální medicíny

**Úloha endotelinového systému v rozvoji hypertenze
a hypertenzního orgánového poškození u Ren-2
transgenních potkanů**

Dizertační práce

Autor práce: **MUDr. Martin Opočenský**

P R A H A 2 0 0 9

Úvodní prohlášení	1
Seznam zkratk použitých v textu.....	2
1. Úvod.....	4
2. Mechanismy regulace krevního tlaku	5
3. Patofyziologie vzniku hypertenze	8
3.1. Úloha renin-angiotenzinového systému při vzniku hypertenze	9
3.2. Úloha endotelinového systému při vzniku hypertenze.....	11
3.2.1 Endoteliny	11
3.2.2 Endotelinové receptory	14
3.2.3 Fyziologické funkce endotelinu a jeho možný podíl v patofyziologii hypertenze a postižení kardiovaskulárního aparátu	15
3.2.4 Endoteliální dysfunkce.....	20
4. Hypertenzní model – Ren-2 transgenní potkan (TGR).....	21
5. Interakce renin-angiotenzinového a endotelinového systému.....	23
6. Shrnutí teoretické části	25
7. Studie č.1.....	26
8. Studie č. 2.....	37
9. Studie č.3.....	50
10. Studie č.4.....	62
Literatura.....	76

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.

Seznam zkratk použitých v textu

2K1C	„two-kidney one-clip“ (dvouledvinový jednosvorkový Goldblattovský model hypertenze)
ANG	angiotenzin
ANG-1	angiotenzin I
ANG-2	angiotenzin II
ANG-(1-5)	angiotenzin-(1-5)
ANG-(1-7)	angiotenzin-(1-7)
ANG-(1-8)	angiotenzin-(1-8)
ANG-(1-9)	angiotenzin-(1-9)
ANG-(1-10)	angiotenzin-(1-10)
AP-1	aktivační protein-1
ATP	adenozin-trifosfát
AT ₁	receptor pro angiotenzin II typu 1
AT ₂	receptor pro angiotenzin II typu 2
cAMP	cyklický adenosin-monofosfát
BH ₄	tetrahydrobiopterin
cav-1	kaveolin
CNS	centrální nervová soustava
DOCA	deoxykortikosteron acetát
ECE	endotelin konvertující enzym
ECE-1	izoforma 1 endotelin konvertujícího enzymu
ECE-2	izoforma 2 endotelin konvertujícího enzymu
ECE-3	izoforma 3 endotelin konvertujícího enzymu
ECE-1a	izoforma 1a endotelin konvertujícího enzymu
ECE-1b	izoforma 1b endotelin konvertujícího enzymu
ECE-1c	izoforma 1c endotelin konvertujícího enzymu
ECE-1d	izoforma 1d endotelin konvertujícího enzymu
ECT	extracelulární tekutina
EDRF	endoteliální relaxační faktor
ET	endotelin
ET-1	endotelin 1
ET-2	endotelin 2

ET-3	endotelin 3
ET _A receptor	endotelinový receptor A
ET _B receptor	endotelinový receptor B
GF	glomerulární filtrace
IM	infarkt myokardu
IP3	inositol 3-fosfát
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
MAP	střední arteriální tlak
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Na	Natrium-sodík
NEP	neutrální endopeptidáza
NF-kB	nukleární faktor-kappaB
NKCC2	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ - kontraspotér
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
eNOS	endoteliální izoforma syntázy oxidu dusnatého
OECT	objem extracelulární tekutiny
ONOO-	peroxynitrit
PCR	periferní cévní rezistence
PGE2	prostaglandin E2
PDGF	destičkový růstový faktor uvolněný z trombocytů
PET	pozitronová emisní tomografie
RAS	renin-angiotenzinový systém
ROS	reaktivní oxidační produkty
SD	Sprague-Dawley
SHR	spontánně hypertenzní potkan
SHR-SP	spontánně hypertenzní potkan-stroke-prone
vWF	von Willebrandův faktor
TGF	transformující růstový faktor
TGR	hypertenzní transgenický potkan nesoucí myší Ren-2 gen pro renin
TK	krvní tlak

1. Úvod

Endotel, lokalizovaný na rozhraní mezi cévní stěnou a cirkulující krví, se podílí na udržování kardiovaskulární homeostázy několika důležitými funkcemi: regulováním angiogeneze a zánětlivé odpovědi, udržováním rovnovážné hemostázy, permeability cévní stěny a kontrolou krevního tlaku. Ačkoli je endotel tvořen jedinou vrstvou buněk, jejich množství je přibližně srovnatelné s množstvím buněk v játrech.

Objev endotelinu-1 (ET-1) před více než 20 lety Yanagisawou, resp. jeho izolace z endoteliální buňky, byl rychle následován úvahou o významu role tohoto peptidu složeného z 21 aminokyselin v patogeneze kardiovaskulárních onemocnění. Poměrně velmi rychle, během cca 5 let, se podařilo vytvořit farmakologické látky, které brání vzniku ET-1, resp. blokují jeho působení.

Endotelinový systém a renin-angiotenzinový systém představují dva nejsilnější známé vazokonstrikční systémy. ET-1, který působí převážně parakrinně vazbou na své dva G-proteinové receptory ET_A a ET_B, má kromě vazokonstrikčního působení i významnou roli v regulaci renální hemodynamiky a výdeji solí a tekutin ledvinami. Zvláště u sůl-senzitivních modelů hraje ET-1 významnou roli v patogenezi hypertenze a v rozvoji orgánového poškození. Nefroprotektivní účinnost blokády ET receptorů je srovnatelná s blokádou renin-angiotenzinového systému. Existuje však poměrně výrazná diskrepance v působení ET-1 u jednotlivých modelů hypertenze. U modelů s exogenním podáním angiotenzinu II existuje prokazatelná endotelin-dependentní složka, na rozdíl od modelů s endogenní produkcí angiotenzinu II.

Tato disertační práce je rozdělena do několika kapitol. První část je věnována fyziologii regulace krevního tlaku a patofyziologii hypertenze, další část se zabývá úlohou renin-angiotenzinového systému při vzniku hypertenze a dále zvláště úlohou endotelinového systému s podrobnějším popisem jeho jednotlivých součástí - endotelinů, endotelinových receptorů a jejich interakcí v patogenezi hypertenze a hypertenzního orgánového poškození. Následuje kapitola o modelu hypertenze použitém v našich pokusech, což je hypertenzní kmen transgenních potkanů s inkorporovaným myším Ren-2 reninovým genem (TGR[mRen2]27). V závěru teoretické části je hodnocena interakce systému renin-angiotenzinového a endotelinového.

Následují vlastní experimentální studie.

Ve své práci jsem se soustředil na objasnění významu neselektivní blokády ET receptorů bosentanem ve srovnání s blokádou selektivním blokátorem ET_A receptorů atrasentanem,

jejich vlivu na zlepšení přežívání a ochranu cílových orgánů před poškozením, a to při aplikaci v mládí a v dospělosti u heterozygotních a homozygotních Ren-2 transgenických samčích potkanů kmenových normální a vysokoslanou dietou.

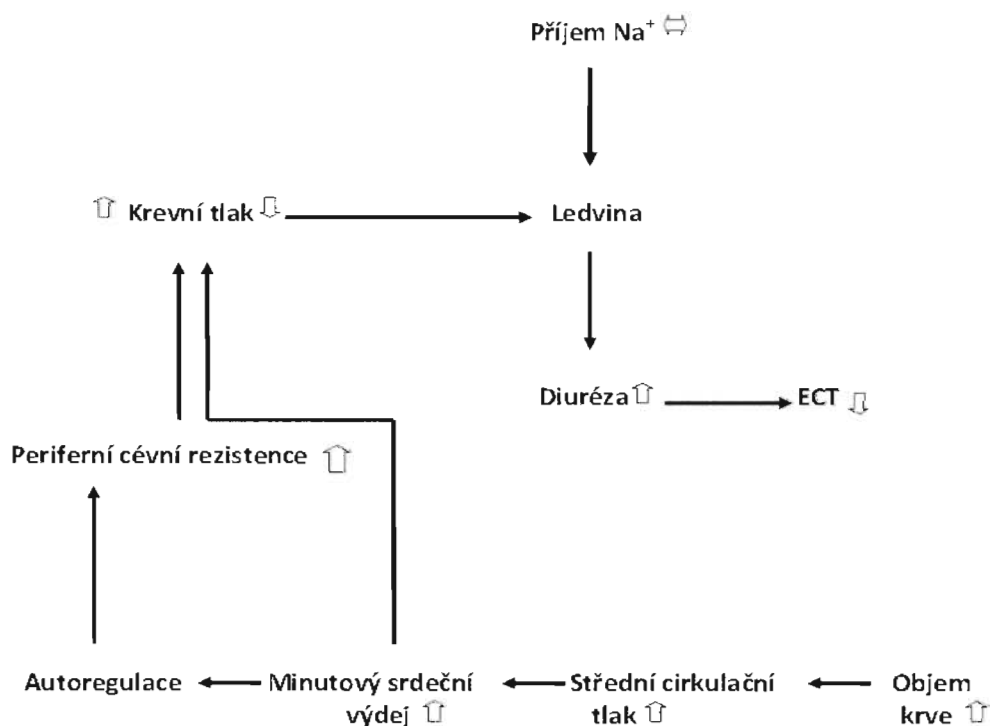
2. Mechanismy regulace krevního tlaku

Hodnota arteriálního krevního tlaku je dána součinem velikosti srdečního výdeje a periferní cévní rezistence. Systolický tlak je nejvyšší dosažená hodnota tlaku během systoly, diastolický tlak je naopak nejnižší hodnota, na kterou klesne tlak v průběhu diastoly. Rozdíl mezi oběma hodnotami se nazývá pulsový tlak nebo tlaková amplituda. Často je používána zvláště při elektronickém měření tzv. střední hodnota tlaku. Jedná se o průměrnou hodnotu tlaku krve za celou srdeční revoluci. Protože diastola trvá déle než systola, není střední tlak průměrem mezi systolickým a diastolickým tlakem, ale více se blíží diastolickému tlaku. Hodnota středního tlaku je ovlivňována také srdeční frekvencí, neboť zvýšení srdeční frekvence zkracuje diastolu více než systolu. Stálá hodnota středního arteriálního tlaku je předpokladem správné funkce tkání, což je zajišťováno více mechanismy. Rozlišujeme akutní, střednědobé a dlouhodobé mechanismy regulace TK. Akutní regulace TK, tj. reakce organismu ve vteřinách po významné změně krevního tlaku, je zprostředkována na prvním místě autonomním nervovým systémem, a to po aktivaci arteriálních baroreceptorů, chemoreceptorů nebo ischemických receptorů centrálního nervového systému (Tucker et al., 1999, Oparil, 1995). Cílem je adekvátně přizpůsobit velikost kapacity cirkulace její náplni, což např. zabrání zhroucení cirkulace při život ohrožujícím krvácení (Veselý, 2002). V akutní regulaci sehrává významnou úlohu vedle autonomního nervového systému složka hormonální – uvolňování adrenalinu, noradrenalinu a vasopresinu. V akutní až střednědobé regulaci krevního tlaku, tj. v časovém rozmezí minut až několika hodin, nabývají důležitosti další hormonální působky jako je angiotenzin II a aldosteron a další kontrolní mechanismy jako např. reflexní vazodilatace cévního řečiště a přesuny tekutin mezi intra- a extravaskulárními prostory. Dlouhodobé mechanismy nastupují ve dnech a jsou schopny přizpůsobit velikost náplně kapacity cirkulace: úloha regulace nervovými mechanismy rychle ustupuje, neboť dříve zmíněné receptory se adaptují na nové podmínky. Z dlouhodobého hlediska **se klíčové role ujímají ledviny** se svým vlivem na objem především extracelulární tekutiny a na hladiny hlavních osmotických sil této tekutiny, tj. na hladinu sodíku a chloridů s bikarbonátem, jako hlavními extracelulárními anionty (Guyton et al., 1995, Vander, 1995). Ústřední úloha ledvin

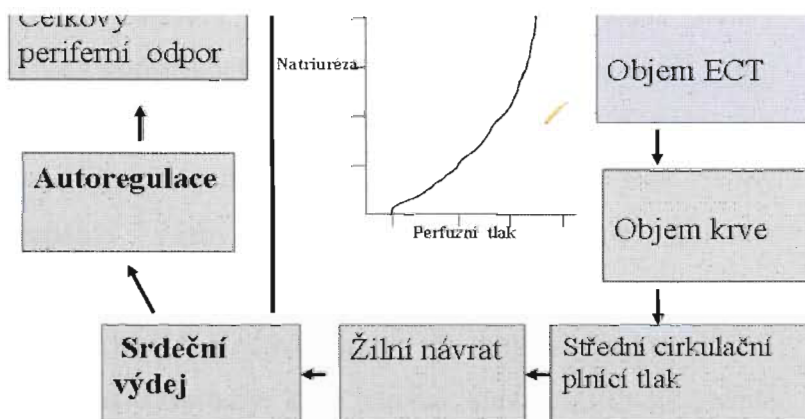
byla potvrzena výsledky řady transplantačních studií, kde pokusy na zvířatech ukázaly, že hypertenzi lze přenést transplantací ledviny z hypertenzního dárce normotenznímu příjemci (Heller et al., 1993, Rettig et al., 1996, Zicha a Kuneš, 1999, Coffman a Crowley, 2008).

Princip mechanismu dlouhodobé kontroly TK ledvinami pomocí tlakové diurézy a natriurézy.

ECT= extracelulární tekutina



Schematicky lze popsat roli ledvin v kontrole výše krevního tlaku, např. při jeho vzestupu, následujícím způsobem a to v několika na sebe navazujících krocích (Guyton a Hall, 1976). Zvýšení krevního tlaku vede k většímu výdeji tekutin ledvinami, což způsobí



zmenšení objemu extracelulární tekutiny a náplně cévního řečiště. Tento poslední faktor způsobí pokles žilního návratu s následným poklesem srdečního výdeje. Pokles srdečního výdeje způsobí normalizaci krevního tlaku. Uvažujeme-li opačnou situaci, tj. mechanismus úpravy sníženého krevního tlaku cestou sníženého vylučování ledvinami s následným zvýšením žilního návratu a zvýšeným srdečním výdejem, je nutno kromě přímého zvýšení srdečního výdeje zdůraznit i další mechanismus zvýšení krevního tlaku. Děje se tak zvýšením periferní cévní rezistence tzv. autoregulací neboli vazokonstrikcí arterioli, které tak chrání tkáň před nadbytečným prokrvením. Z dlouhodobého hlediska je tento druhý důsledek zvýšeného srdečního výdeje důležitější, neboť se periferní cévní rezistence zvyšuje oproti srdečnímu výdeji až pětinasobně.

Podobně jako v celém vaskulárním řečišti, tak i v ledvinách existuje autoregulace krevního průtoku, která je zajištěna souhrou aferentní a eferentní arterioly s dominantní funkcí aferentní arterioly, jejíž průsvit je regulován myogenním mechanismem tzv. Baylissovým efektem (Heller et al., 1993). Hlavním úkolem autoregulace v ledvinách je udržovat stálou glomerulární filtraci a průtok plazmy ledvinou a to nezávisle na poměrech v systémovém řečišti. Aferentní arteriola se podílí na regulaci průtoku ledvinou i dalším mechanismem - tzv. granulované myoepiteliální buňky v tunika media aferentní arterioly tvoří spolu s kuboidními buňkami na začátku distálního tubulu a s extraglomerulárními mesangiálními buňkami tzv. juxtaglomerulární aparát. Tento aparát produkuje vazokonstrikční látku zatím neobjasněné povahy a vytváří tak princip tubuloglomerulární zpětné vazby. Jako o nejpravděpodobnějším mediátoru TGF se uvažuje o adenzinu (Vallon et al., 2000). Zvýšený krevní tlak vede přes zvýšení glomerulárního tlaku ke zvýšení glomerulární filtrace a tak ke zvýšení koncentrace sodíkových iontů v distálním tubulu. Macula densa neboli ony kuboidní buňky juxtaglomerulárního aparátu vyloučí vazokonstrikční látku (adenozin, ATP, superoxid) (Itoh et al., 1985, Liu et al., 2004) s následným zúžením aferentní arterioly a poklesem glomerulární filtrace. Ačkoli neznáme identitu samotné vazokonstrikční látky, jsou známy modulátory tubuloglomerulární zpětné vazby. Angiotenzin II zvyšuje citlivost tubuloglomerulární zpětné vazby, což ve svém důsledku znamená pokles vylučování sodíku (glomerulární filtrace zůstává nízká i při nižší dodávce natria do oblasti macula densa) (Navar, 1998). Dalším modulátorem je oxid dusnatý, který naopak snižuje citlivost zpětné vazby (Levine et al., 2004). V případě jeho nedostatku opět dochází ke snížení vylučování sodíku, tj. efekt odpovídá působení angiotenzinu II.

V **patogenezi hypertenze** hraje klíčovou roli zhoršená schopnost ledvin vyloučit potřebné množství sodíku. V hodnocení účinku krevního tlaku na diurézu se začalo pracovat s tzv. funkční renální křivkou (Guyton a Hall, 1976), která ukazuje, jak i jen malé zvýšení arteriálního tlaku zvyšuje renální výdej vody. Nejpravděpodobnějším vysvětlením tohoto mechanismu je zvýšená produkce oxidu dusnatého, uvolňovaného z endotelu arteriol v důsledku zvýšeného mechanického namáhání endotelu při zvýšeném tlaku, který snižuje reabsorpci sodíku v tubulech. Experiment prokázal, že diureza při TK 200 mmHg se zvyšuje 6-8x, naopak ustává při TK pod 50 mmHg, normální je při hodnotě 100 mmHg. Byl zaveden pojem tlaková natriuréza, který vyjadřuje vztah krevního tlaku a vylučování sodíku, se stoupajícím tlakem se zvyšuje vylučování sodíku. Graficky se optimální vztah renálně perfusního tlaku a obratu při vylučování sodíku vyjadřuje zobrazením tzv. ekvilibračního bodu, tj. místo křížení funkční renální křivky a křivky příjmu vody a soli. Změna výše tlaku a tedy zároveň ekvilibračního bodu je realizovatelná v tomto modelu buď změnou sklonu natriuretické křivky (tzv. posun křivky) či změnou příjmu soli a vody (Guyton, 1990). Sklon křivky ovlivňují látky působící parakrinně i endokrinně. Mezi hlavní modulátory tlakově-natriuretické křivky charakterizované poklesem glomerulární filtrace (GF) a zvýšenou tubulární reabsorpcí – vedou tedy ke snížení sklonu křivky – patří snížení objemu extracelulární tekutiny, zvýšená aktivita renin-angiotenzinového systému, zvýšená sympatická nervová aktivita či inhibice vazodilatačních prostaglandinů. Naopak mezi faktory, které posunují křivku doleva, patří inhibice renin-angiotenzinového systému, snížení sekrece anti-diuretického hormonu, snížení exkrece aldosteronu, atriální natriuretický faktor, zvýšená aktivita kalikrein-kininového systému a expanze extracelulární tekutiny (Navar, 1998).

3. Patofyziologie vzniku hypertenze

Zjednodušeně lze podle patofyziologických mechanismů podílejících se v iniciační fázi na vzniku hypertenze uvést rozdělení na **objemově závislý typ hypertenze** a **vazokonstrikční typ hypertenze**. První typ se vyskytuje převážně u dvou situací. Jednak je to neschopnost fyziologických mechanismů reagovat přiměřeně na expanzi extracelulární tekutiny nebo neregulovatelnou produkci faktorů vedoucích k retenci sodíku (nadměrná sekrece aldosteronu při adenomu nebo hyperplasii kůry nadledvin, dále defekty enzymů typu 11-beta hydroxylázy podílejících se na tvorbě glukokortikoidů vedoucích k naprodukcii mineralokortikoidů). Tyto vlivy vedou ke zvýšené reabsorpci sodíku a expanzi extracelulární tekutiny se zvýšením

srdečního výdeje s rozvojem zvýšené periferní cévní rezistence s následným zvýšením krevního tlaku (Navar, 1997). U tohoto typu na samém začátku díky krátkodobým nervovým regulačním mechanismům periferní cévní rezistence klesá. Druhý typ je méně často podmíněn např. zvýšenou aktivitou sympatického nervového systému při nadprodukcí katecholaminů z feochromocytomu, častěji nadprodukcí angiotenzinu II, např. při zúžení průsvitu renální artérie (nejčastěji aterosklerotickým procesem nebo např. v experimentu jako tzv. Goldblattovský typ hypertenze) (Navar et al., 1998). Snížený průtok krve do ledvin (např. při ztrátě krevního objemu) vede k mohutné vazokonstrikční reakci s následnou retencí sodíkových iontů a vody, zvýšením středních plicních tlaků a srdečního výdeje s následným rozvojem zvýšené periferní cévní rezistence. Přes postupnou normalizaci hladin angiotenzinu II a plasmatické reninové aktivity poté často krevní tlak zůstává i nadále zvýšený. Důvodem je vysoká intrarenální koncentrace angiotenzinu II, v tomto případě zřejmě vzniklého tzv. non-reninovou cestou (Červenka et al., 1999). Předpokládá se, že přímý vaskulární a tubulární účinek angiotenzinu II dále sehrává důležitou roli v udržení hypertenze. Podstatné jsou i angiotenzinem II podmíněné zvýšené hladiny aldosteronu vedoucí k významné retenci sodíku.

Hypertenzní orgánové poškození orgánů je charakterizováno jednak pracovním přetížením srdce s následnou hypertrofií jeho svaloviny nekorespondující s rozvojem cévního řečiště a následnou ischemií, dále výrazným urychlením aterosklerotického procesu v koronárním řečišti a dále pak poškozením cévního řečiště i v jiných lokalizacích s možností komplikací např. krvácivého typu v CNS, mikrovaskulárně je podmíněno změnami na očním pozadí atd.

3.1. Úloha renin-angiotenzinového systému při vzniku hypertenze

Renin-angiotenzinový systém má klíčovou úlohu mezi mechanismy, které regulují sodíkovou rovnováhu a objem extracelulární tekutiny (Červenka et al, 2000). Je obvykle aktivován v případě ohrožení homeostázy tělesných tekutin, např. při sníženém příjmu solí a tekutin s poklesem objemu extracelulární tekutiny při krevních ztrátách. Dále je inhibován za podmínek relativního nadbytku soli v potravě nebo v případě různých typů ledvinového poškození.

Při fungujícím renin-angiotenzinovém systému je krevní tlak relativně necitlivý ke změnám v příjmu solí. Jednou z hlavních příčin této stability je potlačení vzniku angiotenzinu II při zvýšeném příjmu solí. Mechanismy odpovědné za citlivost tlaku k soli nejsou zatím zcela

jasné. Počet osob citlivých k vysokému příjmu soli se pohybuje v normotenzní populaci okolo 30-40%, v hypertenzní populaci 40-50%. Jedinci citliví k vysokému příjmu soli jsou ve starším věku postižení vyšším vzestupem TK než kontrolní osoby.

Systém renin-angiotensin II a aldosteron je zřejmě nejúčinnější regulátor krevního tlaku. Angiotensinogen, prekursor angiotensinu, je tvořen v játrech a je proteázou reninem přeměněn na angiotensin I. Renin, který je produkován v juxtaglomerulárním aparátu ledviny, se tvoří v případě poklesu TK nebo objemu extracelulární tekutiny, při stresu, sníženém příjmu NaCl, zvýšené aktivitě sympatického nervového systému nebo aktivaci baroreceptorů. Signál z macula densa v podobě snížené aktivity kotransportéru NKCC2 vede k produkci prostaglandinu E₂ (PGE₂). Ten aktivuje parakrinně receptory EP₄ na povrchu juxtaglomerulárních buněk, následuje zvýšená produkce reninu a exprese mRNA pro renin (Schnermann J, 2001). Angiotenzin I je štěpen angiotenzin konvertujícím enzymem (ACE) na angiotenzin II. ACE se nalézá na membránách endotelových buněk, ale i v buňkách proximálního tubulu. Dále v rozpustné formě cirkuluje i v plazmě. Renin dále inaktivuje vazodilatačně působící bradykinin.

Existují dva hlavní typy receptorů pro angiotenzin II - AT-1 a AT-2 receptory, které mají proteinovou povahu a patří mezi tzv. serpentínové s G proteinem-spřážené receptory (7x procházejí buněčnou membránou). AT-1 receptory zprostředkovávají hlavní fyziologické účinky angiotenzinu II (Campbell DJ, 2001), tj. vazokonstrikci, bun. růst, atd.

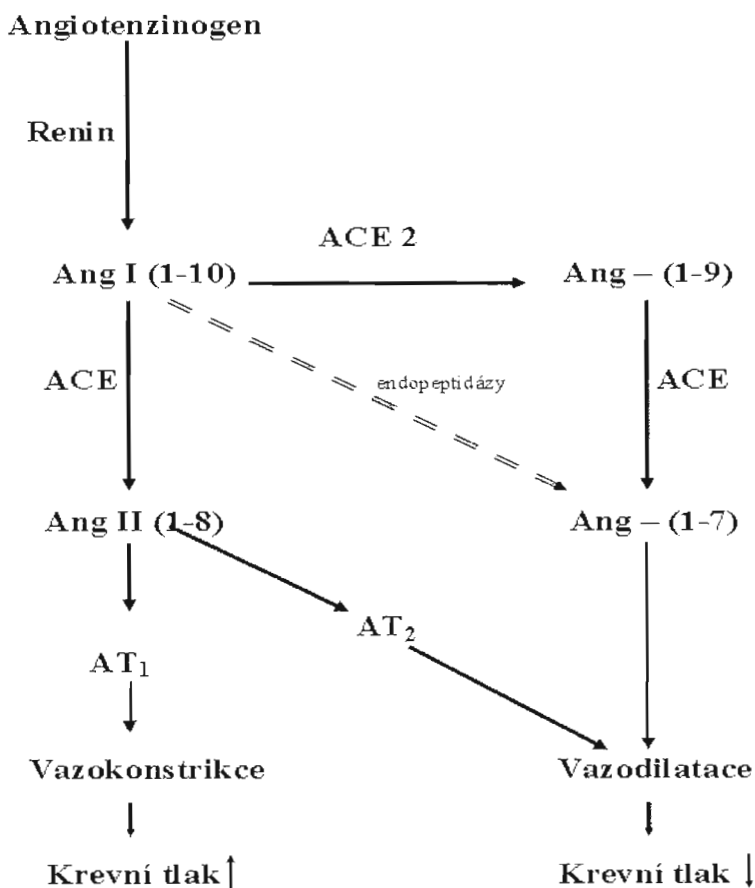
Významný je i tzv. intrarenální RAS, kde hladiny intrarenálního angiotenzinu II jsou 1000x vyšší než plasmatické a kde intrarenální angiotenzin II vzniká z místní produkce díky přítomnosti angiotenzin-konvertujícího enzymu přímo v cévách i tubulech ledvin. Tamtéž prokazatelná přítomnost AT₁ receptorů (Navar LG, 1993) zprostředkovává účinky angiotenzinu II na renální hemodynamiku a vylučování solí, oba tyto faktory se vzájemnou interakcí potencují s následnou retencí sodíku v organismu, retencí tekutin a rozvoji hypertenze. Koncentrace angiotenzinu a hustota AT receptorů je výrazně vyšší ve dřeni než v kůře.

Klasický renin-angiotenzinový systém působící vazokonstrikci byl v posledních letech doplněn poznatky o existenci vazodilatačního ramene. Vazokonstriční rameno umožňuje tvorbu a degradaci hypertenzního, růst stimulujícího peptidu angiotenzinu II. Vazodilatační rameno je antagonistou prvního ramene, dává vznik vazodilatátoru angiotenzinu(1-7) s antiproliferačními účinky (Santos RA et al., 2000). Rovnováhu mezi dvěma rameny udržuje angiotenzin-konvertující enzym 2. V případě nerovnáhy může vzniknout hypertenze či hypotenze.

Produkce aldosteronu je v nadledvinách stimulována angiotensinem II. Jeho hlavní úlohou je reabsorbce natria v distálním tubulu. Komplex aldosteronu a cytoplazmatického mineralokortikoidního receptoru v jádře stimuluje transkripci genů, mRNA a nových proteinů. V buňkách P aldosteron zvyšuje počet otevřených epitelových Na⁺ kanálů (ENaC) na apikálních membránách a tak zvyšuje kotransport Na⁺ do buněk.

Renin-angiotenzinový systém je pro tvorbu aktivních angiotenzinů rozdělen v rameno vazokonstriční a vazodilatační. Vazokonstriční rameno je tvořeno prohypertenzním, růst stimulujícím peptidem

angiotenzinem II. Vazodilatační rameno je antagonistou prvního ramene, dává vznik vazodilatátoru angiotenzinu (1-7) s antiproliferačními účinky (Santos et al., 2000). Rovnováhu mezi dvěma rameny udržuje angiotenzin-konvertující enzym 2. V případě nerovnáhy může vzniknout hypertenze či hypotenze.



Aktualizované schéma renin – angiotenzinového systému včetně ACE 2.

3.2. Úloha endotelinového systému při vzniku hypertenze

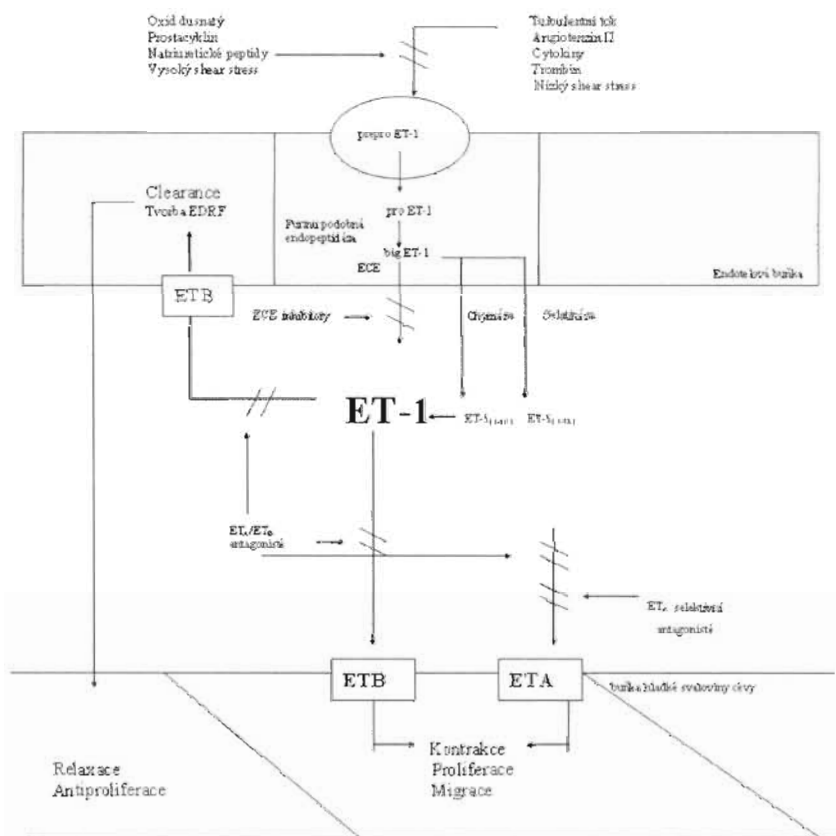
3.2.1 Endoteliny

Endotelin-1 (ET-1) je bílkovina složená z 21 aminokyselin, která byla poprvé izolována Yanagisawou a spol. v roce 1988 z aortálních endoteliálních buněk vepře. Je znám jednak

jako jeden ze dvou nejučinnějších vazokonstriktorů, ale zároveň jako mitogen a to in vivo i in vitro (Yanagisawa et al., 1988). Prospěšnost podávání blokátorů ET receptorů v redukci orgánového poškození cílových orgánů je zřejmě podmíněna jejich antiproliferativním působením (Mohacsi et al., 2004).

Produkce endotelinu-2 a endotelinu-3 je řádově menší než endotelinu-1. Endotelin-1, na rozdíl od dvou zbývajících, je produkován endoteliálními buňkami, které produkují jeho největší množství. Na druhou stranu ET-2 a ET-3 mají svůj význam pro renovaskulární funkce a v procesu neurotransmise a nacházející se ve větším množství v dřeni ledviny a na nervových zakončeních.

Již mnoho studií prokázalo, že ET systém sehrává důležitou úlohu v patogenezi vysokého krevního tlaku u sůl-senzitivních modelů hypertenze a s ním spojeným poškozením cílových orgánů (Schiffrin, 2001). Za negativní úlohu endotelinu-1 v rozvoji



Obr. 3
Tvorba a mechanismus účinku endotelinu-1.

hypertenze by mohly odpovídat ET_A receptory, naproti tomu úloha ET_B receptorů by mohla spočívat ve zprostředkování vazodilatace v periferním řečišti a natriuretickém působením v renálních tubulech (Kirkby et al., 2008). Neselektivní blokáda tak vede nejenom k potlačení škodlivého působení zprostředkovaného ET_A receptory, ale zároveň vede k blokáde pozitivní role ET_B receptorů. V poslední době zůstává hlavním problémem interpretovat nejednoznačná data, která přináší studium přínosu blokátorů neselektivních ET_A i ET_B a selektivních ET_A receptorů.

Rodina endotelinů se skládá ze tří peptidů (ET -1, ET-2 a ET-3) (Inoue et al., 1989), každý o velikosti 21 aminokyselin. Lidská ET-1 mRNA vytvoří prepropeptid složený z 212 aminokyselin, který je rozštěpen účinkem endopeptidas na pro-ET-1 odstraněním krátké

sekvence a posléze na big-endotelin 1 enzymem zvaným furin, který byl opakovaně prokázán v endoteliálních buňkách kravské aorty (Blais et al., 2002). Lidský big-endotelin, bílkovina o 38 aminokyselinách, která je detekovatelná v periferní cirkulaci, je rozštěpen endotelin konvertujícím enzymem na endotelin 1. Existují tři izoformy endotelinu konvertujícího enzymu – ECE-1, ECE-2 a ECE-3. ECE-1, objevený v roce 1994 (Shimada et al., 1994), má největší fyziologickou úlohu díky svému širokému rozsahu působnosti a svou rozsáhlou expresí jednak na endoteliálních buňkách, ale i exokrinních buňkách, dále buňkách hladké svaloviny a na neuronech. ECE-1 je schopen kromě big ET rozštěpit i jiné biologicky aktivní peptidy jako je bradykinin, substance P, angiotenzin I, inzulin, avšak s malou účinností (Johnson et al., 1999). Existuje několik izoform ECE-1, které se liší navzájem svým N-zakončením a které jsou všechny kódovány jedním genem, který se nachází na 1. chromozomu (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d). Jednotlivé izoformy mají nepochybně rozličnou úlohu už jenom proto, jak jsou rozličně orientovány jejich katalytické oblasti, a to buď extracelulárně (např. ECE-1a, ECE-1c) nebo intracelulárně (ECE-1b a ECE-1d). Tyto izoformy mohou být modulátorem aktivity a lokalizace ECE-2 a ECE-3 izoform. Rovněž ECE-2 má 4 izoformy, které ještě nejsou tak přesně definované jako u ECE-1. ECE-2 se podílí na úpravě big endotelinu-1 (Harrison et al., 1993). Nedávno byla navíc prokázána alternativní cesta tvorby endotelinu-1 chymázou přes endotelin-1 (1-31), který in vitro prokázal významnou kontraktilní roli jak ve vaskulární, tak i nevasculární hladké svalovině (Nakano et al., 1997), resp. endotelinu-1 (1-32) matrix metalloproteinázou, která zprostředkovává vznik ET-1 (1-31 a 1-32) (Fernandez-Patron et al., 1999).

V endoteliálních buňkách je tzv. konstituční nebo regulovanou cestou (rychlé uvolňování) (Russel a Davenport, 1999) produkován endotelin-1, který je následně v cytoplasmě skladován ve vesikulách Golgiho aparátu, což je zároveň velmi pravděpodobně místo ovlivnění jeho produkce tzv. regulovanou cestou za pomoci enzymu ECE (Barnes et al., 1998). Produkce ET-1 konstituční (pomalejší cestou) je regulována na úrovni genové transkripce. Syntéza je zvýšena přes protein kinázu C a fosfolipázu C turbulentním prouděním, snížením shear-stresu, hypoxií, cytokiny, angiotenzinem II, adrenalinem a LDL lipoproteinem. Naopak produkce ET-1 je snížena (mechanismem cyklického nukleotidu - cAMP) při zvýšených hladinách oxidu dusnatého, vazodilatačních prostaglandinů a natriuretického peptidu, zvýšeném shear stresu - tzv. tečném napětí (Gray a Webb, 1996).

Ačkoliv bylo prokázáno, že hlavním fyziologickým místem produkce ET-1 u lidí a zvířat je endotel (Properzi et al., 1995), je nyní prokázána schopnost produkce ET-1 i u buněk hladké svaloviny, makrofágů, leukocytů, fibroblastů i kardiomyocytů (Nunez et al., 1990,

Resink et al., 1990, Firth a Ratcliffe, 1992). V ledvinách je zřejmě nejvyšší koncentrace ET-1 v těle (Morita et al., 1991) a to v tubulárních buňkách, podocytech i mesangiálních buňkách (Kohan, 1997).

Odstraňování ET-1 z plazmy se děje primárně v plicích (Anggard et al., 1989) endocytózou a cestou degradace přes vazbu na komplex ligandu s ET_B receptorem (Dupuis et al., 2000) (tzv. clearance). Úlohu ET_B receptorů v katabolismu ET-1 dokládá experimentálně prokázáný až čtyřnásobný vzestup hladiny ET-1 po odstranění ET_B receptorů z endoteliálních buněk (Bagnall et al., 2006). V katabolismu endotelinu-1 se významně uplatňuje enzym neutrální endopeptidáza 24-11 (Abassi et al., 1992), enzym ze skupiny metalloendopeptidáz, který má i další úlohy – podílí se na jeho hydrolýze v plicní tkáni, membránách buněk v ledvinách nebo v tkáni myokardu po IM. Tento enzym se zároveň podílí i na přeměně big-endotelinu na endotelin-1 a podílí se také na alternativním vzniku ET-1 přes ET-1 (1-31) (Okishima et al., 2001). Významnou úlohu ledvin v katabolismu ET-1 demonstrovalo významně zhoršené odstraňování exogenně podaného ET-1 po experimentální bilaterální nefrektomii u krys (Shi et al., 1994). Nedávná studie metodou mikro PET prokázala, že katabolismus renálního ET-1 se děje jak enzymatickou, tak receptorovou cestou a poukázala i na úlohu jater jako dalšího důležitého orgánu podílejícím se na odstraňování ET-1 (Johnström et al., 2005).

3.2.2 Endotelinové receptory

Endotelinové receptory jsou G-proteiny, které jsou kodovány dvěma geny (Arai et al., 1990, Sakamoto et al., 1991). ET_A a ET_B receptory váží ET-1 se stejnou afinitou, ale ET_A receptory váží ET-3 až stonásobně méně než ET_B receptory (Davenport, 2002). ET_A receptor váže endotelin-1 s vyšší afinitou než endotelin-2 a oba dva více než endotelin-3, zatímco ET_B receptor váže všechny tři endoteliny se stejnou afinitou. Další klasifikace ET_B receptorů na subtypy, o které se nejdříve uvažovalo na základě prací s antagonistou PD142893, se pozdějšími kinetickými studiemi a výsledky delece genů pro ET_B receptor ukázala jako nepotřebná (Mizuguchi et al., 1997).

ET-1 se váže na ET_A receptory nacházející se na hladké svalovině cév s následným uvolněním vápníku a kontrakcí hladké svaloviny. ET_A receptor je tvořený G proteinem s navázanou fosfolipázou C a tvorbou IP₃. Rovněž ET_B receptory lokalizované v hladké svalovině cév vedou ke kontrakci (Moreland et al., 1992). Vzájemný poměr počtu receptorů ET_A/ET_B v hladké svalovině cév se zvyšuje s velikostí cév (Tschudi a Lüscher, 1994). V

lidském srdci, kardiomyocytech a fibroblastech se převážně nachází ET_A receptory, exprese ET_B receptorů je výraznější v převodním systému (Molenaar et al., 1993). ET-1 se váže na ET_B receptory cévního endotelia, které cestou aktivace endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS) stimulují tvorbu oxidu dusnatého s vazodilatačními vlastnostmi, což koriguje ET_A zprostředkovanou vazokonstrikci (Verhaar et al., 1998). Navíc oxid dusnatý inhibuje tvorbu ET-1, a tím dotváří značnou komplexnost interakcí mezi endotelinem-1 a oxidem dusnatým. Intravenózně podaný ET-1 vyvolá nejdříve přechodnou vazodilataci s hypotenzí podmíněnou aktivitou oxidu dusnatého s rozvojem následné, dlouhodobé hypertenzní reakce způsobené vazokonstrikční odpovědí na působení ET-1.

Endotelinové receptory jsou přítomny ve všech tkáních, což odpovídá fyziologické roli endotelinů, jakožto rozšířené vazoaktivní bílkoviny, která přispívá svým autokrinním a parakrinním působením k udržení cévního tonu. U lidí, jak už bylo zmíněno, jsou ET_A receptory převážně na hladké svalovině cév, rovněž je zde malé množství (pod 15%) ET_B receptorů, které přispívají k vazokonstrikci, jak ve zdravé, tak i nemocné tkáni (Maguire, 2001). ET_B receptory jsou zastoupeny hlavně v ledvinách, převážně mimo vaskulární řečiště a to zvláště ve dřeni ledviny (Karet a Davenport, 1996), kde zásadním způsobem ovlivňují regulaci vylučování sodíku a vody ledvinami, a tak hrají důležitou úlohu v udržování normálního systémového tlaku. ET_B receptory lokalizované v endotelu jsou zřejmě důležité v uvolňování vazodilatačních působků tzv. endothelial – derived relaxing factor (EDRF), jako je oxid dusnatý, a prostanooidů typu prostacyklinu (Warner et al., 1993). Dále se nacházejí receptory i mimo vaskulární struktury, jako jsou buňky epitelů nebo se např. nacházejí v CNS a to jak na buňkách glie, tak na neuronech. Endotelin stimuluje proliferaci v různých typech buněk, hlavně v hladké svalovině, cestou ET_A receptorů, ale i např. stimulací ET_B receptorů proliferaci astrocytů. Ve většině těchto buněk má endotelin úlohu komitogenu potencující efekt jiných růstových faktorů jako např. platelet – derived growth factor (PDGF).

3.2.3 Fyziologické funkce endotelinu a jeho možný podíl v patofyziologii hypertenze a postižení kardiiovaskulárního aparátu

Endoteliny jsou od samého začátku prezentovány v souvislosti s jejich vazomotorickým působením (Yanagisawa et al., 1988) a postupně se poznání rozšiřovalo o další kardiiovaskulární souvislosti aktivace ET receptorů.

Cévní tonus je mimo jiné udržován na příslušné úrovni působením ET-1, a tak systémové

podání blokátorů ET-1 receptorů snižuje u lidí TK (Haynes et al., 1996). U většiny živočišných druhů vede bolusové podání ET-1 ke krátkodobé hypotenzi, která je následována postupným vzestupem krevního tlaku. Tento úvodní pokles TK, který např. u myší nebyl prokázán, je podmíněn aktivací na endoteliálních buňkách navázaných ET_B receptorů s uvolněním NO a dalších vazodilatačních substancí od endotelu (D'Orleans-Juste et al., 2002). Naopak vazokonstrikční mediátory (např. tromboxan A₂) potencují presorický efekt ET-1, který působí přes aktivaci ET_A receptorů hladké svaloviny cévní stěny. Vazokonstrikce vzniklá aktivitou ET_B receptorů v cévní stěně je dokumentována v různých lokalizacích, ale na udržování cévního tonu se nepodílí. Selektivní antagonismus ET_B receptorů prokazatelně u zdravých dobrovolníků zvyšuje periferní cévní rezistenci (Strachan et al., 1999), což ukazuje, že rovnováha mezi vazodilatační a vazokonstrikční aktivitou po stimulaci ET_B receptorů je na straně vazodilatačního působení. Za patologických okolností je tato rovnováha narušena a převažuje vazokonstrikce (Cardillo et al., 1999, Pernow et al., 2006). Hypertenze nebyla prokázána u myší, u kterých genetickou manipulací bylo dosaženo zvýšení aktivity ET-1 na endoteliálních buňkách (Amiri et al., 2004), což poukazuje na složitost interakce vazokonstrikční stimulace vlivem ET_A a zároveň zvýšením aktivity ET_B receptorů s následnou vazodilatací vlivem stimulace NO a natriuretickou cestou. Tento mechanismus zřejmě zajišťuje ochranu spíše při fyziologickém než farmakologicky navozeném zvýšení koncentrace ET-1.

Endotelin však kromě svého mohutného vazokonstrikčního působení rovněž potencuje buněčnou hypertrofii s následným růstem lokálních cévních struktur, vede k buněčné proliferaci svojí výše zmíněnou rolí komitogena a inhibicí apoptózy ovlivňuje množství buněk. Dále je schopen stimulovat kolagenní syntézu a tak měnit složení extracelární matrix (Tostes et al., 2002), což by mohlo vysvětlovat jeho účast na hojení tkání, má tedy prorůstové vlastnosti. Profibrotické působení by vysvětlovalo jeho roli v patogenezi aterosklerózy. Endotelin však může působit i akutní klinické stavy jako vazospasmus mozkových cév po subarachnoidálním krvácení (Vajkoczy et al., 2005), vazospasmy u Raynaudova syndromu, ale i chronické stavy jako např. erektilní dysfunkci (Kim et al., 2002).

Podání exogenního endotelinu, jak bylo prokázáno, vede ke zvýšení krevního tlaku u krys, psů i zdravých dobrovolníků. Podání blokátorů endotelinových receptorů se ukázalo jako efektivní zvláště u některých těžkých forem experimentální hypertenze a u hypertenze s výrazným podílem sůl senzitivní složky. Z provedených prací na Ren-2 transgenních potkanech lze konstatovat, že selektivní blokáda ET_A receptorů je oproti neselektivní blokádě účinnější v ovlivnění hypertenze i v zabránění rozvoje orgánového poškození (Vaněčková et

al., 2005, Opočenský et al., 2004). Mezi další modely hypertenze, kde bylo podání blokátorů endotelinových receptorů efektivní (např. neselektivním antagonistou endotelinových receptorů bosentanem) patří DOCA-sůl hypertenzní krysy (Lariviere et al., 1993), dále aldosteron-salt (Park a Schiffrin, 2001), Dahl sůl-senzitivní (Barton et al., 1998) a SHR stroke-prone (Nishikibe et al., 1993), tedy modely s exogenně navozeným zvýšením angiotenzinu II (oproti málo efektivním účinkům u tzv. Goldblattovské hypertenze). Prakticky bez efektu na rozvoj hypertenze bylo podání těchto antagonistů u spontánně hypertenzních krys. Při objasnění mechanismu zvýšené citlivosti na sůl v patogenezi hypertenze ve vztahu ke dvěma druhům endotelinových receptorů se na základě provedeného výzkumu předpokládá, že ET_A receptory podporují zvýšenou citlivost na sůl, oproti ET_B receptorům, které před ní chrání. Delece genu pro ET_B receptor vede k rozvoji sůl senzitivní hypertenze u hlodavců (Gariépy et al., 2000). Je známo, že cévy v ledvinách jsou vysoce citlivé na preglomerulární a postglomerulární vazokonstrikční působení endotelinu, pravděpodobně díky vysokému počtu ET receptorů v těchto orgánech. Např. u Dahl sůl-senzitivních krys blokáda ET_A receptorů (Barton et al., 1998, Kassab et al., 1998) vedla k poklesu krevního tlaku, znovuoobnovení produkce oxidu dusnatého a úpravě histologických známek poškození ledvin – tato pozitivní úloha v korekci ledvinného poškození by mohla být zodpovědná za globální pozitivní antihypertenzní působení těchto látek. O ET_B receptorech se nově zjistilo, že hrají klíčovou roli v reabsorpci sodíku přes ovlivnění sodíkových kanálů (Gariépy, 2000).

Rozvinutá hypertenze je charakteristická zvýšenou periferní cévní rezistencí, která může být podmíněna jednak změnami ve struktuře cév, jednak zvýšeným vazokonstrikčním tonem, dále snížením úlohy endogenních vazodilatátorů, ale také kombinací těchto mechanismů. Již před delší dobou byl popsán možný mechanismus zvýšení periferní cévní rezistence, kterému předchází poměrně malé počáteční zvýšení tlaku se spuštěním cévních strukturálních změn, které vede ke zvýšení cévní rezistence s dalším zvýšením krevního tlaku a nastartování jakési vzestupné spirály. Zvýšená cévní rezistence vede k **procesu remodelace drobných arterií** (Intengan a Schiffrin, 2000), která je vyjádřitelná zvýšením poměru tloušťky medie k šířce lumen – toto je zřejmě adaptační mechanismus na zvýšení napětí cév při zvýšeném tlaku. Je velmi pravděpodobné, že remodelace je spíše adaptační mechanismus než primární reakce, jak ukázaly experimentální transplantace arterií z normotenzních zvířat hypertenzním. Existují dva modely remodelace tzv. eutrofická (Mulvany, 2002) - nemění se celkový průměr cévy, pouze poměr lumen a medie v její prospěch – např. u esenciální hypertenze nebo experimentálních modelů typu spontánních hypertenzních krys, Goldblattovská 2K1C, a tzv. hypertrofická remodelace u sekundárních hypertenzí při onemocnění ledvin a opět u

některých modelů hypertenze charakteristických zvětšením příčného průměru cévy díky hypertrofii medie. Dvě různé podoby remodelace ukazují na to, že kromě krevního tlaku se na struktuře cév podílejí i další faktory. To by mohlo vysvětlovat často pozorovanou skutečnost, že v různých experimentálních pracích pozorujeme efekt blokátorů endotelinových receptorů v zabránění hypertrofické remodelace bez toho, aby byl významně ovlivněn krevní tlak. Endotelin by mohl mít primárně trofickou funkci a pouze sekundární úlohu v regulaci krevního tlaku vazokonstrikcí. Nejednoznačné výsledky jsou v hodnocení vlivu blokátorů endotelinových receptorů na remodelaci velkých cév resp. malý počet studií potvrzuje výsledky jako např. u DOCA-salt hypertenze, kde blokáda ET receptorů podporuje apoptózu v medii aorty, což přispívá ke zvětšení plochy v příčném řezu cévou (Sharifi a Schiffrin, 1997).

Hladiny endotelinu zjizitelné imunoreaktivně, které navíc nekorelují s množstvím endotelinu v tkáních, nejsou u esenciální hypertenze zvýšené (Schiffrin, 1999), kromě hypertenzních Afroameričanů, u kterých je jeho hladina zvýšená. Dále hladina endotelinu dle provedené regresní analýzy koreluje s hladinou kreatininu, věkem a kouřením a nekoreluje s krevním tlakem. Blokáda ET_A receptorů vede k silnější vazodilataci na předloktí u hypertoniků než u normotoniků, což ukazuje na význam ET_A receptorů v regulaci cévního tonu (Cardillo et al., 1999). Naproti tomu ET_B receptory mají úlohu vazodilatátorů u normotenzních pacientů. Lze prohlásit, že u hypertenzních černochů je zvýšený na aktivitě receptorů ET_A závislý cévní tonus, který se podílí na vazokonstrikci a na zvýšení krevního tlaku.

Výsledky experimentálních studií prokazují, že blokáda ET receptorů brání vzniku **renálního postižení**, většinou bez průvodního poklesu krevního tlaku. Např. pokusy u modelů spontánně hypertenzních krys krměných DOCA a solí léčených blokátory ET receptorů se výrazně zabránilo vzniku postižení ledvin (Li et al., 1996). U modelu s interakcí L-NAME se podařilo blokátorem ET receptorů výrazně ovlivnit vznik postižení renálních cév (zánětlivé a proliferativní) i postižení renovaskulární hemodynamiky a to bez významného průvodního poklesu krevního tlaku (Bouriquet et al., 1996). Zůstává otázkou, zda toto pozitivní působení není omezeno na podávání blokátorů ET receptorů pouze v časném stadiu rozvoje hypertenze. Ledviny jsou významným cílovým orgánem působení ET-1. Exogenně podaný ET-1 mění regionálně průtok ledvinou, typicky působí vazokonstrikci v kůře a vazodilataci ve dřeni (Rubinstein et al., 1995). Vazodilatace v kůře je zprostředkována ET_B receptory, zatímco efekt na větší renální cévy a glomerulární aferentní a eferentní je podmíněn oběma receptory, ET_A i ET_B (Dhaum et al., 2006). V ledvinách hraje zřejmě

významnou roli v regulaci tlaku i parakrinní působení ET-1 vzniklého přímo v buňkách sběracího kanálku ve dřeni (Ge et al., 2006).

Hypertrofie levé srdeční komory je časnou **kardiální komplikací hypertenze** a představuje přídatný samostatný rizikový faktor pro další postižení srdce. In vitro má endotelin trofický účinek na kardiomyocyty, což napovídá jeho účast v procesu hypertrofie, která by tak mohla být blokována antagonisty ET receptorů. Jejich podání bránilo vzniku hypertrofie komor způsobené podáváním exogenního angiotenzinu II (Herizi et al., 1997) a podáváním noradrenalinu.

Prevence remodelace srdečních komor byla prokázána při dlouhodobějším (8 týdnů) podávání blokátorů ET receptorů, ale ne po krátké době jednoho týdne. Byl popisován podstatný účinek na srdeční výkon a na redukci rozvoje dilatace levé komory srdeční (Rothermund et al., 2000). V tomto případě však jejich efekt nebyl oddělen od průvodního snížení krevního tlaku. Výsledky u jednotlivých modelů experimentální hypertenze byly velmi nejednoznačné a navíc spíše podmíněné hemodynamickým působením. I u některých modelů (např. u SHR), u kterých není efektivní antihypertenzní odpověď na podávání blokátorů ET receptorů, byla zlepšena popisovaná perivaskulární fibróza stejně tak u DOCA-salt hypertenzních krys léčených selektivním blokátorem ET_A spolu s intersticiální fibrózou (Ammarguella et al., 2001). U Ren-2 transgenických potkanů je srdce vlivem hypertrofie levé komory zvětšené v porovnání s normotenzními potkany. Endotelin může mít v myokardu i pozitivní roli zvětšováním density kapilár v subendokardiálních prostorech levé komory nebo v hojení ran jizev po nekróze myokardu, což nepřímo potvrdily nepříznivé výsledky podávání blokátorů ET receptorů první den po IM (Nguyen et al., 2001).

V nedávné době byla publikována práce, ve které byla poprvé popsána zvýšená aktivita endotelinového systému u jinak zdravých mužů vyššího věku, která ukazovala, že vazokonstriční napětí je věkem zvýšeno srovnatelně s pacienty s hypertenzí, což prokazatelně bylo ovlivnitelné pravidelnou aerobní aktivitou (Van Guilder et al., 2007). Lze konstatovat, že endotelinem-1 ovlivňovaný vazokonstriční tonus se zvyšuje s věkem a přispívá k patogenezi hypertenze (Stauffer et al., 2008).

Prevence cévních mozkových příhod může být úspěšná zvláště při snižování krevního tlaku. Jak bylo prokázáno u zvířecích modelů s krátkým přežíváním při maligní hypertenzi, SHR-SP, incidence mozkových infarktů významně poklesla při léčbě antagonistou ET receptorů léčených od 6. do 8. týdne věku (Okada et al., 1995). I zde byly podobné efekty popsány již v dávkách, které významně neovlivňovaly krevní tlak. Přesný mechanismus ochranného působení v mozku však ještě nebyl vysvětlen.

3.2.4 Endoteliální dysfunkce

Stále více a více přibývají důkazy o tom, že na samém počátku patofyziologie kardiovaskulárních chorob stojí jako jeden z hlavních mechanismů **endoteliální dysfunkce**, která je definovaná jako porucha reaktivity cévní stěny spojená s prozánětlivým a protrombogenním stavem (Félétou a Vanhoutte, 2006). Dlouhodobě je vznik endoteliální dysfunkce spojován s poklesem oxidu dusnatého, v poslední době se však uvažuje o tom, že nedostatek oxidu dusnatého vzniká v důsledku nadbytku endotelinu-1 (Iglarz a Clozel, 2007). ET-1 vede k poklesu oxidu dusnatého dvěma hlavními mechanismy. Jednak snížením jeho produkce a to ET-1 potencovanou syntézou kaveolinu-1, což je jeden z hlavních regulačních proteinů syntézy NO cestou negativního ovlivnění aktivity enzymu eNOS (endoteliální syntáza oxidu dusnatého) (Kamoun et al., 2006). Druhým mechanismem je zvýšení degradace oxidu dusnatého. Nadprodukce ET-1 je spojena s poruchou NO podmíněné vazorelaxace v rezistentním cévním řečišti a zvýšenou produkcí ROS (reaktivní oxidační produkty) (Amiri et al., 2004). ET_A a ET_B receptory v hladké svalovině a ET_B receptory v endotelu dovedou zvýšit produkci ROS, které mimo jiné narušují funkci eNOS a to hlavně cestou oxidace jejího hlavního kofaktoru tetrahydrobiopterinu (BH₄). Nedostatek BH₄ vede k tomu, že jednou z hlavních příčin produkce ROS, zvláště superoxidového anionu, je nakonec samotná eNOS. Tento superoxidový anion reaguje s NO a vzniká peroxynitrit (ONOO⁻), mohutné oxidační činidlo samotného BH₄. Další práce přispěly ke shrnujícímu závěru, že ET-1 vede ke zvýšené produkci ROS, snížení dostupnosti BH₄ s následnou poruchou funkce eNOS, tzv. eNOS uncoupling, vedoucí k endoteliální dysfunkci (Iglarz a Clozel, 2007).

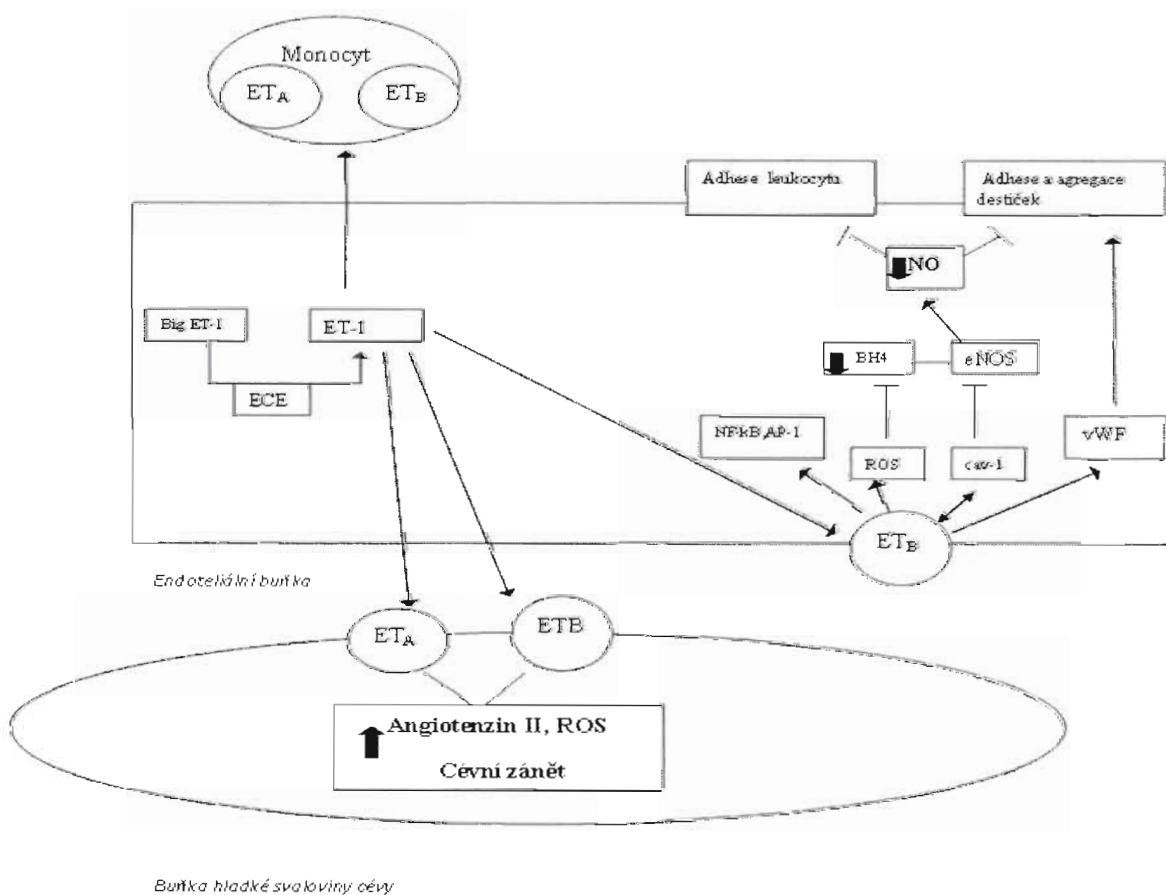
Nadprodukce endotelinu-1 cestou ET_B receptorů vede k prozánětlivému fenotypu endoteliálních buněk i ke zvýšení von Willebrandova faktoru (vWF). Převažují výsledky, že neselektivní inhibitory ET_A/ET_B mají pro ovlivnění endotelem podmíněné vazodilatace spolu s inzulínovou rezistencí větší význam než selektivní ET_A blokáda (Shemyakin et al., 2006).

Úloha endotelinového systému se prokázala různými mechanismy i v patogenezi aterosklerózy (Dashwood a Tui, 2002). Jeho proliferační působení vede k tvorbě fibrózní tkáně, imunoreaktivita tkáňového a cirkulujícího ET-1 odpovídá stupni postižení aterosklerotickým procesem (Lerman et al., 1991). Dále již bylo uvedeno, že zvýšená hladina ET-1 přes ovlivnění produkce NO vede k vazodilatační dysfunkci, ET-1 stimuluje agregaci destiček, expresi adhezivních molekul, růstu a proliferaci buněk hladké svaloviny a

fibroblastů - všechno jsou podstatné komponenty v procesu aterosklerózy (Ross, 1999). ET-1 dále aktivuje chemotaxi leukocytů a podporuje vznik zánětu v cévní stěně stimulací cytokinů - interleukinu 6 a tumor nekrotizujícího faktoru (Lüscher a Barton, 2000), prozánětlivých mediátorů NF- κ B (Schiffrin, 2001), tj. klíčových faktorů zánětlivé komponenty aterosklerózy. Důležitou roli hraje i transkripční faktor AP-1 (aktivační protein), který reguluje důležité biologické a patologické procesy (Fujioka et al., 2004).

4. Hypertenzní model – Ren-2 transgenní potkan (TGR)

Hypertenzní kmen transgenních potkanů s inkorporovaným myším Ren-2 reninovým



Obr. č. 4

Schéma předpokládaného mechanismu vzniku endoteliální dysfunkce působením endotelinu (NO – oxid dusnatý, eNOS – endoteliální NO syntáza, ET-1 – endotelin-1, ECE – endotelin konvertující enzym, ROS – reaktivní oxidační produkty, BH₄ – tetrahydrobiopterin, Cav-1 – kaveolin, vWF – von Willebrandův faktor, NF- κ B – nukleární faktor- κ ppaB, AP-1 – aktivační protein -1.

genem (TGR[mRen2]27) vytvořený Mullinsem (Mullins et al., 1990), představuje geneticky přesně definovaný model renin-dependentní (tedy zároveň ANG-II dependentní) hypertenze,

který se liší od svých kontrolních (transgen-negativních) normotenzních potkanů právě tímto jediným genem. Do genomu normotenzních Sprague-Dawley potkanů byl vložen myši Ren-2 reninový gen. Tento kmen je charakterizovaný normální hladinou angiotenzinu II a zvýšenou expresí Ren-2 genu v kůře nadledvin a cévní stěně (Langheinrich et al., 1996). Svým jasným genetickým základem se liší např. od potkanů se spontánní hypertenzí (SHR), u kterých není genetický základ hypertenze objasněn. Heterozygotní transgenní potkani vzniknou spojením transgen-pozitivního potomka s transgen-negativním SD potkanem opačného pohlaví. Spojením dvou heterozygotních zvířat vzniknou homozygoti pro daný gen. TGR je optimálním modelem angiotenzin II-dependentní hypertenze s endogenní aktivací renin-angiotenzinového systému, který je ve velké míře používán ke studiu funkčních a strukturálních změn ledvin, které nacházíme u hypertenze a to: pokles glomerulární filtrace a přítomnost proteinurie asociované s glomerulosklerózou. Navíc hypertenze u tohoto modelu je charakterizována sůl-senzitivní složkou (Callahan et al., 1996). Vysokoslaná dieta výrazně zhoršuje renální poškození, a tím přispívá ke zvýšení mortality, jak bylo prokázáno u homozygotních samců TGR (Dvořák et al., 2004). Morfologické změny renálního parenchymu jsou akutní (vznik fibrinoidní nekrózy) a chronické (kolaps kapilárního trsu či sklerotizace) (Vernerová, 2007).

Postup používaný k vytváření linií transgenních potkanů je ve stručnosti následující : u 29-30 denních samic se podáváním gonadotropinů navodí superovulace, po spáření s plodnými samci se odeberou oocyty z vejcovodu pod mikroskopem, které se z tzv. dárcovských samic mikroinjekcí implantují tzv. pěstounkám, samicím k tomu předem připraveným pářením s vasektomovanými samci. Přítomnost transgenu u potomstva je kontrolována metodou Southern blot nebo PCR (Paul et al., 1994).

Heterozygotní Ren-2 transgenní potkani začínají rozvíjet hypertenzi ve 4.-5. týdnu věku, maxim. hodnoty okolo 240 mmHg jsou dosaženy kolem 9.-10. týdne věku. Později tlak opět klesá (Kasper et al., 2005). Homozygotní zvířata vyvíjejí mnohem vyšší krevní tlak (až okolo 300 mmHg), z čehož vyplývá, že stupeň hypertenze závisí na množství transgenu. U tohoto modelu hypertenze byl potvrzen sexuální dimorfismus - výše krevního tlaku samců a samic se liší, samice mají v průměru o 30-40 mmHg nižší krevní tlak. U TGR samců dochází k vážnějšímu orgánovému poškození v důsledku hypertenze než u samic (Opočenský et al., 2004). Homozygotní zvířata vykazují menší váhový přírůstek, neléčená umírají v časném věku za příznaků maligní hypertenze (Dvořák et al., 2004).

Heterozygotní samci TGR představují vhodnější model hypertenze, protože na rozdíl od homozygotních jedinců vyvíjejících maligní hypertenzi, je jejich hypertenze mírnější, což

dovoluje dlouhodobé studie, a jejich hypertenze se tak více podobá hypertenzi u lidí. Zde se morfologický obraz hypertenzního poškození parenchymu ledviny podobá změnám, které nacházíme u benigní nefrosklerózy, představovaným sekundární formou fokální segmentální sklerózy a hyalinózy glomerulů (Vernerová, 2007). Vysokoslaná dieta u heterozygotních TGR indukuje přechod z benigní do maligní fáze hypertenze (charakterizované klinicky zvýšenou mortalitou, nárůstem proteinurie a úbytkem váhy).

Proteinurie je způsobena hlavně poškozením podocytů, které zajišťují celistvost filtrační bariéry, a jsou tak podstatné pro existenci normálního fungování samotné bazální membrány glomerulů, ale i přítomných endoteliálních buněk. Pouze několik studií se zabývalo úlohou poškození podocytů na rozvoji experimentální hypertenzní glomerulopatie (Ortmann et al., 2004, Macconi et al., 2000, Nagase et al., 2006). Rozličné faktory mající vliv na měření reninových koncentrací (pH, pohlaví, genetika, věk) brání jednoznačnému závěru, zda je tento model spojen se zvýšenou nebo sníženou aktivitou reninu (Lee et al., 1996). Plazmatické koncentrace proreninu jsou signifikantně zvýšené oproti kontrolním skupinám.

Největší exprese transgenů u TGR, jak již bylo výše popsáno, je v nadledvinkách, dále v mozku, v zažívacím traktu, v močových cestách, v ledvinách (Engler et al., 1998). Nadledviny TGR jsou zvětšené ve srovnání s kontrolami. Oboustranná adrenalektomie vede k rychlému poklesu plazmatických koncentrací proreninu a brání reaktivnímu zvýšení reninu po nefrektomii, což ukazuje podstatný podíl ledvin na hladině plazmatického reninu a proreninu (Tokita et al., 1994).

Podocytární poškození lze u heterozygotních hypertenzních TGR prokázat nejen analýzou exprese cytoskeletálních proteinů (hladkosvalový aktin a vimentin) a podocytárních markerů (desmin, nephrilysin), ale i na ultrastrukturální úrovni. V naší práci jsme prokázali, že neselektivní blokáda ET receptorů snižuje podocytární poškození, ale k úplné restituci podocytárních funkcí (dle imunohistochemických a ultrastrukturálních vyšetření) nedochází. Léčba selektivním ET_A blokátorem atrasentanem vede k úpravě podocytárního poškození, což v našich pokusech navíc statisticky významně korelovalo i s přežíváním (Opočenský et al., 2006). Ultrastrukturální poškození podocytů by mohlo sloužit jako marker renálního poškození.

5. Interakce renin-angiotenzinového a endotelinového systému

Renin–angiotenzinový a endotelinový systém představují dva nejmocnější dosud

poznané vazokonstrikční systémy. Důležitá role RAS v patofyziologii hypertenze a v rozvoji hypertenzního poškození cílových orgánů byla jasně prokázána. Jak již bylo výše uvedeno, byla objasněna úloha i ET systému v patogenezi sůl-senzitivního modelu hypertenze a s ním spojeným poškozením cílových orgánů. Jejich vzájemná interakce přitahuje zvýšenou pozornost. Bylo prokázáno, že angiotenzin II stimuluje expresi preproET mRNA a uvolňování endotelinu-1 v kulturách buněk endotelu, hladké svaloviny a buněk mesangiálních. Navíc bylo prokázáno zvýšení ledvinové exprese preproET mRNA a koncentrace endotelinu u potkanů s infundovaným angiotenzinem II. Situaci však komplikuje fakt, že u hypertenzních modelů se zvýšenou endogenní produkcí angiotenzinu II se nepodařilo prokázat, že je zde složka dependentní na aktivitě endotelinových receptorů. Lze však konstatovat, že existuje několik zřetelných průkazů skutečnosti, že angiotenzin II stimuluje uvolňování endotelinu-1 a je známé, že endotelinový systém hraje důležitou úlohu v patogenezi hypertenze a doprovodného poškození cílových orgánů u angiotenzin II-dependentních modelů hypertenze s exogenním podáním angiotenzinu II (Banes-Berceli et al., 2007).

Potravou přijímaný sodík hraje důležitou úlohu v patogenezi nejen hypertenze u lidí, ale i u sůl-senzitivních modelů hypertenze. Je známo, že zvýšený příjem sodíku vede ke škodlivému narušení srdečních funkcí a k dysfunkci cévního endotelu, který uvolněním endotelinu-1 přispívá k cévním změnám, které nacházíme u sůl-senzitivní hypertenze. Jednak víme, že selektivní blokáda ET_A receptorů snižuje krevní tlak především u sůl-senzitivních modelů hypertenze, ale v poslední době narůstající množství faktů svědčí pro to, že při vysokém příjmu sodíku potravou je významný vliv ET_B receptorů zejména na zprostředkování zvýšeného vylučování sodíku z těla ven.

Ve své práci jsme se soustředili na průkaz významu časně neselektivní blokády ET receptorů bosentanem a dále na význam blokády selektivním blokátorem ET_A receptorů atrasentanem, na zlepšení přežívání a dále na ochranu cílových orgánů před poškozením homozygotních Ren-2 transgenních samčích potkanů krmených vysokoslanou dietou. Toto se nám podařilo prokázat pro oba preparáty, ale pouze u atrasentanu došlo současně i k poklesu tlaku.

Z našich pokusů dále vyplynulo, že nástup maligní hypertenze je signifikantně opožděn u heterozygotních samic TGR s vysokoslanou dietou ve srovnání s dietou normoslanou. Toto pozorování je v souladu s nálezy u jiných hypertenzních modelů, kde samci rovněž jeví známky vážnějšího orgánového poškození a byl u nich zjištěn vyšší tlak než u samic (Reckelhoff, 2001). Některé studie naznačují vztah mezi renin-angiotenzin-aldosteronovým

systemem a počtem androgenních receptorů. Bylo prokázáno, že androgenní receptorová blokáda snižuje vývoj hypertenze a zabrání orgánovému poškození u samců kmene TGR. Z toho vychází teorie, že androgény mají stimulační účinky na RAS (Engler et al., 1998).

Další pozorování se týkalo rozdílů stupně hypertenzního poškození a jeho vztahu ke stáří zvířat, protože je známo, že mladší zvířata jsou více náchylná na hypertenzní poškození, ale také lépe reagují na podanou terapii (Kuneš a Zicha, 2006). U heterozygotních TGR bylo prokázáno, že ET receptorová blokáda má stejný efekt, pokud je aplikována u zvířat s již stabilizovanou hypertenzí (tzv. regresní protokol s léčbou podanou od 52.dne) nebo u mladých jedinců (preventivní protokol – léčba ihned po odstavení – 29.den). Těžší orgánové poškození bylo prokázáno u preventivního protokolu (Vaněčková et al., 2006). Zdá se, že mladší zvířata jsou citlivější na hypertenzní stimuly (zejména zvýšený příjem soli) a rozvíjí se u nich těžší hypertenze s vážnějšími známkami hypertenzního poškození.

6. Shrnutí teoretické části

Nedávné schválení užívání bosentanu, sitaxsentanu a ambrisentanu pro léčbu primární plicní hypertenze je prvním konkrétním průkazem klinické prospěšnosti léčebných postupů ovlivňujících endotelinový systém v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Léčba tohoto onemocnění, které má jinak velmi špatnou prognózu, ukazuje potenciál této terapeutické skupiny, u které i další data ukazují slibnou perspektivu pro onemocnění typu rezistentní hypertenze, chronického onemocnění ledvin nebo subarachnoidálního krvácení. Naproti tomu nutno připomenout selhání léčby ET-1 blokátory u srdečního selhání. Na tomto místě je nutné zdůraznit opatrnost v přejímání výsledků studií *in vitro* na zvířatech a jejich aplikaci v humánní medicíně.

Endotelin a jeho role v ochraně cílových orgánů před poškozením by mohla být podmíněna funkcí tzv. **lokálního regulátora cévního řečiště**, tím jak především ovlivňuje strukturu a složení cévní stěny (např. ovlivněním růstu, oxidativního stresu, zánětem a apoptózou) spíše než cévní reaktivitu. Vliv hypertenze se postupně výrazně zvětšuje při narůstajícím rozsahu poškození cílových orgánů, kde se zpočátku hemodynamické změny fixují ve změny strukturální. Ideální antihypertenzivum by mělo být zároveň i

vaskuloprotektivní, aby se zabránilo poškození nejdůležitějších cílových orgánů jako jsou ledviny, srdce, mozek a samotné cévy.

7. Studie č.1

Časná blokáda endotelinových A receptotů snižuje krevní tlak a zmenšuje poškození cílových orgánů u homozygotních Ren-2 potkanů

Cíl studie:

Nedávno jsme prokázali, že neselektivní endotelová ET_A/ET_B receptorová blokáda zřetelně zlepšuje míru přežívání a poškození cílových orgánů u homozygotních transgenních samců (TGR) pro myši Ren-2 reninový gen bez vlivu na snížení krevního tlaku. Protože aktivace ET_A receptoru by měla být zodpovědná za škodlivé působení ET v rozvoji hypertenze, byla tato studie provedena s cílem zjistit, zda lepší účinky vykazuje selektivní ET_A nebo ET_A/ET_B receptorová blokáda.

A. Úvod:

Endotelin-1 byl popsán jako jeden z nejmocnějších vazokonstriktorů (Yanagisawa et al., 1988, Maguire et al., 2002), který hraje rovněž roli v hemodynamice ledvin a vylučování soli a vody (Simonson, 1993). Navíc četné studie ukázaly, že ET systém hraje důležitou roli v patogenezi sůl-senzitivních modelů hypertenze a průvodného poškození cílových orgánů (Roux et al., 1999). Nefroprotektivní efekt blokátorů ET receptorů u těchto modelů je srovnatelný s blokádou renin-angiotenzinového systému (Schiffrin, 2002). Prospěšný efekt blokátorů ET receptorů v ovlivnění cílových orgánů vychází z jejich antiproliferativního působení (Mohacsi et al., 2004). Přesto však existují velké rozdíly v účinku ET mezi jednotlivými modely hypertenze. Zvířecí modely s exogenně podaným angiotenzinem II (ANG II) vykazují ET-dependentní složku, zatímco hypertenzní modely s endogenně zvýšenou produkcí ANG II ji nemají (Moreau et al., 2003).

V naší předchozí práci jsme prokázali, že léčba bosentanem podstatně zlepšuje míru přežívání u homozygotních transgenních potkanů (TGR) pro myši Ren-2 reninový gen krmených jak

dietou s normálním množstvím soli, tak vysokoslanou a to bez efektu na snížení krevního tlaku (Dvořák et al., 2004). Zatímco se věnovalo více pozornosti ochrannému působení neselektivní ET blokády u homozygotních TGR (Dvořák et al., 2004, Opočenský et al., 2004), není k dispozici informace týkající se účinku selektivní ET_A blokády na průběh hypertenze a poškození cílových orgánů u homozygotních TGR a málo informací je dostupných o heterozygotních zvířatech (Rothermund et al., 2003, Rossi et al., 2000). Je dobře známé, že mladá zvířata jsou více vnímavá k různým hypertenzním podnětům (Zicha and Kuneš, 1999) a že léčebná opatření provedená v tomto věku jsou účinnější než v pozdějším věku (Blezer et al., 1999). Přesto u Dahl-senzitivních potkanů bylo prokázáno, že ET_A receptorová blokáda je účinná pouze u dospělých, a ne u mladých zvířat (Dobešová et al., 2003).

Model transgenního hypertenzního TGR(mRen2)²⁷ potkana (Mullins et al., 1990) je cenný monogenetický model renin-dependentní (a tedy i ANG II-dependentní) hypertenze, který vykazuje funkční a strukturální změny ledviny obvykle přítomné u hypertenze, a to sníženou glomerulární filtraci a proteinurii spojenou s glomerulosklerózou (Bachmann et al., 1992, Rothermund et al., 2003). Protože je všeobecně přijímáno, že ET se podílí na vzestupu krevního tlaku (TK) zvláště u experimentálních modelů se sůl-senzitivní složkou hypertenze (Callahan et al., 1996), zabývali jsme se účinkem neselektivní ET receptorové blokády nebo selektivní ET_A receptorové blokády na přežití a TK na vysokoslané dietě.

B. Experimentální část:

Protokoly v této studii byly naplánovány v souladu s Principy péče a užití zvířat Výborem Americké Fyziologické Společnosti a jsou v souladu s Metodikou péče a užívání laboratorních zvířat, jak jsou publikovány Národním Institutem Zdraví a byly schválené Českým výborem pro péči o zvířata (protokol 79/2001 a 923/2003).

Zvířata

Homozygotní TGR (kmen s názvem TGR(mRen2)²⁷) a jejich kontrolní skupina normotenzních Hannover Sprague-Dawley potkanů (HanSD) byli chováni v pokojové teplotě 25°C s 12 hodinovým cyklem světlo/tma. Všechna zvířata používaná v této studii byla chována v Centru experimentální medicíny Institutu experimentální a klinické medicíny, kam byla dodána z Max Delbrück Centra Molekulární Medicíny (Berlín, Německo). Zvířata byla

převedená na vysokoslanou dietu (HS) (2%NaCl) okamžitě po odstavu (29 dnů) a dostávala pitnou vodu. Ve stejné době bylo zahájeno podávání neselektivního blokátoru ET_A/ET_B receptorů bosentanu nebo blokátoru selektivních ET_A receptorů atrasentanu (ABT-627; A-147627). Bosentan (Actelion, Alschwill, Switzerland) byl přidán do vysokoslané diety tak, aby celkové množství ve stravě odpovídalo $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ den}^{-1}$. ABT byl přidán do pitné vody, dávka byla přizpůsobena tak, aby odpovídala $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ den}^{-1}$. Následně byly vyšetřovány tyto experimentální skupiny:

samci HanSD na vysokoslané dietě HS (n = 24);

samci TGR + HS, neléčení (n = 21);

samci TGR + HS + bosantan (n=16);

samci TGR + HS + atrasentan (ABT-627;n=16).

Popis experimentu a funkční vyšetření

Systolický tlak byl 2x týdně měřen pletysmografickou metodou na ocase, ověřenou v minulosti v naší laboratoři (Heller and Hellerová, 1998). Ve věku 50 a 80 dnů byla zvířata individuálně umístěna do metabolických klecí, byl jim po dobu 24 hodin měřen příjem tekutin, výdej moči a stejně tak i proteinurie.

Na konci pokusu (90.den) byla zvířata zvážena a anestetizována thiopentalem sodným (50 mg kg^{-1}), poté byl měřen střední arteriální tlak (MAP) přímým měřením v karotické arterii a zaznamenáván automatizovaným systémem sběru dat PowerLab (ADInstruments). Ledviny a srdce byly rychle vyňaty a zváženy. Poměry váha/ledviny (KW)/ váha těla (BW) a váha srdce (HW)/ BW byly použity jako ukazatelé orgánové hypertrofie. Kůra pravé ledviny a levé komory byla zmrazena v tekutém dusíku pro stanovení ET-1 za pomoci enzymaticky-vázaného imunorbent assay test (ELISA) (Amersham, Braunschweig, Germany). Levá ledvina byla rychle vyňata, fixována 4% formaldehydem, vysušena a použita k morfologickému vyšetření. Parafinové řezy byly obarveny hematoxylinem/eosinem a PAS reakcí. Vzorky byly vyšetřeny slepou metodou. Jak již bylo dříve zmíněno (Yagil et al., 2002), 50 glomerulů bylo vyšetřeno semikvantitativním způsobem: stupeň 0 = všechny glomeruly v normě; stupeň 1 = 1 až 2 glomeruly postiženy; stupeň 2 = 2 ale <17 postižených glomerulů; stupeň 3 = 17 a více postižených glomerulů.

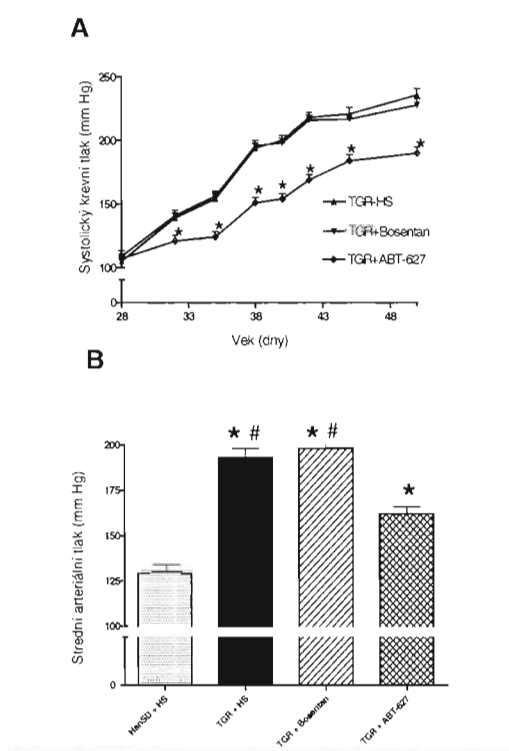
Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena za pomoci softwaru Graph-Pad Prism (Graph Pad Software). Získaná data byla vyšetřena pomocí dvoucestné ANOVA. Pro statistické porovnání výsledků získaných pro váhu srdce a ledvin a pro koncentrace ET-1 byla použita metoda jednocestná ANOVA. Pokud není uvedeno jinak, jsou výsledky uvedeny jako průměr \pm SEM, kde n představuje počet zvířat. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ($p < 0,05$).

C. Výsledky

TK

Hodnoty systolického TK (SBP) jsou zobrazeny do bodu, kdy přežívání potkanů bylo stále 100%. Po odstavení (29. den), začal SBP postupně růst u všech 3 skupin homozygotních TGR na vysokoslané dietě (obrázek 5A). Tento vzestup byl podobně rychlý u TGR samců na HS dietě, s nebo bez léčby bosentanem a dosáhl 236 ± 5 resp. 228 ± 5 mm Hg 50. den pokusu. Léčba selektivním blokátorem ET_A receptorů ABT-627 vedla k silnému zbrždění vzestupu SBP, které začalo už 32. den věku. Od 50. dne byl SBP významně nižší ve skupině TGR léčených ABT-627 (190 ± 5 mm Hg) ve srovnání s TGR potkany bez (236 ± 5 mm Hg, $P < 0,01$) nebo s léčbou bosentanem (228 ± 5 mm Hg, $P < 0,01$). Statisticky významný rozdíl mezi MAP na konci experimentu (90. den) mezi samčími TGR na HS dietě s nebo bez léčby bosentanem (193 ± 5 proti 198 ± 5 mm Hg) nebyl prokázán (obrázek 5B). S léčbou ABT-627 byl MAP významně nižší (30 ± 3 mm Hg, $P < 0,05$) než u neléčených TGR, ale neklesl až k hodnotám nalezeným u HanSD (129 ± 4 mm Hg).

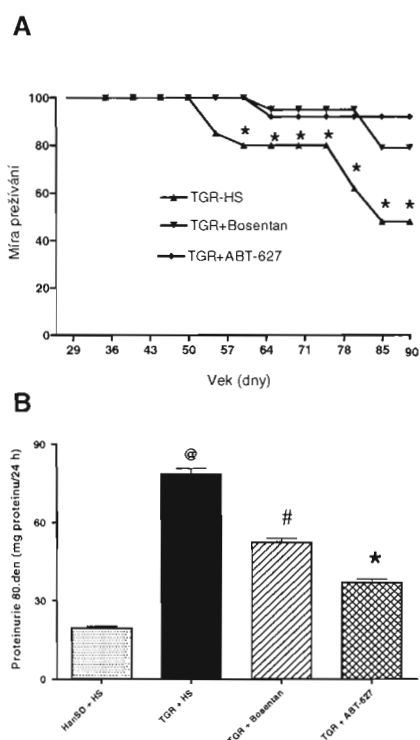


Obrázek 5

Systolický krevní tlak během pokusu (A) a střední krevní tlak na konci experimentu (B) u HanSD (-/-) a u Ren-2 transgenních potkanů (TGR, +/-) na vysokoslané dietě (HS). * $P < 0,01$ proti neoznačeným hodnotám, # $P < 0,05$ proti všem ostatním hodnotám.

Stupeň přežívání

Všichni HanSD samci na vysokoslané dietě přežili až do konce experimentu. Od 50. dne vyvolával vysokoslaný režim podstatný a stále se zvyšující vzestup mortality u neléčených zvířat, s mírou přežívání pouze 48 % 90. den (obrázek 6A). Jak léčba bosentanem tak léčba ABT-627 snižovala mortalitu homozygotních zvířat krmených vysokoslanou dietou s mírou přežívání 79 % resp. 92 % ($P < 0,01$), se statisticky významnějším účinkem ABT-627 ($P < 0,05$).



Obrázek 6

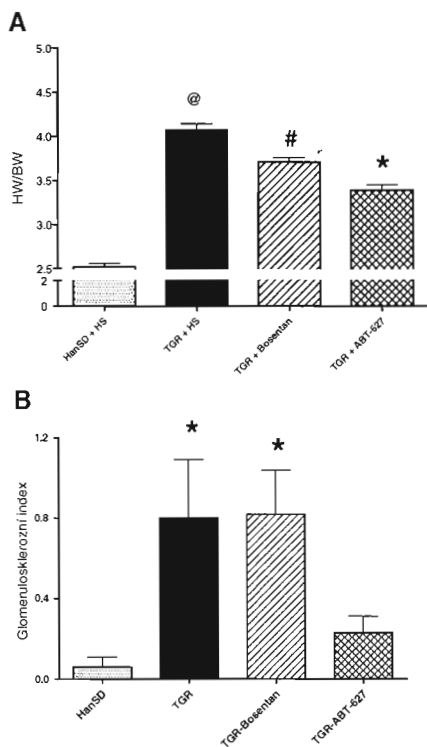
Míra přežívání během experimentu (A) a proteinurie ve věku 80 dnů (B) u homozygotních samčích Ren-2 transgenních potkanů (TGR;+/+) ve srovnání s HanSD (-/-) na vysokoslané dietě (HS). * $P < 0,01$ proti neoznačeným hodnotám, # $P < 0,01$ proti ABT-627, @ $P < 0,01$ proti ostatním hodnotám.

Hmotnost těla a ledviny

Všechny přežívající homozygotní TGR skupiny přibíraly na hmotnosti do 6. až 7. týdne věku; poté zůstala tělesná hmotnost stabilní do konce experimentu. U HanSD hmotnost stoupala postupně a byla statisticky významně vyšší ve srovnání s homozygotními TGR. Nebyly zjištěny rozdíly v poměru hmotnost ledviny/tělo mezi jednotlivými experimentálními skupinami (data neprezentována).

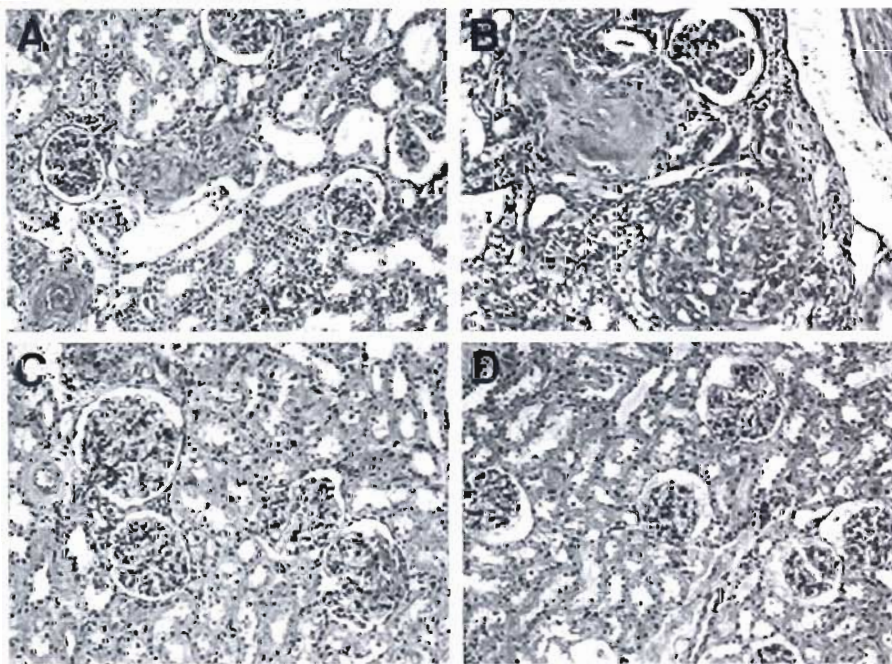
Proteinurie

Protože nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v proteinurii mezi skupinami ve věku 50 dnů, nejsou výsledky prezentovány. Ve věku 80 dnů mají HanSD potkani na vysokoslané dietě významně nižší stupeň proteinurie než všechny skupiny TGR (obrázek 6B). Neléčení TGR krmení HS prokázali 4x větší proteinurii ve srovnání s kontrolními HanSD zvířaty ($78,4 \pm 2,3$ proti $19,4 \pm 0,9$ mg/24 hodin; $P < 0,01$). Léčba bosentanem částečně snížila proteinurii, zatímco léčba ABT-627 zřetelně proteinurii zlepšila ($52,4 \pm 1,6$ resp. $36,8 \pm 1,4$ mg/24 hodin, oba $P < 0,01$).



Obrázek 7

Hmotnost levé srdeční komory (A) a glomerulosklerózní index (B) u homozygotních Ren-2 transgenních potkanů (TGR;+/+) ve srovnání s HanSD (-/-) na vysokoslaném příjmu (HS) *P< 0,01 oproti neoznačeným hodnotám, #P< 0,01 oproti ABT-627, @ P< 0,01 oproti všem ostatním hodnotám.



Obrázek 8

Reprezentativní histologické preparáty z ledvin HanSD potkanů (A) a z homozygotních Ren-2 transgenních potkanů na vysokoslané dietě bez (B) nebo s léčbou neselektivním endotelinovým antagonistou bosentanem (C) nebo selektivním antagonistou ET_A receptorů ABT-627 (D), všechny preparáty barveny PAS, zvětšeno 20x.

Hypertrofie levé srdeční komory

Poměr hmotnosti levé srdeční komory k hmotnosti těla byl statisticky významně zvýšen u všech homozygotních TGR na vysokoslané dietě ve srovnání s kontrolními HanSD potkany na stejné dietě (HS) (Obrázek 7A). U neléčených TGR vzrostl na $4,07 \pm 0,07$, tedy na úroveň o 63% vyšší než u HanSD. Léčba bosentanem vedla k podstatnému snížení LW/BW poměru ($3,71 \pm 0,01$). S ABT-627 byl rozvoj hypertrofie levé srdeční komory významně zpomalen (LW/BW $3,39 \pm 0,06$; $P < 0,01$).

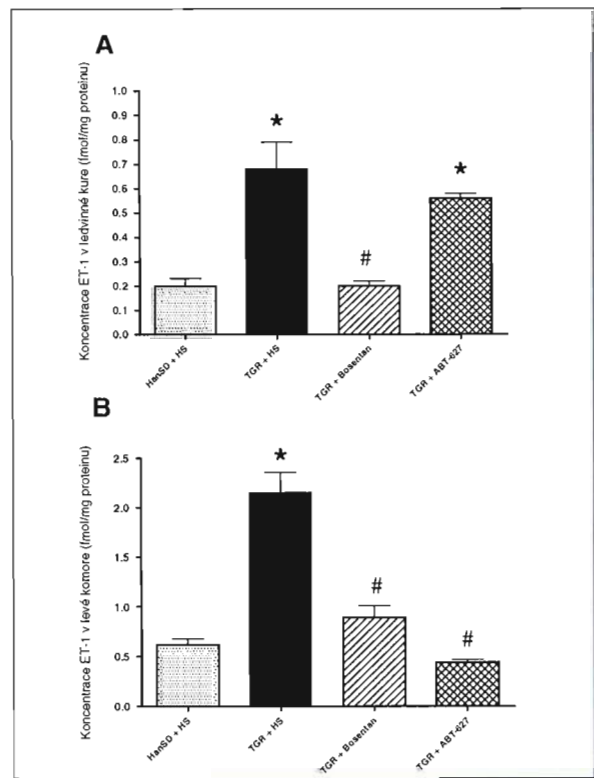
Glomeruloskleróza

Na základě histologických změn byly spočteny míry glomerulosklerózy, které jsou prezentovány na Obrázku 7B. Obrázky od 8A po 8D ukazují morfologické změny ledvinného postižení. U HanSD na HS dietě nebyly prokázány známky postižení ledvin, pouze byly popsány fokálně segmentální známky glomerulární sklerózy. Oproti tomu glomeruly homozygotních TGR na vysokoslané dietě prokazovaly známky pokročilé sklerózy a rozšířené vaskulární sklerózy. Glomerulosklerózní index u TGR na HS dietě byl výrazně zvýšen ve srovnání s HanSD. Glomerulosklerózní indexy u homozygotních TGR bez nebo s léčbou bosentanem byly téměř stejné, cévní změny byly o něco menší u TGR s léčbou bosentanem. Toto ledvinné postižení bylo však podstatně zmenšeno u ABT-627, kde nebyly popsány změny cév a glomerulů, a tak se histologické změny podobaly obrazu u HanSD.

Tkáňové koncentrace ET-1

Jak ukazuje Obrázek 9A, hladiny ET-1 v ledvinné kůře u homozygotních TGR samců na HS dietě 4x převýšily hodnoty HanSD na stejné dietě ($0,68 \pm 0,11$ proti $0,22 \pm 0,03$ fmol/mg proteinu $P < 0,05$). Po léčbě bosentanem se obsah ET-1 u TGR snížil na úroveň HanSD ($0,20 \pm 0,02$ fmol/mg proteinu), zatímco po léčbě ABT-627 se obsah ET-1 snížil pouze mírně pod hodnoty pozorované u neléčených TGR ($0,56 \pm 0,02$ fmol/mg proteinu, nevýznamné).

Obsah ET-1 v levé komoře u neléčených homozygotních TGR krměných HS dietou byl 4x větší než u HanSD ($2,15 \pm 0,21$ proti $0,62 \pm 0,06$, $P < 0,05$) (Obrázek 9D). Jak léčba bosentanem tak i ABT-627 významně snížila tyto hodnoty na úroveň HanSD ($0,89 \pm 0,12$ resp. $0,42 \pm 0,03$).



Obrázek 9

Koncentrace endotelinu-1 v ledvinné kůře (A) a v levé srdeční komoře (B) u HanSD potkanů (-/-) a u homozygotních Ren-2 transgenních potkanů (TGR;+/+) na vysokoslané dietě (HS) bez nebo s léčbou bosentanem nebo ABT-627. * $P < 0,01$ proti neoznačeným hodnotám; $P < 0,05$ proti neléčeným TGR.

D. Diskuse

Dle našich znalostí je toto první studie, která hodnotí účinky časně léčby pomocí blokády selektivních ET_A receptorů proti blokádě neselektivních ET_A/ET_B receptorů u homozygotních TGR na HS. Nedávno jsme prokázali, že blokátor neselektivních ET_A/ET_B receptorů bosentan zřetelně zlepšil míru přežívání a zmenšil poškození cílových orgánů u samčích homozygotních TGR bez snížení TK (Dvořák et al., 2004). Tato studie rozšiřuje tyto nálezy o snahu vyšetřit roli ET_A receptorů v patogenezi a léčbě poškození cílových orgánů při podávání HS diety. Jak bosentan tak ABT-627 prokazatelně zlepšují míru přežívání homozygotních TGR. Ale pouze léčba pomocí ABT-627 statisticky významně snižuje TK. Navíc zatímco blokáda neselektivních ET receptorů byla pouze mírně účinná v ochraně srdce a ledvin, blokáda selektivních ET_A receptorů prokázala významné nefroprotektivní a kardioprotektivní účinky, redukovala proteinurii, glomerulosklerózní index a hypertrofii levé komory. Rozdíl mezi účinností ABT-627 a bosentanem by bylo možné zpochybnit, protože by se mohlo jednat o problém účinnosti. Bylo však prokázáno, že ABT-627 jako antagonist ET receptorů je účinnější než bosentan a že jejich účinnost je hodně ovlivněná vazbou na sérový albumin (Wu-Wong et al., 1996, Wu-Wong et al., 1997). Ačkoli jsme zatím nezjišťovali účinnost ABT-627 u TGR, dávka používaná v našich experimentech je obecně přijímaná a ověřená jinými autory (D'Angelo et al., 2005, Opgenorth et al., 1996), ačkoliv obě vyšší dávky (35 a 70 mg na kg a den) (Blezer et al., 1999) a dokonce i nižší dávka (2 mg na kg a den) (Ballew et al., 2001) byly již použity. Protože vyšší dávky mohou mít nespécifické vedlejší účinky, lze lepšího účinku dosáhnout střední dávkou (Blezer et al., 1999). V případě bosentanem jsme již dříve provedli experimenty u homozygotních TGR potkanů a HanSD, u kterých dávka bosentanem (100 mg na kg a den) zcela zablokovala reakci krevního tlaku na intravenózní bolusové podání ET-1 ((250 ng) (Dvořák et al., 2004). Tato dávka se podobá těm, které podávali jiní autoři (Muller et al., 2000, Rossi et al., 2000, Seccia et al., 2003).

Naše současné výsledky jsou v souladu s našimi předchozími zjištěními, že neselektivní blokáda ET receptorů bosentanem zlepšovala stupeň přežívání, ale neměla účinek na průběh hypertenze u homozygotních (Dvořák et al., 2004) nebo heterozygotních TGR (Rossi et al., 2000, Rothermund et al., 2003). Ke stejnému závěru došli Karam et al. (1996), kteří rovněž prokázali renoprotektivní působení bosentanem nezávislé na snížení krevního tlaku. Ohledně role blokátorů ET_A selektivních receptorů existují rozporuplné údaje. Zatímco někteří autoři zjistili, že blokáda ET_A receptorů snižuje krevní tlak u různých hypertenzních modelů jako

např. Sabra sůl-senzitivní potkan (Rothermund et al., 2003), DOCA-salt potkani (Allcock et al., 1998), salt-loaded SHR-SP (Okada et al., 1995) nebo potkani transgenní pro lidský angiotenzinogenní a reninový gen (Bohlender et al., 2000), Rothermund et al. (2003) nenalezli ochranné působení ET_A blokády u heterozygotních Ren-2 zvířat. Ačkoli jsou jejich výsledky zcela opačné od našich, lze je vysvětlit odlišným načasováním experimentů, odlišným věkem zvířat či užitím heterozygotních namísto homozygotních zvířat. Zaprvé, zatímco my jsme začali s léčbou okamžitě po odstavení zvířat, jejich výsledky pocházejí ze zvířat starých 10 až 30 týdnů. Navíc Blezer et al. (1999) zjistili u stroke-prone SHR potkanů, že časná blokáda na rozdíl od pozdní blokády bránila rozvoji edému mozku, snižovala TK a proteinurii s prodlužováním míry přežívání. Je tak možné, že pouze časná blokáda ET_A receptorů je efektivní v omezení poškození cílových orgánů. Konstatování, že ET hraje roli v patogenezi hypertenze a proteinurie, ale nepodílí se na udržování poškození cílových orgánů, však vyžaduje další ověření. Zadruhé, rozdíl mezi heterozygotními a homozygotními zvířaty pravděpodobně spočívá v tíži hypertenze, která je spojena s vyšší produkcí ET-1 u homozygotních zvířat (Opočenský et al., 2004). Whitworth a kol. (1995) prokázali, že pouze heterozygotní zvířata s těžkou hypertenzí mají významně vyšší expresi preproET-1 mRNA v tkáni ledviny ve srovnání s potkany s benigní hypertenzí. Kromě toho pouze u těchto modelů maligní hypertenze, u kterých byly prokázány zvýšené plazmatické hladiny ET-1, má ET_A receptorová blokáda hypotenzní efekt, který naznačuje roli ET u tohoto onemocnění (Nishikibe et al., 1993). Zatřetí, ačkoli to není příliš pravděpodobné, nelze zcela vyloučit, že rozličné ET_A blokátory mohou mít různé účinky.

Úloha ET v patogenezi poškození cílových orgánů se jeví jako zcela jasná, protože jak bosentan tak ABT 627 významně snížily celkovou míru přežívání. Existují však přesto vzájemně si odporující údaje ohledně nefroprotektivity a kardioprotektivity ET_A receptorové blokády. Prospěšné účinky byly zjištěny u potkanů se srdečním selháním (Sakai et al., 1996), u Sabra sůl-senzitivní hypertenze (Rothermund et al., 2003) nebo u stroke-prone SHR (Orth et al., 1998), zatímco Rothermund et al. (2003) nebo Rossi et al. (2000) neprokázali prospěšný vliv u Ren-2 modelů. Kromě faktu užití heterozygotních místo homozygotních zvířat nejsme schopni podat uspokojivé vysvětlení k těmto odlišnostem, navíc Rossi et al. (2000) použili zvířata stejného stáří jako my.

Prospěšný účinek ET_A receptorové blokády lze jednoznačně dokázat na našich histologických nálezech. Nejpozoruhodnější změny jsme prokázali v cévním řečišti. Jsou charakterizovány

hyalinní sklerózou aferentní arterioly a fibrotickým ztluštěním intimy preglomerulárních arterií způsobenou hypertrofií a hyperplazií buněk hladké svaloviny. Rozsah glomerulárních změn byl přímo úměrný závažnosti cévních změn. Glomerulární strukturální změny byly od stupně lehkého zvlnění bazální membrány po střední expanzi mezangiální matrix po úplný kolaps glomerulu a sklerózu. Léčba bosentanem lehce zmenšila cévní poškození, ale výrazněji nezmenšila glomerulosklerózní index, zatímco léčba ABT-627 plně ochránila parenchym ledviny od hypertenzního poškození.

Stále však zůstává aktuální otázka, proč existuje mezi selektivní a neselektivní blokádou ET receptorů rozdíl v účinnosti působení na TK a jakým mechanismem k tomuto rozdílu dochází. Možným vysvětlením je rozdílné působení ET-1 na ET_A a ET_B receptorech a jejich blokátorů na molekulární úrovni. Zatímco vazba jak ABT-627, tak i ET-1 vede k částečné internalizaci receptoru, tak pouze ET-1 je schopen vyvolat intracelulární funkční odpověď (Chiou et al., 2000). Navíc v potkanních aortálních kroužcích je pouze ABT-627 schopen zabránit ET-1 indukovatelnou kontrakci. Přesto však zůstává otázkou, jestli tato pozorování vysvětlují správně naše nálezy. Zvláště s ohledem na vysokoslaný příjem je potřeba myslet na přídatnou roli ET_B receptorů, které váží a odstraňují ET-1 z cirkulace, a tak redukuje ET_A receptorovou aktivaci.

Také Pollock and Pollock (2001) u Sprague-Dawley potkanů prokázali, že ET_B receptorová blokáda vedla ke vzestupu středního arteriálního tlaku, který byl významně vyšší u potkanů na vysokoslané dietě. Tito autoři vyslovili hypotézu, že odpovědí na nálož soli se ET podílí na regulaci TK cestou ET_B receptorů. Je možné tedy předpokládat, že neselektivní blokáda nejen omezuje škodlivé působení ET_A receptorů, ale zároveň škodí blokádou prospěšného vazorelaxačního působení ET_B receptorů, který je zprostředkován uvolňováním oxidu dusnatého a prostaglandinů (de Nucci et al., 1988). Otázka je ale ještě komplikovanější, neboť zaprvé: byly identifikovány 2 různé ET_B receptory (Gellai et al., 1996, Just et al., 2004) (ET_{B1} na cévním endotelu působí vazodilataci, zatímco ET_{B2} na hladkých svalových buňkách zprostředkovává vazokonstrikci) a zadruhé: různé působení těchto receptorů je popisováno u různých živočišných druhů (Gellai et al., 1996, Brooks et al., 1994, Cirino et al., 1997) (na rozdíl od ostatních druhů např. Brooks neprokázal u psů ET_{B2} zprostředkovanou vazokonstrikci). Navíc Just et al. (2004) uvažovali o tom, že neexistuje pouze duální působení (konstrikční a vazodilatační působení) ET_B receptorů, ale že rovněž jejich vzájemná interakce s ET_A receptory určuje jejich fyziologickou funkci. Toto téma vyžaduje ještě další zkoumání.

E. Závěr

Shrneme-li výše uvedené nálezy vychází z toho závěr, že ET systém může být aktivován druhotně po aktivaci renin-angiotenzinového systému. ET-1 hraje zřejmě hlavní roli v kardiovaskulárním a ledvinném poškození pouze za podmínek těžké hypertenze nebo zevně podmíněným zvýšením ANG II, kdy ET-1 exprese je stimulována a vede k významné navýšení jeho tkáňové koncentrace. Navíc naše výsledky jednoznačně ukazují, že selektivní blokáda ET_A receptorů svými účinky převyšuje neselektivní ET_A/ET_B receptorovou blokádu jejím působením na zmírnění hypertenze, hypertenzního orgánového poškození a míry přežívání.

F. Perspektivy

Zatím ještě není jednoznačně objasněno, zda prospěšný vliv časně selektivní ET_A blokády na krevní tlak a poškození cílových orgánů pozorovaný u homozygotních Ren-2 transgenních potkanů na HS dietě bude rovněž patrný u zvířat s již fixovanou hypertenzí. Tato otázka spolu s podílem ET_B receptorů na regulaci TK vyžaduje další zkoumání. Při uvažování nad terapeutickými důsledky našich zjištění lze konstatovat, že selektivní ET_A blokáda by měla mít přednost před neselektivní blokádou při ochraně před hypertenzí a jejími orgánově vázanými důsledky.

8. Studie č. 2

Pozdní blokáda endotelinových A receptorů redukuje rozsah podocytárního poškození u homozygotních Ren-2 transgenních potkanů přes závažnou hypertenzi

Cíl studie:

Nedávno jsme u homozygotních hypertenzních Ren-2 transgenních samců (TGRs) krmených vysokoslanou dietou prokázali, že časné podávání selektivních blokátorů endotelinových (ET) receptorů A (ET_A) nebo neselektivních blokátorů ET_A/ET_B receptorů zlepšuje přežívání a zmenšuje proteinurii, glomerulosklerózu a srdeční hypertrofii, zatímco selektivní ET_A blokáda zároveň významně snižuje vzestup krevního tlaku. Je prokázáno, že antihypertenzní terapie je účinnější, pokud se s ní začne v raném věku. Naše práce měla prokázat, zda blokáda ET receptorů zahájená v pozdějším věku u zvířat s již přítomnou hypertenzí bude mít podobný ochranný účinek jako má časně zahájená léčba.

A. Úvod

Hypertenzní kmen transgenního potkana pro Ren-2 reninový gen [TGR], označený TGR[mRen2 J27] (Mullins JJ et al., 1990) je cenný monogetický model renin-dependentní a tedy i angiotenzin II (ANG II) dependentní hypertenze, charakteristický typickými rysy maligní hypertenze, jako je snížení glomerulární filtrace a proteinurie spojená s glomerulosklerózou (Bachman et al., 1992, Rothermund et al., 2003). Tento model navíc vykazuje významnou sůl-senzitivní složku (Callahan et al., 1996).

Endotelin (ET)-1 je známý jako jeden z nejsilnějších vazokonstriktorů (Yanagisawa et al., 1988; Maguire et al., 2002) a také mitogenů in vivo i in vitro (Hirata et al., 1989). Prospěšné účinky blokátorů ET receptorů na redukcii poškození cílových orgánů bývají připisovány jejich antiproliferativnímu poškození (Mohacsi et al., 2004). Četné studie prokázaly, že ET systém hraje důležitou roli v patogenezi vysokého krevního tlaku (TK) u sůl-senzitivních modelů hypertenze spolu s průvodným poškozením cílových orgánů (Roux et al., 1999). Za škodlivými vlivy ET-1 v rozvoji hypertenze stojí zřejmě aktivace ET A (ET_A) receptorů, zatímco role ET B (ET_B) receptorů spočívá ve zprostředkování periferní vazorelaxace a renální tubulární natriurézy. Neselektivní blokáda proto inhibuje nejenom nepříznivé vlivy ET-1 zprostředkované ET_A receptory, ale zároveň blokuje antihypertenzní účinky zprostředkované ET_B receptory. A protože do dnešního dne jsou dostupná pouze rozporuplná

data týkající se blokády selektivních ET_A a neselektivních $ET_{A/B}$ receptorů, je nutné objasnit relativní přínos selektivní proti neselektivní blokádě ET receptorů.

Několik na sobě nezávislých studií ukazuje, že ANG II stimuluje uvolňování ET-1. Navíc je známo, že ET systém hraje důležitou roli v patogenezi hypertenze a průvodného poškození cílových orgánů u sůl-dependentních a ANG II-dependentních modelů hypertenze vyvolaných exogením podáním Ang II (Moreau et al., 2003).

Sůl v potravě hraje důležitou roli v patogenezi hypertenze nejen u lidí (Weinberger MH, 1996), ale i u sůl-senzitivních modelů hypertenze (Dahl et al., 1968). Z jedné strany tedy zvýšený příjem sodíku vyvolává škodlivé důsledky a vede k dysfunkci endotelu cév, který přes uvolnění ET-1 přispívá k cévním změnám nalezeným u na sůl-citlivé hypertenze, na druhou stranu však selektivní blokáda ET_A receptorů snižuje TK především u sůl-dependentních modelů hypertenze (Schiffrin EL, 2002). Navíc přibývají důkazy pro to, že vysoký příjem soli má podstatný účinek na ET_B receptory tím, že podporuje vyšší vylučování sodíku z těla (Vassileva et al., 2003).

Proteinurie může být způsobena poškozením podocytů, které za normálních podmínek udržují neporušenou filtrační bariéru a kontrolují složení glomerulární bazální membrány (GBM) (Pavendstadt et al., 2003), fungování endoteliálních buněk a samotné GBM. Poškození podocytů bývá popisováno u mnohých typů proteinurií provázených ledvinnými chorobami, včetně nefrotického syndromu, diabetické nefropatie a lupusové nefritidy (White et al., 2004, Hayden et al., 2005). Pouze několik studií studovalo význam podocytárního poškození u experimentální hypertenzní glomerulopatie (Nagasse et al., 2006).

V naší předchozí studii jsme ukázali, že časná léčba bosentanem, neselektivním antagonistou ET_A/ET_B receptorů, a atrasentanem, selektivním blokátorem ET_A receptorů, zlepšila přežívání a zmenšila stupeň poškození cílových orgánů u homozygotních TGR samců krmených vysokoslanou dietou (HS), ale pouze atrasentan zamezil vzestupu TK (Vaněčková et al., 2005). Je dobře známo, že mladá zvířata jsou vnímavější k hypertenzním stimulům než dospělá zvířata (Zicha and Kunes, 1999), proto intervence uskutečněná v časném věku bývají obvykle účinnější (Blezer et al., 1999).

V této studii bylo naším cílem za prvé zjistit, zda selektivní ET_A nebo neselektivní $ET_{A/B}$ receptorová blokáda u homozygotních TGR samců na vysokoslané dietě bude mít podobný

ochranný účinek na přežití, poškození cílových orgánů a TK na dospělé potkany s fixovanou hypertenzí jako měla časná blokáda u mladých potkanů před vzestupem TK a za druhé, zda selektivní ET_A receptorová blokáda je za těchto experimentálních podmínek účinnější než neselektivní blokáda ET_A/ET_B receptorů.

B. Experimentální část

Protokoly v této studii jsou v souladu s Metodikou péče a užívání laboratorních zvířat a jsou schválené Českým výborem pro péči o zvířata (protokol 79/2001 a 923/2003).

Zvířata

Homozygotní TGR samci a jejich normotenzní kontroly kmene Hannover Sprague-Dawley (HanSD) byli chováni při teplotě 25°C s 12 hodinovým cyklem světlo/tma a měli volný přístup ke krmivu a vodě. Všechna zvířata používaná v této studii byla chována v Centru experimentální medicíny Institutu experimentální a klinické medicíny, kam byla dodána z Max Delbrück Centra molekulární medicíny (Berlín, Německo).

Vlastní experiment

Ve věku 51 dnů začali být HanSD a 3 skupiny TGR krmeni HS dietou (2% NaCl). Ve stejné době 1. skupina TGR dostávala placebo (neléčení TGR), 2 další skupiny TGR potkanů byly léčeny buď neselektivním blokátorem ET_A/ET_B receptorů bosentanem (Actelion) nebo blokátorem selektivních ET_A receptorů atrasentanem (ABT-627; Abbott]. Bosentan byl přidán do stravy tak, aby jeho celkové množství ve stravě odpovídalo 100 mg kg⁻¹ den⁻¹ (Roux et al., 1999). Tato dávka byla naší laboratoří již dříve stanovena jako dostatečná pro efektivní blokádu ET receptorů (Dvořák et al., 2004). Atrasentan byl přidán do pitné vody, dávka byla přizpůsobena tak, aby odpovídala 5 mg kg⁻¹ den⁻¹ (Mulder et al., 2000), která byla označena různými výzkumníky jako dostatečná k účinné blokádě ET_A receptorů (Opgenorth et al., 1996, D'Angelo et al., 2005).

Následně byly vyšetřovány tyto experimentální skupiny:

- samci HanSD na vysokoslané dietě HS (n = 14);
- samci TGR + HS, neléčení (n = 18);
- samci TGR + HS + bosantan (n=14);
- samci TGR + HS + atrasentan (ABT-627; n=24).

Určení TK, proteinurie a tělesné váhy

Od 32. dne byli potkani váženi a byl jim 1x týdně měřen systolický tlak pletysmografickou metodou na ocase ověřenou v minulosti v naší laboratoři (Heller and Hellerová, 1998). Ve věku 50 a 80 dnů byla zvířata individuálně umístěna do metabolických klecí, byl jim po dobu 24 hodin měřen příjem tekutin a výdej moči, rovněž proteinurie. Bílkoviny v moči byly stanoveny pomocí biuretové metody (Lachema).

Na konci pokusu (90.den) byla zvířata zvážena a anestetizována thiopentalem sodným (50 mg kg⁻¹), poté byl měřen střední arteriální tlak (MAP) přímým měřením v karotické arterii a zaznamenáván automatizovaným systémem sběru dat PowerLab (ADInstruments). Ledviny a srdce byly rychle vyňaty a zváženy. Poměry váha/ledviny (KW)/váha těla (BW) a váha srdce (HW)/BW byly použity jako ukazatelé orgánové hypertrofie.

Stanovení tkáňových koncentrací ET-1

Tkáň levé srdeční komory a kůry pravé ledviny byly zmrazeny tekutým dusíkem a byla v nich stanovena koncentrace ET-1 Elisou (Amersham).

Histologické vyšetření

Levá ledvina byla rychle vyňata, fixována 4% formaldehydem, vysušena a zalita. Parafinové řezy byly obarveny hematoxylinem/eosinem a PAS reakcí a vyšetřeny za pomoci světelného mikroskopu Nikon Eclipse E 600. Řezy byly vyšetřovány zaslepeným způsobem. Jak již dříve bylo popsáno, bylo náhodně vybráno 100 glomerulů v každé skupině, které byly zhodnoceny za pomoci semikvantitativní škály (stupeň 0: normální glomeruly; stupeň 1: sklerotická plocha ≤ 25% celkové glomerulární plochy nebo zřetelné adheze mezi kapilárním trsem a Bowmanovým pouzdrem; stupeň 2: sklerotická plocha mezi 25% až 50%; stupeň 3: sklerotická plocha mezi 50% až 75%; stupeň 4: sklerotická plocha 75% až 100% z celkové glomerulární plochy. Glomerulosklerózní index (GSI) byl vypočítán podle vzorce: $GSI = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4$, kde n_x je počet glomerulů v každém stupni glomerulosklerózy.

Elektronová mikroskopie a měření tloušťky GBM

Malé části kůry z formalinem fixovaných a v pararafinu zalitých ledvin byly vyňaty a vyšetřeny za pomoci elektronového mikroskopu. Z každé skupiny byla vyšetřena dvě zvířata. Vzorky byly zality v Epon 812. Ultratenké řezy byly obarveny uranyl acetatem a citratem olova. Preparáty byly vyšetřeny v elektronovém mikroskopu Philips EM 286/Morgagni (FEI Company). Hodnocení bylo provedeno dvěma nezávislými vyšetřujícími zaslepenou metodou. Tloušťka GBM byla měřena v 5 glomerulech na jednoho potkana a byl stanoven průměr z 50 měření na glomerulus. Byla měřena kolmá vzdálenost mezi okrajem endoteliální buňky k epiteliální buňce bazální membrány. Svráštělé oblasti GBM a zešikmené řezy byly z měření vyňaty. Měření GBM byla provedena za pomoci analýzy verze 3,2 (Build 765 Gmbh).

Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru Graph-Pad Prism (Graph Pad Software). Pro porovnání mezi skupinami byla použita dvoucestná ANOVA. Pro statistické porovnání výsledků pro HWs a KWs a pro koncentrace ET-1 byla použita metoda jednocestná ANOVA. Pro vztah mezi podocytárním poškozením a přežitím bylo použito hodnocení pomocí metody nejmenších čtverců lineární regrese analýzy. Pokud není uvedeno jinak, jsou výsledky uvedeny jako průměr \pm SEM, kde n představuje počet zvířat. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ($P < 0,05$).

C. Výsledky

Systolický a střední arteriální tlak

U HanSD potkanů zůstal SBP po celou dobu experimentu v pásmu normotenze (Obr. 10A). U třech TGR skupin rostl SBP od odstavu po věk 46 dnů. Těsně před nasazením vysokoslané diety tak dosáhl 51.den SPB $198,1 \pm 6,1$ mm Hg u neléčených potkanů, $201,0 \pm 5,4$ mm Hg u potkanů léčených bosentanem a $192,0 \pm 3,8$ mm Hg u potkanů léčených atrasentanem. 60.den věku byl SBP $198,6 \pm 5,5$ a $209,2 \pm 5,6$ mm Hg u neléčených a resp. bosentanem léčených TGR, zatímco léčba atrasentanem vedla k významně nižšímu SBP ($173,9 \pm 4,3$ mm Hg; $P < 0,05$), ale nedosáhla SBP HanSD potkanů ($151,3 \pm 5,5$ mm Hg). 81.den věku byl SBP $151,3 \pm 5,2$ mm Hg u HanSD potkanů a $210,8 \pm 3,4$, $210,7 \pm 8,5$ a $200,0 \pm 5,6$ mm Hg u přeživších neléčených, léčených bosentanem a léčených atrasentanem TGR potkanů. 90.den, na konci experimentu,

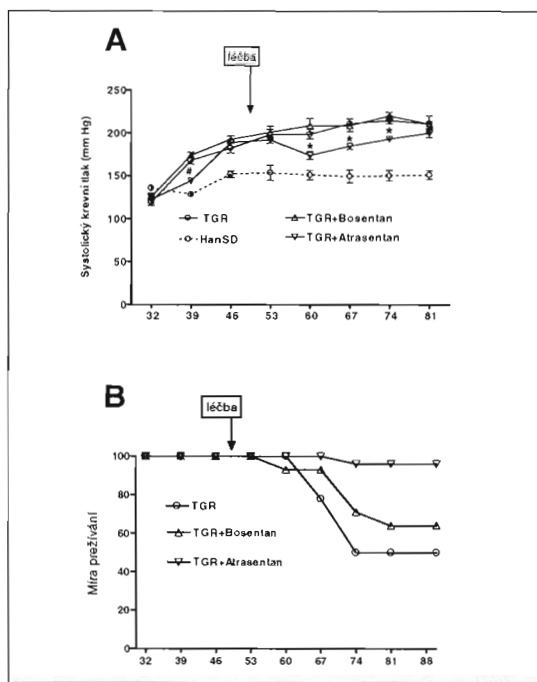
nebyl MAP odlišný u přežívajících HanSD, léčených bosentanem a léčených atrasentanem ($153,6 \pm 6,5$, $159,3 \pm 10,5$ a $165,3 \pm 5,2$ mm Hg). U neléčených TGR byl MAP vyšší $200,7 \pm 18,9$ mm Hg, ale statisticky se neodlišoval od ostatních skupin TGR.

Míra přežívání

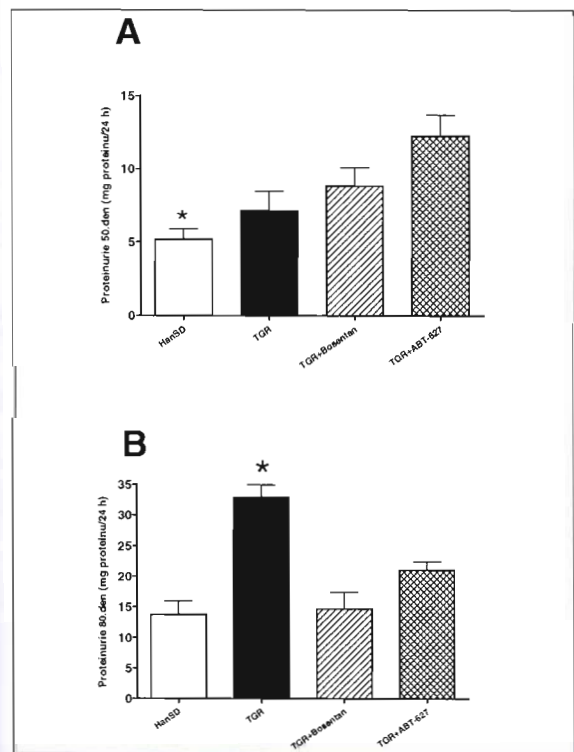
Míra přežívání u HanSD potkanů byla 93% a TGR léčených atrasentanem 96%, což bylo statisticky významně odlišné od neléčených a bosentanem léčených TGR ($P < 0,05$; obr.10B), kteří od 60., resp. 53.dne věku začali postupně umírat. Míry přežívání byly 50%, resp. 60% na konci experimentu.

Obrázek č.10

SBP (A) a míra přežívání (B) v průběhu experimentu u homozygotních Ren-2 TGR (+/+) samců na vysokoslané dietě. # $P < 0,01$ vs neoznačeným hodnotám, * $P < 0,05$ atrasentan (ABT-627) vs neléčeným nebo bosentanem léčeným TGR.



Proteinurie



Obrázek č.11: Proteinurie v 50.dni věku před léčbou (A) a v 80.dni věku (B) u homozygotních TGR (+/+) samců na vysokoslané dietě v průběhu léčby. # $P < 0,05$ vs kontrolní HanSD(-/-); # $P < 0,05$ vs neléčeným TGR.

Před léčbou nebyly v 50.dni věku zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v proteinurii mezi TGR skupinami (obrázek 11A). V 80.dni věku měli neléčení TGR významně vyšší proteinurii než HanSD potkani ($32,95 \pm 2,0$ proti $13,75 \pm 2,22$ mg proteinu za 24 hodin; $P < 0,05$; obrázek 11B). Jak bosentan, tak i atrasentan snížily proteinurii na úroveň kontrolních HanSD potkanů ($14,70 \pm 2,75$ resp. $21,06 \pm 1,38$ mg proteinu za 24 hodin; P hodnota nevýznamně odlišná).

Hmotnost těla (BW)

Během studie vážili HanSD potkani statisticky významně více než skupiny TGR potkanů. Mezi skupinami TGR potkanů byla nejnižší hmotnost těla u neléčených TGR, u kterých byl nejnižší váhový přírůstek od 39.dne věku. 90. den věku byla hmotnost HanSD potkanů ($354,3 \pm 8,2$ g) významně ($P < 0,01$) vyšší než neléčených a bosentanem léčených TGR ($227 \pm 18,1$ resp. $240,0 \pm 10,1$ g). U atrasentanem léčených TGR potkanů, byla hmotnost vyšší než v ostatních skupinách TGR potkanů ($310,7 \pm 5,7$ g; $P < 0,01$), ale nedosáhla hmotnosti HanSD potkanů.

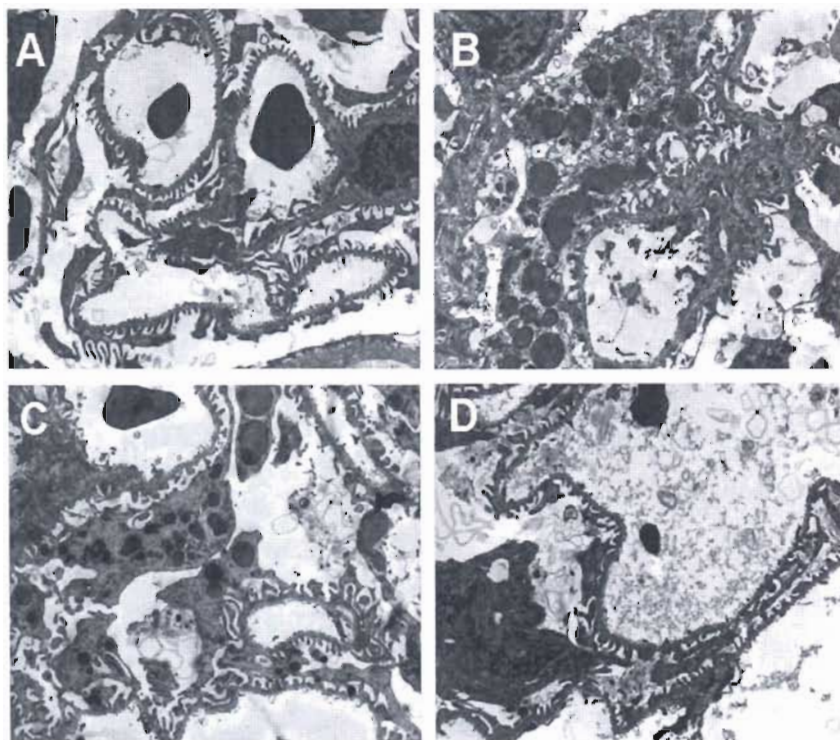
Relativní hmotnost srdcí (HWs) a ledvin (KWs)

U neléčených TGR byl poměr HW/BW $4,15 \pm 0,08$ ve srovnání s $3,13 \pm 0,09$ u HanSD potkanů ($P < 0,01$), ale jeho zvýšení bylo významně zabráněno léčbou bosentanem i atrasentanem

($3,67 \pm 0,04$ resp. $3,61 \pm 0,06$; $P < 0,01$). Podobně poměr hmotnosti levé komory k hmotnosti těla byl $3,08 \pm 0,09$ u neléčených TGR proti $2,21 \pm 0,08$ u HanSD potkanů a jeho vzestupu bylo významně zabráněno jak léčbou bosentanem tak atrasentanem ($2,65 \pm 0,04$ resp. $2,58 \pm 0,06$; $P < 0,01$). Na konci pokusu nebyl zaznamenán rozdíl v poměru KW/BW mezi skupinami TGR potkanů ($4,74 \pm 0,18$, $4,62 \pm 0,2$ a $4,11 \pm 0,15$ postupně u neléčených, léčených bosentanem a potkanů léčených atrasentanem).

Glomerulosklerózní index

Na konci experimentu jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v glomerulosklerózních indexech mezi HanSD potkany ($0,149 \pm 0,016$) a přeživšími neléčenými ($0,152 \pm 0,024$), léčenými bosentanem ($0,140 \pm 0,018$) a atrasentanem léčenými TGR ($0,160 \pm 0,022$). Pozorovali jsme pouze mírné změny parenchymu ledviny a mírnou hyalinózu aferentních arteriol u všech 4 skupin potkanů. Postižení glomerulů se pohybovalo od lehkého zvlnění bazální membrány až po fokální mezangiální expanzi. Úplná destrukce glomerulu byla přítomna pouze výjimečně.



Obrázek č.12

Reprezentativní snímek z elektronového mikroskopu podocytů a GBM u HanSD potkanů (A), a neléčených (B) TGR, TGR léčených bosentanem (C) a TGR léčených atrasentanem (D) (zvětšení 4400krát).

Vyšetření elektronovým mikroskopem a měření GBM

Mezi jednotlivými skupinami byly pozorovány hlavní strukturální odchylky v tloušťce GBM a změny podocytů. V porovnání HanSD potkanů (Obrázek 12A) a TGR krmených HS dietou byly nalezeny nápadné glomerulární změny na ultrastrukturální úrovni, jako jsou nepravidelná zesílení, zvlnění a částečné přerušování GBM. Výběžky podocytů byly širší a nepravidelně splývaly. Ojedinele obsahovaly podocyty elektron-denzní zrnka a tukové kapénky ve své bazální části (Obrázek 12B). TGR léčení bosentanem vykázali pouze malý stupeň podocytárních abnormalit; splývání výběžků se téměř nevyskytovalo. Výběžky podocytů se zdály štíhlejší a delší. Výskytu lipidových kapének a vakuol v cytoplasmě podocytů bosentan nezabránil (Obrázek 12C). Podocyty zvířat léčených atrasentanem vykazovaly normální strukturu, byly pravidelně uspořádány (Obrázek 12D) a podobaly se kontrolním HanSD potkanům. U všech 4 skupin potkanů byla nalezena významná korelace ($P < 0,001$) mezi poškozením podocytů ($x = \text{GBM šířka}$) a stupněm přežívání ($y = 168 - 0,69x$; $r^2 = 0,7295$; $P < 0,0001$).

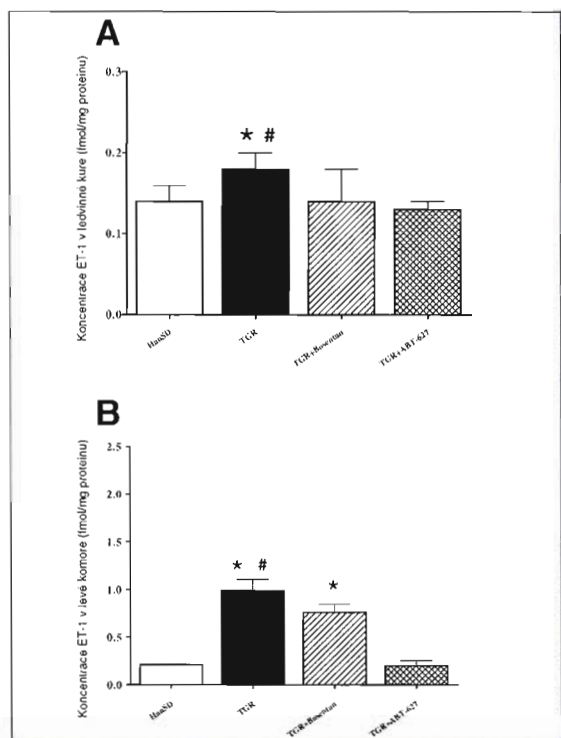
Šířka GBM v elektronovém mikroskopu byla u neléčených ($157,9 \pm 2,0$ nm) a bosentanem léčených TGR významně vyšší ($148,6 \pm 2,0$ nm) než u HanSD potkanů ($111,0 \pm 0,9$ nm). Nenalezli jsme významný rozdíl mezi TGR potkany léčenými atrasentanem a HanSD potkany ($115,2 \pm 1,1$ nm).

ET-1 tkáňové koncentrace

Ve srovnání s HanSD byl obsah ET-1 v kůře ledviny zvýšen u přežívajících neléčených TGR potkanů ($0,18 \pm 0,02$ proti $0,14 \pm 0,02$ fmol/mg proteinu; $P < 0,05$). U bosentanem a atrasentanem

léčených TGR byly kortikální koncentrace ET-1 podobné jako u HanSD potkanů ($0,14 \pm 0,04$ resp. $0,13 \pm 0,01$ fmol/mg proteinu (obrázek 13A).

U neléčených TGR převýšila koncentrace ET-1 v srdeční komoře 4x jeho koncentraci u HanSD potkanů ($0,99 \pm 0,12$ proti $0,21 \pm 0,02$ fmol/mg proteinu; $P < 0,05$). U bosentanem léčených TGR koncentrace ET-1 v levé komoře byla mírně ale statisticky významně snížena na $0,76 \pm 0,09$ fmol/mg proteinu ($P < 0,05$) ve srovnání s neléčenými TGR, zatímco u atrasentanem léčených TGR byla koncentrace $0,20 \pm 0,06$ fmol/mg proteinu, a byla tak srovnatelná s HanSD potkany (obrázek 13B).



Obrázek 13

ET-1 koncentrace v ledvinné kůře (A) a levé srdeční komoře (B) u HanSD potkanů (-/-) a u homozygotních Ren-2 TGR potkanů (+/+) na vysokoslané dietě bez nebo s léčbou bosentanem nebo atrasentanem (ABT-627). * $P < 0,05$ proti normotenzním HanSD ($P < 0,05$) proti neléčeným TGR (+/+).

D. Diskuse

U homozygotních Ren-2 transgenických potkanů s již rozvinutou hypertenzí nebyly dosud účinky farmakologické blokády ET systému studovány. V této studii jsme se tedy zabývali dvěma otázkami: (1) má ET receptorová blokáda podobný ochranný účinek na hypertenzi, poškození cílových orgánů a přežívání homozygotních TGRs na vysokoslané dietě i pokud se s ní začne až v pozdějším období života podobně jako tomu je, pokud se tak aplikuje po odstavu a (2) je účinnější neselektivní ET_A/ET_B nebo selektivní ET_A receptorová blokáda?

Je všeobecně přijímáno, že zvýšený dietní příjem sodíku zapříčiňuje hypertenzi u sůl-citlivých lidí a zvířat a vyvolává endotelovou dysfunkci prostřednictvím zvýšené produkce ET-1, která

může být stimulována Ang II. Ačkoli by zvýšený příjem sodíku měl snížit tvorbu Ang II, naše předchozí pokusy ukázaly, že se plazmatické hladiny a množství Ang II v ledvinách u bdělých TGR samců ve věku 32 až 90 dnů, nezmenšují (Vaněčková et al., 2005). A tak uzavíráme, že aktivovaný cirkulující a tkáňový renin-angiotenzinový systém u bdělých TGR není modulován nebo resp. není ovlivnitelný změnami v rovnováze sodíku. Dále předpokládáme, že u TGR by mohl zvýšený plazmatický a renální ANG II zvýšit produkci ET-1, což by mohl být jeden z možných mechanismů podílejících se na rozvoji hypertenze a/nebo orgánového poškození u TGR samců.

Nedávno jsme prokázali (Vaněčková et al., 2005), že jak léčba neselektivním blokátorem ET_A/ET_B receptorů bosentanem, tak i selektivním blokátorem ET_A receptorů atrasentanem, zřetelně zlepšuje přežívání homozygotních TGR, pokud je zahájena okamžitě po odstavu a že atrasentan na rozdíl od bosentanu navíc i statisticky významně snižuje krevní tlak. Navíc selektivní ET_A blokáda má podstatné nefroprotektivní a kardioprotektivní účinky, které převyšují účinky neselektivní blokády. Nyní předkládané výsledky jsou částečně v souladu s výsledky naší předchozí studie (Vaněčková et al., 2005). Blokáda ET_A receptorů atrasentanem podstatně prodlužuje přežívání, zlepšuje tělesnou hmotnost a na rozdíl od neselektivní blokády bosentanem rovněž přechodně snižuje SBP. Tento pouze dočasný pokles TK je překvapivý, neboť použitá dávka je všeobecně přijímána jako dostatečná dávka k blokáde ET_A receptorů (Opgenorth et al., 1996, D'Angelo, 2005). Jak bosentan tak i atrasentan zmenšují hypertrofii srdce a normalizují proteinurii. Nejdůležitějším rozdílem oproti našim předchozím závěrům (Vaněčková et al., 2005) byla v této studii skutečnost, že bosentan byl mnohem méně účinný ve snížení mortality oproti atrasentanu. Přesto jsou tato zjištění v souladu s předešlými výsledky Rothermunda et al. (2003), který neprokázal zlepšení přežívání heterozygotních Ren-2 potkanů při podávání neselektivního blokátoru ET_A/ET_B receptorů. Tento nedostatek účinnosti lze přičíst buď pozdnímu počátku léčby a/nebo pravděpodobněji pozdějšímu podávání vysokoslané diety s následným menším vzestupem tkáňové koncentrace ET-1. Větší účinnost selektivních blokátorů ET_A receptorů než neselektivních blokátorů ET_A/ET_B receptorů na míru přežívání může být důsledkem spíše než antivazokonstrikčním, jejich antiproliferačním působením (Mohacsi et al., 2004). Existují dva typy ET_B receptorů, jmenovitě ET_{B1} a ET_{B2} receptory zprostředkující buď vazodilataci nebo vazokonstrikci (Gellai et al., 1996). Naše výsledky tomu nasvědčují, že vazokonstrikční ET_{B2} receptory hrají méně významnou roli v regulaci TK, protože současná blokáda ET_A a ET_B receptorů nesnižuje TK, na rozdíl od efektu ET_A antagonisty, což svědčí pro podstatný účinek

vazodilatačních ET_{B1} receptorů. Avšak zatím jsou k dispozici rozporuplné údaje, které se týkají tohoto tématu. Ačkoli Matsumura et al. (1999) prokázali, že u deoxykortikosteroid-acetát potkanů selektivní blokáda ET_B nemá vazomotorický efekt, naznačující zanedbatelný vliv vazodilatačních ET_B receptorů umístěných na endotelu a vazokonstrikčních ET_B receptorů hladké svaloviny buněk, naproti tomu významná úloha vazodilatačních ET_B receptorů byla nalezena u křečků (Honore et al., 2005), potkanů (Williams et al., 2004) a lidí (Reinhart et al., 2002), kde jejich blokáda vedla v hypertenzi.

Ačkoli se u našich TGR vyvinula těžká proteinurie, ve světelném mikroskopu byly pozorovány pouze lehké odchylky na ledvinném parenchymu. Pomocí elektronového mikroskopu jsme však našli významné morfologické odchylky mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami. Zahrnovaly ztluštění GBM a degenerativní změny na podocytech. Prokázali jsme, že léčba atrasentanem normalizovala tloušťku GBM a redukovala rozsah podocytárního poškození. Navíc byla prokázána významná korelace mezi podocytárním poškozením a přežíváním, která ukazuje velkou závislost dalšího přežívání zvířat na správné funkci podocytů. Naše výsledky jsou v souladu se studiemi Bartona et al. (1998), kteří prokázali pozitivní účinek selektivní ET_A blokády na cévní strukturu. Podobné výsledky přinesli i Ortmann et al. (2004) u starších potkanů kmene Wistar in vivo. Naše zjištění jsou v souladu s výsledky Matsumury et al. (1999), kteří našli při ET_A receptorové blokádě redukci histopatologických změn indukovaných režimem soli a deoxycorticosteroid-acetátu, což podporuje jejich předpoklad, že blokáda ET_A receptorů má pozitivní strukturální vliv na tloušťku GBM a na rozsah glomerulosklerózy a proteinurie. Podocyty se proto zdají cílovou strukturou pro ET-1, jak již dříve prokázali Rebibou et al. (1992). Přesto přesný mechanismus redukce proteinurie při ET_A receptorové blokádě nebyl zatím objasněn. Na jedné straně přijatelné vysvětlení pro rozpor mezi nedetekovatelnými glomerulosklerotickými změnami a přitom zvýšenou proteinurií by mohlo být, že vylučování proteinu spíše koreluje se změnami na ultrastrukturální úrovni, které předcházejí změnám na úrovni světelné mikroskopie. Tuto myšlenku podporují zjištění Boffa et al. (2003), kteří zjistili glomerulosklerotické změny až po 4 týdnech hypertenze indukované nedostatkem NO. Přesto nelze vyloučit možnost, že významně postižená zvířata se nedožijí konce experimentu a pouze zvířata lehce postižená přežijí. Ačkoli jsme neprokázali významnou proteinurii ve věku 50 dnů, Springate et al. (1994) popsali u heterozygotních TGR zvýšenou albuminurii již ve věku 23 dnů; bohužel v tomto časovém období nezjišťovali přítomnost glomerulosklerózy. Na druhé straně účinky inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu nemohou jít na vrub měřitelným

ultrastrukturálním změnám struktur cévní stěny, ale spíše jsou podmíněny změnami ve vnitřních funkčních vlastnostech, jak ukázali Macconi et al. (2000). Předpokládáme, že patologické změny podocytů a GBM, které se objevují časně nejen při diabetické nefropatii, ale také u hypertenze mohou hrát významnou roli u mikro a makroalbuminurie. Jedním ze společných spouštěčů pro tyto události se zdá oxidačně-redukční stres (Hayden et al., 2005). Naše nálezy jsou v souladu s výsledky Nagaseho et al. (2006), kteří popsali imunohistochemicky první prokazatelné podocytární poškození ve 2. týdnu podávání soli u Dahlsenzitivních potkanů, když proteinurie byla pouze mírně zvýšena. Ultrastrukturální změny se objevily o 3 týdny později. Tyto časné ultrastrukturální změny mohou mít důležitou úlohu v dlouhodobém procesu remodelace při glomeruloskleróze. Těsný vztah mezi podocytárním poškozením a proteinurií nasvědčuje pro to, že podocytární poškození je podstatou proteinurie a glomerulopatie u hypertenzních homozygotních Ren-2 potkanů. Předpokládá se, že klíčovými mediátory podocytárního poškození je mechanický a oxidační stres (Pavenstadt et al., 2003).

Dalším zajímavým zjištěním je fakt, že TGR v této studii měli nižší koncentrace ET-1 jak v ledvinné kůře tak i levé komoře než v naší předešlé studii (Opgenorth et al., 1996). Nejpravděpodobnějším vysvětlením pro tento jev je fakt, že TGR v této studii měli lehčí formu hypertenze a známky hypertenzního poškození díky pozdnímu začátku vysokoslané diety. To je v souladu s výsledky Whitwortha et al. (1995), který prokázal významně zvýšenou expresi prepro-ET-1 mRNA pouze u zvířat s těžkou hypertenzí. Je zajímavé, že ET_A blokáda silně snižovala tkáňové ET-1 v komoře pravděpodobně tím, že odstranila ET-1 z ET_A receptorů převládajících v této tkáni na rozdíl od tkáně ledviny, kde převažují ET_B receptory. Rovněž u jiného potkaního hypertenzního modelu, jmenovitě u Dahl sůl-senzitivních potkanů, prokázal Barton et al. (1998) pokles ET-1 proteinu po léčbě ET_A blokátorem. Koncentrace ET-1 v ledvině nebyla ovlivněna selektivní ET_A nebo neselektivní ET receptorovou blokadou pravděpodobně proto, že v tomto orgánu dominují ET_B receptory a snížené odstraňování ET-1 cestou ET_B může kompenzovat vytěsnění ET-1 z ET_A (a ET_B) receptorů.

E. Závěr

Souhrně lze konstatovat, že v naší studii byly TK, proteinurie, glomerulosklerózní index, HW a tkáňové koncentrace ET-1 u dospělých TGR nižší než u mladých TGR potkanů v naší předchozí studii (Vaněčková et al., 2005). Tyto nálezy jsou v souladu s myšlenkou, že mladá zvířata jsou citlivější na hypertenzní podněty (Zicha and Kuneš, 1999) např. na vysokoslanou

dietu a mohou tedy vyvinout těžší hypertenzi a hypertenzí podmíněné poškození cílových orgánů a dále potvrzují předchozí předpoklad, že ET systém se podílí na hypertenzi a hypertenzí podmíněném poškození cílových orgánů u TGR na vysokoslané dietě. Nejdůležitější na našich zjištěních je fakt, že ultrastrukturální změny předcházejí histologickým odchylkám popsatelným světelnou mikroskopií a korelují s mírou přežívání. Mohou tedy sloužit jako marker budoucího poškození dlouho před manifestací proteinurie. Chronická selektivní ET_A blokáda zahájená již v čase fixované hypertenze u homozygotních TGR na vysokoslané dietě prokázala podstatný protektivní účinek na míru přežívání a růst potkanů s přechodným zpomalením vzestupu TK.

F. Perspektivy

Tato studie přináší další důkaz, že selektivní ET_A receptorová blokáda je lepší než neselektivní blokáda ET receptorů a ukazuje na možnost použití ultrastrukturálních podocytárních změn jako možného prognostického markeru ledvinného poškození.

9. Studie č.3

Časná blokáda endotelinových receptorů u hypertenzních heterozygotních Ren-2 potkanů

A. Cíl studie:

Prvotním cílem bylo objasnit úlohu ET-1 při vzniku a posléze i při udržení hypertenze u heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů. Naším druhým cílem bylo objasnit vliv vysokoslaného příjmu na průběh hypertenze, poškození cílových orgánů a na přežívání, stejně tak i možnou roli ET-1 u TGR za těchto podmínek. V této práci jsme srovnávali účinek neselektivní blokády a selektivní blokády ET_A receptorů u TGR s různým obsahem sodíku v dietě, když receptorová blokáda byla zahájena v časném období jejich života.

B. Úvod

Před téměř dvěma desetiletími byl objeven peptid endotelin-1 (ET-1) (Yanagisawa et al., 1988) s velmi silnými vazokonstrikčními účinky. Jeho působení zprostředkují dva druhy receptorů, a to ET_A a ET_B receptory. Zatímco vazokonstrikční ET_A receptory v cévním systému jsou umístěny na hladkých buňkách cévní svaloviny, tak hlavní funkcí převážně na endotelu lokalizovaných ET_B receptorů se zdá být vazodilatace spolu s funkcí vychytávání ET-1. Navíc byly u potkana popsány 2 různé ET_B receptory – ET_{B1} a ET_{B2} se zcela opačnou úlohou (Gellai et al., 1996).

Od nálezů ET-1 přibývalo množství důkazů o tom, že ET-1 hraje klíčovou roli u různých kardiovaskulárních onemocnění včetně chronického srdečního selhání, ischemické choroby srdeční, hypertenze, aterosklerozy a plicní hypertenze. U těchto chorobných stavů je hladina cirkulující ET-1 zvýšena a léčba ET inhibitory se ukázala být prospěšnou (Masaki, 2004). Nespecifický ET receptorový blokátor bosentan byl přijat jako léčivá látka k léčbě plicní hypertenze (Kenyon and Nappi, 2003). Přes narůstající důkazy o tom, že ET systém hraje důležitou roli v patogenezi systémové arteriální hypertenze, není mechanismus jeho účinku stále dobře objasněn.

Naše experimenty byly tedy provedeny, aby se zaprvé objasnila úloha ET-1 při vzniku a posléze i při udržení hypertenze u heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů. Heterozygotní potkani pro myší reninový gen (TGR) (název kmene TGR(mRen2)27) jsou

modelem monogeneticky definované hypertenze (Mullins et al., 1990) mající sůl-senzitivní složku (Callahan et al., 1996). Zvláštní důraz byl dán na objasnění rozdílu působení neselektivní ET_A/ET_B a selektivní ET_A receptorové blokády. Prospěch specifické ET_A receptorové blokády může být spojen se skutečností, že na rozdíl od neselektivní receptorové blokády neinhibuje vazodilatační (de Nucci et al., 1988) a natriuretickou (Konishi et al., 2002) odpověď na stimulaci ET_B receptorů. Vedle své vazokonstrikční funkce ovlivňují ET_A rovněž buněčnou proliferaci různých typů buněk, zvláště buněk hladké svaloviny cév (Hirata et al., 1989). Proto tedy blokáda ET_A receptorů může být prospěšná v oslabení cévního poškození vedoucího k poškození cílových orgánů. Toto antiproliferativní působení ET_A na sebe upoutalo pozornost vědců v oblasti onkologického výzkumu (Salani et al., 2002, Nelson, 2003).

Protože sodík ve stravě hraje roli v patogenezi hypertenze nejenom u lidí (Weinberger, 1996), ale také u sůl-senzitivních modelů hypertenze (Dahl et al., 1968), bylo naším druhým cílem objasnit vliv vysokoslaného příjmu na průběh hypertenze, poškození cílových orgánů a na přežívání a možnou roli ET-1 u TGR za těchto podmínek. Je všeobecně přijímáno, že mladá zvířata jsou více vnímavá na hypertenzní stimuly (Zicha and Kuneš, 1999) a že rovněž léčebná opatření v tomto období jsou více účinná. Přesto byly však publikovány rozporuplné výsledky o úloze ET-1u heterozygotních TGR, a to buď, že je neúčinný (Rothermund et al., 2003) nebo působí hypotenzně (Gardiner et al., 2000) u neselektivní nebo selektivní ET receptorové blokády u dospělých zvířat, na rozdíl od žádného účinku u mladých zvířat (Whitworth et al., 1995, Rossi et al., 2000).

V této práci jsme srovnávali účinek neselektivní blokády a selektivní blokády ET_A receptorů u TGR potkanů s různým obsahem sodíku v dietě, když receptorová blokáda byla zahájena v časném období jejich života.

B. Experimentální část

Protokoly v této studii byly prováděny v souladu s Metodikou péče a užívání laboratorních zvířat a jsou schválené Českým výborem pro péči o zvířata (protokol 79/2001 a 923/2003).

Zvířata

Použili jsme heterozygotní transgenní samce potkanů pro myší reninový gen [TGR; název kmene TGR(mRen2)²⁷] a jejich kontrolní skupinu samčích normotenzních potkanů

Hannover Sprague-Dawley (HanSD). Zvířata byla chována za standardních podmínek a měla volný přístup ke krmivu a vodě. Všechna zvířata používaná v této studii byla chována v Centru experimentální medicíny Institutu experimentální a klinické medicíny, kam byla dodána z chovných zvířat dodaných Max Delbrück Centra molekulární medicíny (Berlín, Německo).

Popis experimentu

Zvířata byla krmena buď dietou s normálním množstvím soli (NS, 0,45% NaCl) nebo vysokoslanou dietou (HS, 2%NaCl), se kterou bylo začato 29.den věku. V tomto momentě byla zároveň zahájena terapie buď neselektivním blokátorem ET_A/ET_B receptorů bosentanem nebo blokátorem selektivních ET_A receptorů atrasentanem. Bosentan (Actelion, Alschwil, Switzerland) byl přidán do stravy tak, aby celkové množství strav odpovídalo 100 mg kg⁻¹ den⁻¹ (Roux et al., 1999). Tato dávka byla naší laboratoří již dříve stanovena jako dostatečná pro efektivní blokádu ET receptorů (Dvořák et al., 2004). Selektivní blokátor ET_A receptorů atrasentan (Abbott, Chicago, USA) byl přidán do pitné vody, týdenní dávka byla přizpůsobena tak, aby odpovídala 5 mg kg⁻¹ den⁻¹ (Mulder et al., 2000), která byla označena jako dostatečná k účinné blokáde ET_A receptorů (Opgenorth et al., 1996, D'Angelo et al., 2005). Na začátku pokusu byla zvířata rozdělena do 8 skupin a byla krmena dietou s normálním obsahem soli (NS) nebo vysokoslanou dietou (HS). Kontroly byly podobným systémem rozděleny do stejných stravovacích režimů.

Následně byly vyšetřované experimentální skupiny:

HanSD + NS (n=24);

TGR + NS, neléčení (n=18);

TGR +NS +bosentan (n=18);

TGR+NS+atrasentan (n=18);

HanSD + HS (n = 24);

TGR + HS, neléčení (n = 24);

TGR + HS + bosantan (n=18);

TGR + HS + atrasentan (n=23).

Určení TK, proteinurie a tělesné hmotnosti

Od 29. dne byli potkani pravidelně váženi a byl jim měřen v týdenních intervalech systolický tlak plethysmografickou metodou na ocase (Hatteras Instruments, Cary, North Carolina,

USA). Ve věku 50 a 80 dnů byla zvířata umístěna do metabolických klecí, byl jim po dobu 24 hodin měřen příjem tekutin a výdej moči. Bílkoviny v moči byly stanoveny pomocí biuretové metody (Lachema).

Na konci pokusu (90.den) byla zvířata zvážena a anestetizována thiopentalem sodným (50 mg kg^{-1}), poté byl měřen střední arteriální tlak (MAP) přímým měřením v karotické arterii a zaznamenáván automatizovaným systémem sběru dat PowerLab (ADInstruments, Mountain View, California, USA). Ledviny a srdce byly zváženy. Poměry hmotnost ledviny (KW)/hmotnost těla (BW) a hmotnost srdce (HW)/BW byly použity jako ukazatelé orgánové hypertrofie.

Stanovení tkáňových koncentrací ET-1

Levá srdeční komora byla rychle vyňata a kůra pravé ledviny byla rychle oddělena. Obě tkáně byly ihned zmrazeny tekutým dusíkem pro stanovení koncentrace ET-1 ELISOU (Amersham, Braunschweig, Germany).

Histologické vyšetření

Levá ledvina byla rychle vyňata, fixována 4% formaldehydem, vysušena a zalita do parafínu. Parafinové řezy byly obarveny hematoxylinem/eosinem a PAS reakcí a vyšetřeny za pomoci světelného mikroskopu Nikon Eclipse E 600. Řezy byly vyšetřovány zaslepeným způsobem. Jak již bylo dříve popsáno (Yagil et al., 2002), 50 glomerulů bylo zhodnoceno pomocí semikvantitativní škály (stupeň 0: normální glomeruly; stupeň 1:1-2 glomeruly postiženy; stupeň 2: více než 2 ale méně než 17 postižených glomerulů; stupeň 3:17 a více než postižených glomerulů).

Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena za pomoci softwaru Graph-Pad Prism (Graph Pad Software). Získaná data byla vyšetřena pomocí dvoucestné ANOVA. Měli jsme dva sdružující faktory (dieta a terapie) a jeden hodnotící faktor (měření). Newman-Keuls post hoc test byl použit pro vícenásobné srovnávání. Pro statistické porovnání výsledků pro HWs a KWs a pro koncentrace ET-1 byla použita metoda jednocestné ANOVA. Pokud není uvedeno jinak, jsou výsledky uvedeny jako průměr \pm SEM, kde n představuje počet zvířat. Za

statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95% hranici pravděpodobnosti ($P < 0,05$).

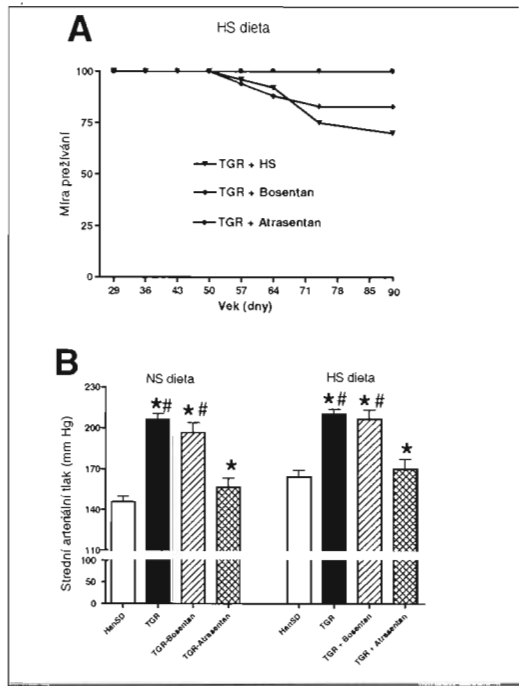
C. Výsledky

Míra přežívání

Všechny TGR skupiny na NS dietě přežily do konce experimentu. Neléčení a bosentanem-léčení TGR na HS dietě začali umírat v 50.den pokusu (Obr.14A) a jejich míra přežívání na konci experimentu byly 77% resp. 83%. Oproti tomu podání atrasentanu zřetelně zlepšilo přežívání, a to na 100 % na konci experimentu. Nulová mortalita byla zjištěna u HanSD potkanů na obou dietách.

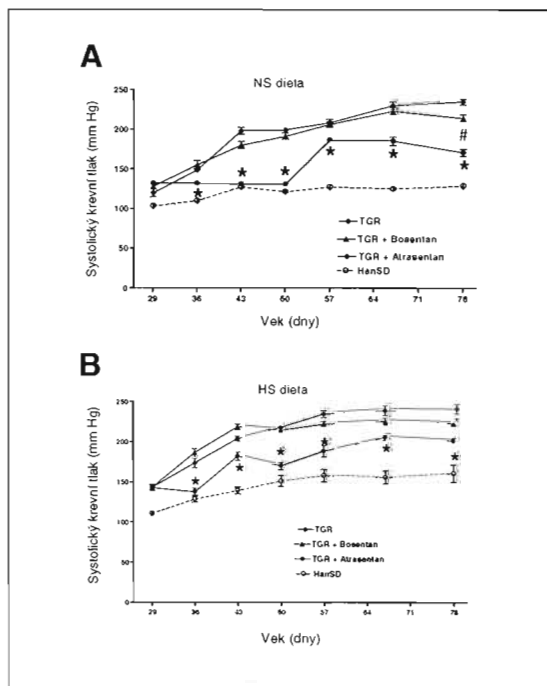
Systolický a střední arteriální krevní tlak

SBP neléčených a bosentanem léčených TGR rostl setrvale v průběhu experimentu na obou dietách a 78. den pokusu na NS dietě dosáhl $234 \pm 3,6$ resp. $214,2 \pm 4,1$ mm Hg ($p < 0,05$) (Obrázek 15A) a na HS dietě $238,2 \pm 5,8$ resp. $223,1 \pm 3,5$ mm Hg (n.s.) (obrázek 15B). Od 36. dne věku (cca týden po zahájení léčby atrasentanem) byl SBP u atrasentanem léčených TGR na obou dietách významně nižší než u neléčených a bosentanem-léčených TGR a dosáhl 78. den věku na NS dietě $170,7 \pm 4,3$ mm Hg a na HS dietě $201,2 \pm 3,0$ mm Hg ($p < 0,01$). Statisticky významný vzestup TK během celého experimentu vyvolaný HS dietou byl prokázán u všech vyšetřovaných skupin. SBP u kontrolních HanSD byl významně nižší ve srovnání s TGR skupinami na obou dietách a zůstal v normotenzním rozmezí během celého experimentu s $128,6 \pm 2,4$ na NS dietě a $140,6 \pm 10,7$ mm Hg na HS dietě. Na konci experimentu byl MAP významně vyšší u neléčených a bosentanem-léčených TGR než u jejich normotenzních kontrol jak na NS ($206,0 \pm 4,4$ resp. $196,6 \pm 7,2$ mm Hg, n.s.) tak na HS dietě ($210,2 \pm 3,9$ resp. $206,6 \pm 6,7$; n.s. (obrázek 14B). Naproti tomu léčba atrasentanem vedla k podstatně nižšímu MAP ve srovnání s neléčenými nebo bosentanem léčenými zvířaty ($156,6 \pm 6,5$ na NS a $169,9 \pm 7,4$ mm Hg na HS, $P < 0,01$).



Obrázek 14

Míra přežívání během experimentu na vysokoslané dietě (A) a střední arteriální tlak na konci experimentu (90.den) (B) u heterozygotních Ren-2 transgenických samic TGR (TGR; +/-) na normální a vysokoslané dietě. * $P < 0,05$ vs neoznačené hodnoty, # $P < 0,05$ oproti všem ostatním hodnotám.



Obrázek 15

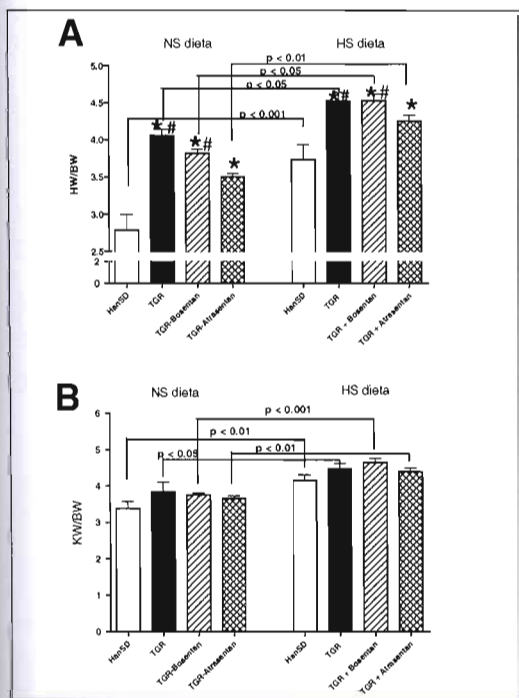
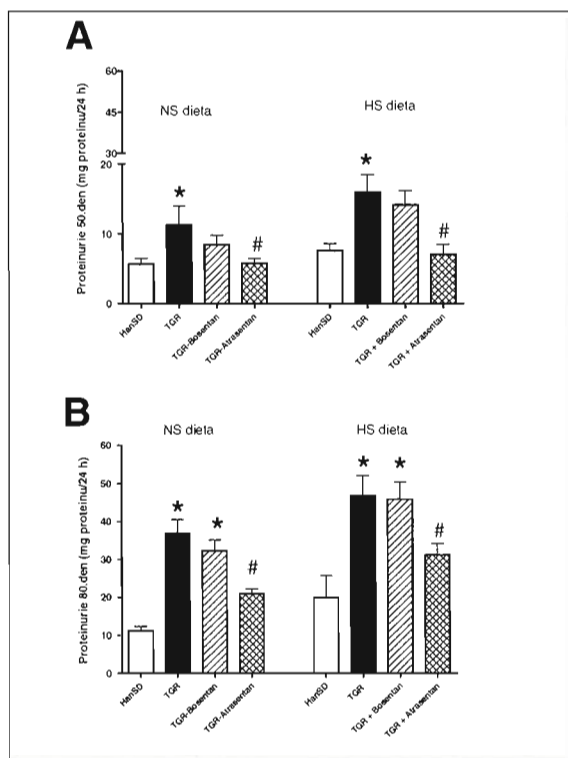
Systolický krevní tlak během experimentu u heterozygotních Ren - 2 transgenických potkanů (TGR; +/-) na normálním (A) nebo na vysokoslaném (B) příjmu * $P < 0,05$ vs. neoznačeným hodnotám, # $P < 0,05$ bosentanem léčení potkani oproti všem ostatním hodnotám.

Proteinurie

HanSD na NS dietě vykazovali 50. den věku nízkou proteinurii ($5,6 \pm 0,92$ mg proteinu/den) (obrázek 16A), která byla pouze lehce zvýšena HS dietou ($7,59 \pm 1,05$ mg proteinu /den) a jak bylo očekáváno, obě hodnoty se 80. den dále zvýšily ($11,56 \pm 1,15$ na NS resp. $19,96 \pm 5,78$ proteinu/den na HS) (obrátek 16B). Oproti tomu vylučování proteinu u neléčených TGR na NS a HS dietě bylo 50. a 80. den věku významně zvýšeno, více však 80. den. Léčba bosentanem měla tendenci k částečné redukci proteinurie, zatímco léčba atrasentanem normalizovala vylučování proteinů téměř na úroveň pozorovanou u HanSD zvířat.

Obrázek 16

Proteinurie 50. (A) a 80. den (B) věku u heterozygotních Ren - 2 transgenních samců (TGR;+/-) na normální a vysokoslané dietě * $P < 0,01$ proti kontrolním HanSD, # $P < 0,05$ oproti neléčeným a/nebo bosentanem-léčeným TGR.



Hmotnost těla a orgánů

Nebyly pozorovány významné rozdíly přírůstků tělesné hmotnosti mezi jednotlivými TGR skupinami během experimentu, dietetické režimy neměly na přírůstky váhy vliv (data nejsou prezentována). Indexy HW/BW a KW/BW jsou zobrazeny na obrázku 17. Jak lze očekávat, měli neléčení TGR významně vyšší index HW/BW než HanSD ($4,06 \pm 0,09$ resp. $2,79 \pm 0,21$ na NS a $4,53 \pm 0,12$ resp. $3,74 \pm 0,20$ na HS dietě) (obrázek 17A).

Obrázek 17

Indexy HW/BW (A) a KW/BW (B) u heterozygotních Ren-2 transgenních samců (TGR;+/-) na normální a vysokoslané dietě. Indexy určeny ve stanovených jednotkách * $P < 0,05$ vs. neoznačeným hodnotám, # $P < 0,05$ oproti všem ostatním hodnotám.

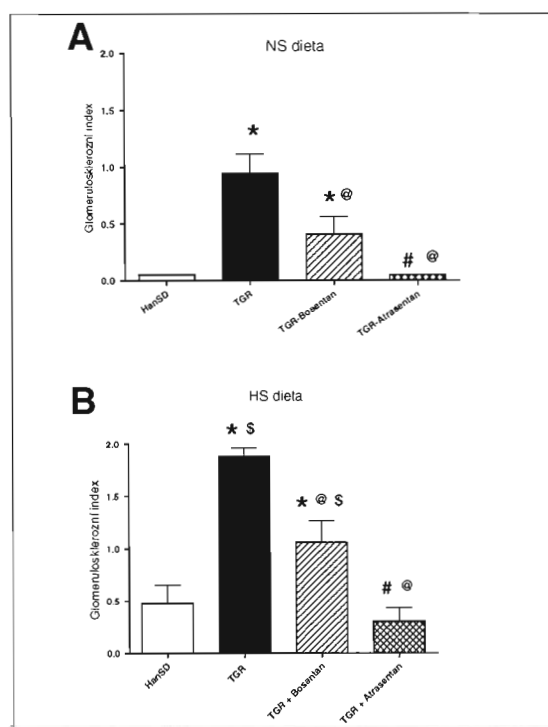
Léčba bosentanem neměla vliv na poměr HW/BW ($3,82 \pm 0,06$ na NS a $4,53 \pm 0,09$ na HS). Naproti tomu léčba atrasentanem způsobila podstatný pokles poměru HW/BW jak na NS ($3,54 \pm 0,05$), tak i na HD dietě ($4,26 \pm 0,08$). HS dieta indukovala větší hypertrofii srdce než NS dieta ve všech skupinách potkanů. Nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v indexech KW/BW mezi všemi vyšetřovanými skupinami a to jak v rámci NS skupin, tak i na HS dietách; přesto byly indexy KW/BW významně zvýšeny u potkanů na HS ve srovnání s NS dietou (Obrázek 17B).

Glomerulosklerózní indexy

U kontrolních HanSD potkanů u obou dietních režimů nebyly zaznamenány téměř žádné známky glomerulárního poškození (obrázek 18A a B). U neléčených TGR na NS dietě jsme našli patrný významný vzestup glomerulosklerózy, který dále rostl po HS příjmu. Léčba bosentanem částečně snížila, zatímco atrasentanem zcela utlumila tyto orgánové změny.

Obrázek 18

Glomerulosklerózní indexy u heterozygotních Ren-2 transgenních samců (TGR;+/-) na normální (A) a vysokoslané (B) dietě *P<0,05 proti kontrolním HanSD, #P<0,05 proti bosentanem léčeným TGR, @ P<0,05 proti neléčeným TGR, \$ proti odpovídajícím skupinám na NS dietě.

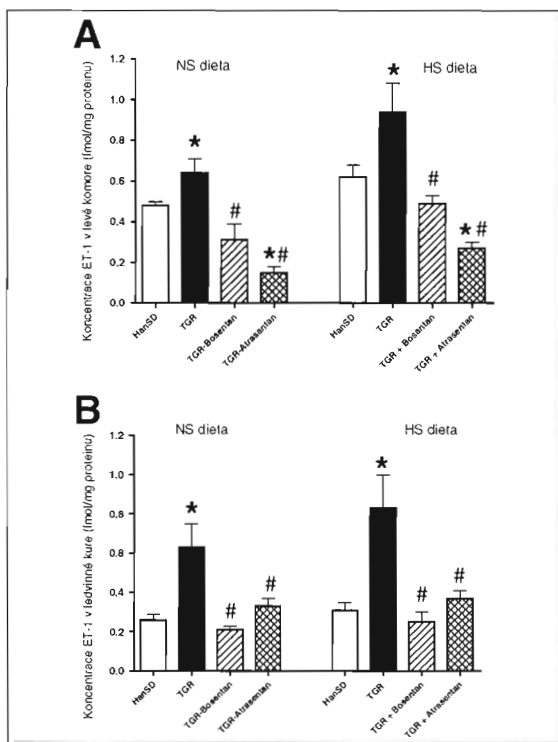


Tkáňové koncentrace ET-1

Jak ukazuje obrázek 19A, HS dieta významně zvyšuje obsah ET-1 v levé komoře u všech skupin zvířat. Obsah ET-1 v levé komoře u neléčených TGR byl významně vyšší oproti HanSD. Bosentan a zvláště atrasentan významně snížily obsah ET-1 v levé komoře a to dokonce pod úroveň HanSD. Podobně ET-1 v kůře ledviny (obrázek 19B) byl významně vyšší u neléčených TGR než u HanSD. Překvapivě byl obsah ET-1 v ledvině nižší u bosentanem léčených než u atrasentanem léčených zvířat. Nebyl prokázán významný rozdíl mezi potkany na HS dietě a NS dietě.

Obrázek 19

Koncentrace endotelinu-1 v levé komoře (A) a kůře ledviny (B) u HanSD (-/-) u heterozygotních Ren-2 transgenických samic (TGR;+/-) na normální (A) a vysokoslané (B) dietě bez nebo s léčbou bosentanem nebo atrasentanem *P<0,05 proti kontrolním HanSD, #P<0,05 proti neléčeným TGR.



D. Diskuse

Heterozygotní TGR představují vhodný model hypertenze, neboť na rozdíl od homozygotních TGR, kteří vyvinou těžkou maligní hypertenzi, je jejich hypertenze lehčí, což umožňuje dlouhodobější studie. Proto bylo naším prvním úkolem porovnat možný prospěšný efekt neselektivního účinku ET_A/ET_B v porovnání se specifickou ET_A blokádou u mladých heterozygotních TGR na normálně slané dietě. Protože naše předchozí práce (Opočenský et al., 2004) prokázala, že chronická léčba heterozygotních TGR na vysokoslané dietě neselektivním blokátorem ET_A/ET_B blokátorem bosentanem významně zlepšila stupeň přežívání a redukovala poškození cílových orgánů bez průvodné změny TK, bylo druhým cílem naší práce zjistit vliv vysokoslané diety na průběh hypertenze, stupeň poškození cílových orgánů a přežívání u mladých heterozygotních TGR, a dále možné účinky ET receptorové blokády.

V této studii, kdy délka léčby byla poloviční oproti naší předchozí práci (Opočenský et al., 2004), jsme částečně potvrdili naše předchozí zjištění, a to že nefroprotektivní účinky bosentanu jsou nezávislé na změnách TK. Rozšířili jsme tato pozorování o studium účinků selektivní ET_A receptorové blokády na hypertenzi a přidružené poškození cílových orgánů. Absence vlivu bosentanu na snížení TK je v souladu s předchozími výsledky Whitwortha et

al. (1995) a Rossiho et al. (2000) zjištěnými u mladých TGR. Zvýšené množství důkazů ukazuje, že účinky ET-1 na hypertenzogenní a orgánové poškození jsou zprostředkovány ET_A receptory zvláště u modelů sůl-dependentní hypertenze (Moreau and Shiffrin, 2003). Na jedné straně tedy není překvapující, že jsme prokázali významný účinek selektivního blokátoru ET_A atrasentanu na snížení TK u našich mladých heterozygotních TGR. Na druhé straně nemáme přijatelné vysvětlení pro to, že Rossi et al. (2000) neprokázali žádný pokles TK se selektivním ET_A blokátorem, kromě toho, že používali jiný ET_A blokátor, a to BMS-182874 a po kratší dobu léčby. Přesto zde existují rozporuplné výsledky ohledně blokátorů ET_A receptorů i u jiných experimentálních hypertenzních modelů. Zatímco žádný vliv na TK nebyl prokázán u 1- svorkové -2 -ledvinové hypertenze (Ehmke et al., 1999, Saam et al., 2003) a dvojitě transgenních potkanů (Bohlender et al., 2000), byly naopak účinky blokátorů ET_A receptorů na snížení TK popsány u Sabra sůl-senzitivního kmene (Rothermund et al., 2003), u DOCA-sůl potkanů (Allcock et al., 1998) a stroke-prone SHR (Blezer et al., 1999). Avšak pouze poslední experimentální práce byly prováděny za podmínek podobných naší studii a to u mladých zvířat. Mimoto naše předchozí pokusy u homozygotních TGR podporují myšlenku významného dopadu selektivní receptorové blokády na TK v časném věku (Vaněčková et al., 2005) se snižujícím účinkem této receptorové blokády nalezené se zvyšujícím se věkem (Opočenský et al., 2006). Rozdíl v účinnosti neselektivní a selektivní blokády je dán pravděpodobně skutečností, že selektivní blokáda inhibuje pouze vazokonstrikční ET_A receptory a neinhibuje vazodilatační ET_B receptory zprostředkující uvolňování NO a prostaglandinů (de Nucci et al., 1988). Navíc byla prokázána role ET_B receptorů jako promotora natriurézy u ET_B-deficientních potkanů, kteří vyvinuli hypertenzi po podávání vysokoslané diety (Gariépy et al., 2000). U těchto zvířat snížila selektivní ET_A receptorová blokáda systolický TK (Elmarakby et al., 2004). Je zajímavé, že nedávné práce se zkříženou transplantací ledvin prokázaly, že citlivost na sůl je pravděpodobně spojena s ET_B receptory lokalizovanými extrarenálně (Ohkita et al., 2005).

Co se týká druhého cíle naší studie, a to zjistit vliv vysokoslané diety na průběh hypertenze, stupeň poškození cílových orgánů a přežívání heterozygotních TGR, a možných důsledků ET receptorové blokády, jsme zjistili, že vysokoslaná dieta významně zrychlila hypertenzi u heterozygotních TGR. Mimoto byl účinek vysokoslaného příjmu na průběh hypertenze významný nejenom u neléčených zvířat, ale rovněž u bosentanem a atrasentanem léčeným TGR, což jasně prokazuje, že tento kmen má zřetelnou sůl-senzitivní komponentu (Callahan et al., 1996). Navíc vysokoslaná dieta u tohoto kmene zvyšuje mortalitu a zhoršuje ledvinové a

kardiální postižení. Na rozdíl od našich předchozích zjištění u heterozygotních TGR (Opočenský et al., 2004) byl bosentan v této studii pouze částečně úspěšný v blokování vzniku těchto účinků. Jedním z možných vysvětlení menší účinnosti bosentanu v této naší studii by mohla být poloviční délka trvání stávající studie ve srovnání s předchozí prací. Na rozdíl od toho atrasentan významně snížil jak SBP, tak i MAP, zlepšil přežívání a měl významné nefro- a kardioprotektivní účinky.

V souladu s naší předchozí studií na homozygotních TGR (Vaněčková et al., 2005) byl obsah ET-1 v levé komoře, který byl významně nižší u heterozygotních oproti homozygotním TGR, snížen bosentanem pouze částečně, zatímco atrasentanem ve významně vyšší míře. To je v souladu se zjištěním Whitwortha et al. (1995), kteří prokázali větší expresi preproET-1 mRNA u svých zvířat s těžkou hypertenzí. Nižší koncentrace ET-1 po léčbě atrasentanem je v souladu s nálezy Bartona et al. (1998) u Dahlových sůl-senzitivních potkanů, který pozoroval snížení množství ET-1 proteinu po ET_A receptorové blokádě, které je zřejmě podmíněno větším vychytáváním ET-1 z ET_A receptorů převažujících v této tkáni.

Naše práce potvrzuje závěry Ortmanové et al. (2004), kteří u stárnoucích potkanů kmene Wistar s podocytárním poškozením prokázali pozitivní účinek selektivních ET_A receptorů na glomerulosklerózu a proteinurii. U našich heterozygotních TGR jsme prokázali podobný stupeň ledvinového postižení. Přesto, že není objasněn přesný mechanismus účinku, je možné vysvětlení odvodit z vlivu ET receptorové blokády na podocyty, které jsou „gatekeeperem“ průchodu albuminu a které jsou asi postiženy působením ET.

Výše uvedené nálezy prokazují, že odpověď na klíčovou otázku rozdílu mezi účinností selektivní proti neselektivní receptorové blokádě vyžaduje další zkoumání. Neselektivní blokáda potlačuje nejen vazokonstrikční a proliferativní účinky zprostředkované ET_A receptory, ale zároveň blokuje vazodilatační působení zprostředkované uvolněním oxidu dusnatého (de Nucci et al., 1988), a natriuretické účinky zprostředkované ET_B receptory (Konishi et al., 2002). Situaci dále komplikují závěry nedávné studie Inscha et al. (2005), které podpořily úvahu, že oba typy ET receptorů působí vazokonstrikci aferentních arteriol v ledvinách a že tedy existuje možná interakce mezi ET_A a ET_B receptory při kontrole průměru aferentní arterioly. Interakce ET_A a ET_B receptorů byla již předpokládána Justem et al. (2004), kteří při zkoumání fyziologických funkcí ET systému vyslovili názor, že je nutno vzít v úvahu nejenom dvojí působení ET_B receptorů, ale rovněž jejich vzájemnou interakci s ET_A receptory.

E. Závěry

Shrneme-li naše závěry, lze říci, že silně podporují předpoklad, že vysokoslaná dieta akceleruje hypertenzi a doprovodné postižení cílových orgánů u mladých heterozygotních TGR léčených od odstavu. Dále naše výsledky ukazují, že na rozdíl od neselektivní ET receptorové blokády vykazuje specifická ET_A receptorová blokáda podstatný pozitivní účinek na TK, orgánové poškození a přežívání na normální a zvláště na vysokoslané dietě. Selektivní ET_A receptorová blokáda by se tak mohla stát novým nástrojem léčby sůl-senzitivní hypertenze.

10. Studie č.4

Pozdní endotelová receptorová blokáda u hypertenzních heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů

A. Cíl studie

V naší předchozí práci s pozdním začátkem léčby u homozygotních TGR jsme prokázali, že ultrastrukturální poškození předchází morfologickým změnám a proteinurii. Z tohoto důvodu jsme se v této studii věnovali imunohistochemickým změnám, které se objevují v časných fázích renálního hypertenzního poškození. Dalším cílem bylo zjistit, zda pozdní léčba ET receptorovou blokádou má u dospělých heterozygotních potkanů podobné účinky na hypertenzi a poškození cílových orgánů jako má časná léčba.

B. Úvod

Entotelin (ET)-1 je mohutný vazokonstriktor (Yanaginasawa et al., 1988) a navíc má mitogenní vlastnosti in vivo i in vitro (Hirata et al., 1989). ET-1 je nejhojněji produkovaný ET, která probíhá dvojí sekreční cestou – tzv. konstitutivní cesta abluminálně z endoteliálních buněk do hladkých svalových buněk a sekreční odpovědí na zevní podněty z endoteliálních buněčně specifických zásobních granulí (Davenport and Maguire, 2006). Působení ET je zprostředkováno aktivací dvou G-protein - vázaných receptorových subtypů ET_A a ET_B. Zatímco ET_A receptory zprostředkují vazokonstrikci a jsou lokalizovány na hladkých svalových buňkách cév, ET_B receptory jsou lokalizovány převážně na endotelových buňkách a jsou odpovědné za vazodilataci spolu s jejich clearancovou funkcí zprostředkovanou ET_B receptory (Brunner et al., 2006). Navíc dále zprostředkují renální tubulární natriurézu (Ge et al., 2006). Ačkoli ET_B receptory byly primárně považovány za mediátory vazodilatace a natriurézy, bylo zjištěno, že knockoutovaná myš pro ET_B receptory sběrných kanálků vykazovala hypertenzi a retenci sodíku (Ge et al., 2006), Fink et al., 2007 nedávno ukázali, že chronická aktivace ET_B receptorů sarafatoxinem 6c zapříčinila hypertenzi, na jejímž vyvolání se předpokládá možné působení sympatiku (Pollock et al., 2000).

Škodlivý vliv ET-1 ve vývoji hypertenze je připisován aktivaci ET_A receptorů, zvláště jejich mitogennímu působení (Bouallegue et al., 2007). Není proto tedy překvapivé, že výsledkem blokády ET_A je orgánová protekce (Barton et al., 2006). Navíc výhoda selektivní ET_A blokády

je rovněž dána tím, že neselektivní receptorová blokáda inhibuje nejenom vazokonstrikční působení ET_A, ale i prospěšné vazodilatační a natriuretické účinky ET_B receptorů.

K dispozici je nyní velké množství údajů, které ukazují, že ET produkce je stimulována angiotenzinem II (ANG II) a naopak, že ET systém hraje důležitou úlohu v patogenezi ANG-II dependentní a sůl-dependentních modelů hypertenze (Shiffrin, 2005). My (Vaněčková et al., 2006) a ostatní (Pollock and Pollock, 2001) jsme prokázali, že ET systém se významně aktivuje při zvýšeném příjmu soli. Ačkoli ET_A receptorová blokáda snižuje TK hlavně u sůl-dependentních modelů hypertenze, byl popsán i významný přínos ET_B receptorů, které při zvýšeném příjmu soli zprostředkovávají zvýšené vylučování sodíku z těla (Vassileva et al., 2003).

Ren-2 transgenní potkani [oficiální název kmene TGR(mRen2-27)] představují model ANG II-dependentní maligní hypertenze (dáno inzercí murinového reninového genu) se silnou sůl-dependentní složkou (Callahan et al., 1996, Vaněčková et al., 2006). U jeho homozygotní varianty se vyvíjí závažná hypertenze s typickými znaky maligní hypertenze jako např. ztráta váhy a poškození funkce ledvin a srdce vedoucí k větší mortalitě. Heterozygotní zvířata tak představují vhodnější model pro dlouhodobé studie.

V naší předchozí práci s pozdním začátkem léčby u homozygotních TGR jsme prokázali, že ultrastrukturální poškození předchází morfologickým změnám a proteinurii. Z tohoto důvodu jsme se v této studii věnovali imunohistochemickým změnám, které se objevují v časných fázích renálního hypertenzního poškození. Ke zhodnocení změn v podocytárním fenotypu jsme použili desmin (marker podocytárního poškození), CD 10, α aktin hladké svaloviny (cytoskeletální protein) a protein intermediálních vláken vimentin.

Přístup léčit zvířata až po rozvinutí hypertenze se více podobá reálné klinické situaci. A tak přesto, že je dobře známá skutečnost, že mladá zvířata jsou více citlivá na hypertenzní podněty a rozličné farmakologické intervence (Kuneš and Zicha, 2006), posunuli jsme léčbu až do doby již rozvinuté hypertenze.

C. Experimentální část

Protokoly v této studii byly prováděny v souladu s Metodikou péče a užívání laboratorních zvířat a jsou schválené Českým výborem pro péči o zvířata (protokol 3/2007).

Zvířata

Heterozygotní transgenní potkani (kmen s názvem TGR(mRen2)27) a jejich kontrolní skupina normotenzních Hannover Sprague-Dawley (HanSD) potkanů byli chováni v pokojové teplotě 25°C s 12 hodinovým cyklem světlo/tma a měli volný přístup ke krmivu a vodě. Všechna zvířata používaná v této studii byla chována v Centru experimentální medicíny Institutu experimentální a klinické medicíny, kam byla dodána z chovných zvířat dodaných Max Delbrück Centra molekulární medicíny (Berlín, Německo).

Popis experimentu

Zvířata dostávala od 52. dne věku vysokoslanou dietu (HS) (2%NaCl). Ve stejné době bylo zahájeno buď podávání neselektivního blokátoru ET_A/ET_B receptorů bosentanu nebo blokátoru selektivních ET_A receptorů atrasentanu. Bosentan (Actelion, Alschwill, Switzerland) byl přidáván do vysokoslané diety tak, aby celkové množství stravy odpovídalo $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ den}^{-1}$. Selektivní blokátor ET_A receptorů atrasentan (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) byl přidán do pitné vody; týdenní dávka byla přizpůsobena tak, aby odpovídala $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ den}^{-1}$.

Následně byly vyšetřovány experimentální skupiny:

samci HanSD na vysokoslané dietě HS (n = 14)

samci TGR + HS, neléčení (n = 18)

samci TGR + HS + bosantan (n=14)

samci TGR + HS + atrasentan (n=24).

Určení TK, proteinurie a tělesné hmotnosti

Od 32. dne byli potkani váženi a byl jim měřen v týdenních intervalech systolický tlak pletysmografickou metodou na ocase, ověřenou již dříve v naší laboratoři (Heller and Hellerová, 1998). Ve věku 50 a 80 dnů byla zvířata umístěna do metabolických klecí, byl jim po dobu 24 hodin měřen příjem tekutin a výdej moči. Bílkoviny v moči byly stanoveny pomocí biuretové metody (Lachema).

Na konci pokusu (90.den) byla zvířata zvážena a anestetizována thiopentalem sodným (50 mg kg^{-1}), poté byl měřen střední arteriální tlak (MAP) přímým měřením v karotické arterii a

zaznamenáván automatizovaným systémem sběru dat PowerLab (ADI Instruments, Mountain View, California, USA). Ledviny a srdce byly rychle vyňaty a zváženy. Poměry hmotnost ledviny (KW)/hmotnost těla (BW) a hmotnost srdce (HW)/BW byly použity jako ukazatelé orgánové hypertrofie.

Stanovení tkáňových koncentrací ET-1

Tkáně kůry pravé ledviny a levé srdeční komory byly ihned zmraženy tekutým dusíkem pro stanovení koncentrace ET-1 ELISOU (Amersham, Braunschweig, Germany), jak již bylo dříve popsáno (Schiffrin, 2005, Vaněčková et al., 2006, Opočenský et al., 2006).

Histologické vyšetření

Levá ledvina byla rychle vyňata, fixována 4% formaldehydem, vysušena a zalita do parafínu. Parafinové řezy byly obarveny hematoxylinem/eosinem a PAS reakcí a vyšetřeny pomocí světelného mikroskopu Nikon Eclipse E 600. Řezy byly vyšetřovány zaslepeným způsobem. Jak již bylo dříve popsáno (Saito et al., 1987), v každé skupině bylo náhodně vybráno 100 glomerulů, které byly zhodnoceny pomocí semikvantitativní škály stupeň 0: normální glomeruly; stupeň 1: sklerotická plocha $\leq 25\%$ celkové glomerulární plochy nebo zřetelné adheze mezi kapilárním trsem a Bowmanovým pouzdrům; stupeň 2: sklerotická plocha mezi 25 % až 50 %; stupeň 3: sklerotická plocha mezi 50 % až 75 %; stupeň 4: sklerotická plocha 75 % až 100 % z celkové glomerulární plochy. Glomerulosklerózní index (GSI) byl vypočítán podle vzorce: $GSI = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4$, kde n_x je počet glomerulů v každém stupni glomerulosklerózy.

Elektronová mikroskopie

Malé části kůry ledviny byly vyňaty a vyšetřeny pomocí elektronového mikroskopu. Byla vždy vyšetřena dvě zvířata z každé skupiny. Vzorky byly obarveny osmiem, dehydrovány a zality v Epon 812. Ultratenké řezy byly obarveny uranyl acetátem a citrátem olova. Preparáty byly vyšetřeny pomocí elektronového mikroskopu Philips EM 286/Morgagni (FEI Company). Vyšetření byla provedena zaslepenou metodou.

Imunohistochemické vyšetření

Byly použity řezy o tloušťce 5 μm , které byly použity ze vzorků formalinem a v parafinu fixovaných tkání. Aktivita endogenní peroxidázy byla inhibována 3 % H_2O_2 v metanolu po dobu 30 minut, následovalo 15 minutové oplachování v tekoucí vodě. Nespecifická aktivita byla vyloučena předchozím ošetřením vzorků 1 % kozím sérem (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) s 1 % kravským fetálním albuminem po dobu 2 hodin. Vzorky byly inkubovány s myšími monoklonálními protilátkami proti lidskému aktinu (hladkého svalstva) (1A4, 1:50, Dako, Cytomation, Glostrup, Denmark) nebo monoklonálními myšími antihumánními CD10 protilátkami (56C6, 1:20, Novocastra, Newcastle, UK), monoklonálními myšími protilátkami proti desminu (D33, 1:50, Dako, Cytomation, Glostrup, Denmark), monoklonálními myšími protilátkami proti vimentinu (V9, 1:50, Dako, Cytomation, Glostrup, Denmark) vždy po hodině. K vizualizaci řezů inkubovaných s primárními protilátkami byl použit Kit Histofine (Nichirei, Tokyo, Japan). Barvivo 3,3 diaminobenzidin (Liquid DAB + Substrate, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) bylo použito na všechny řezy a kontrastní barvení bylo provedeno pomocí Mayersova hematoxylinu. Jako negativní kontrola byly vzaty řezy tkání bez primárních protilátek.

Statistická analýza

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru Graph-Pad Prism (Graph Pad Software). Pro porovnání mezi skupinami byla použita dvoucestná ANOVA. Statistické porovnání výsledků pro váhu srdce a ledvin pro koncentrace ET-1 byla použita metoda jednocestná ANOVA. Pokud není uvedeno jinak, jsou výsledky uvedeny jako průměr \pm SEM, kde n představuje počet zvířat. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, které překročily 95 % hranici pravděpodobnosti ($P < 0,05$).

D. Výsledky

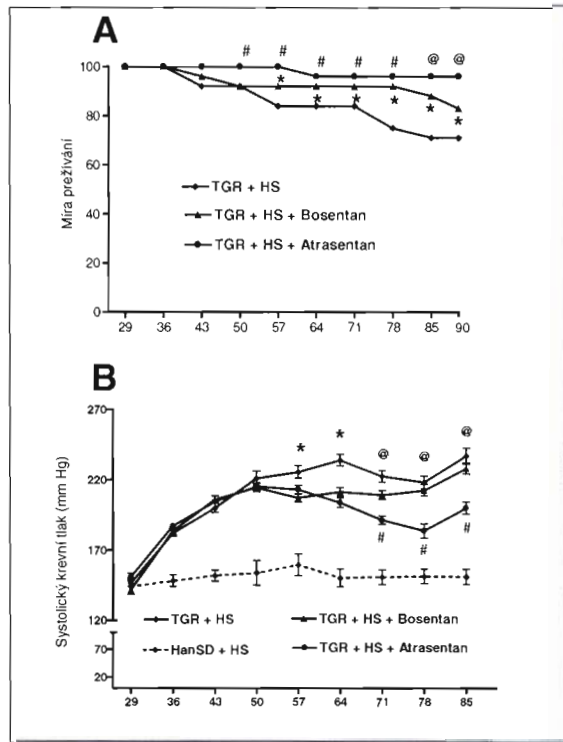
Míra přežívání

Všichni kontrolní HanSD potkani přežili do konce experimentu (data neprezentována). Jeden z neléčených a bosentanem léčených TGR zemřel ve věku 43 dní, tedy ještě před začátkem experimentu (obrázek 20A). Zatímco neléčení TGR umírali během celého experimentu, léčba bosentanem stabilizovala přežívání do 78. dne věku, poté tito potkani postupně umírali. Na konci experimentu byla míra přežívání 71 a 83 % u neléčených, resp. u bosentanem-léčených

TGR, což nebylo statisticky významné. Léčba atrasentanem statisticky významně zlepšila přežívání na 92 %, která se neodlišuje od 100 % přežívání u HanSD potkanů.

Systolický krevní tlak

Systolický krevní tlak (SBP) u HanSD zůstával v normotenzním rozmezí po celou dobu experimentu (obrázek 20B). Na rozdíl od toho SBP u všech TGR od 29.dne věku rychle rostl. Na začátku experimentu, 52. den věku, se SBP nelišil mezi neléčenými, bosentanem léčenými a atrasentanem léčenými TGR ($221,0 \pm 5,2$; $214,5 \pm 3,1$ resp. $215,2 \pm 2,6$ mm Hg). Bosentan přechodně snížil SBP mezi 57. a 64. dnem věku, ale na konci experimentu se neodlišoval od neléčených TGR ($228,0 \pm 4,0$ resp. $236,9 \pm 5,7$ mm Hg). Od 71. dne pokusu byl SBP u atrasentanem léčených TGR významně nižší než u neléčených nebo bosentanem léčených TGR.



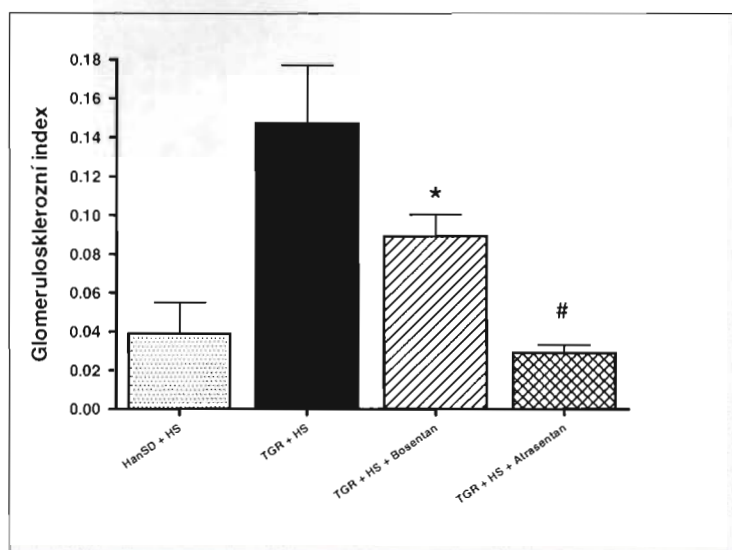
Obrázek 20

Míra přežívání (A) a systolického krevního tlaku (B) během experimentu u heterozygotních Ren-2 transgenických potkanů (TGR; +/-) na vysokoslané dietě (HS)* $P < 0,05$ bosentan proti neléčeným TGR # $P < 0,05$ atrasentan proti neléčeným TGR, $P < 0,05$ @ atrasentan proti bosentanem léčeným TGR.

Glomerulosklerózní index

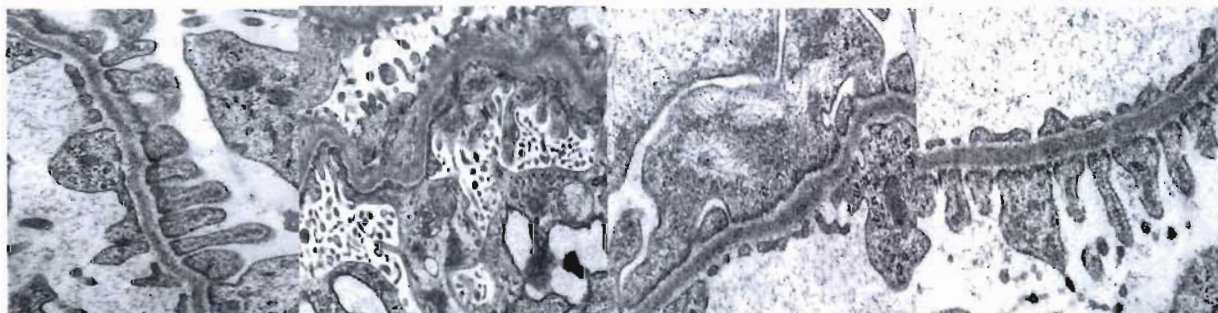
Hypertenzní glomerulární postižení bylo charakterizováno střední mezangiální expanzí a sporadicky segmentální sklerózou kapilárního trsu (převážně stupeň 1). Největší stupeň postižení byl prokázán u neléčených TGR. Léčba bosentanem částečně zmenšila, zatímco atrasentan úplně zmírnil morfologické hypertenzní změny v glomerulech (obrázek 21). Cévní změny v ledvinách byly rovněž lehké a jejich rozsah odrážel glomerulární změny. Na ultrastrukturální úrovni byly u neléčených TGR nalezeny pouze lehké regresivní změny podocytů s částečným splýváním výběžků. Léčba bosentanem zlepšila (omezila rozsah

splývání podocytárních výběžků) a atrasentanem obnovila normální podocytární architekturu (obrázek 22).



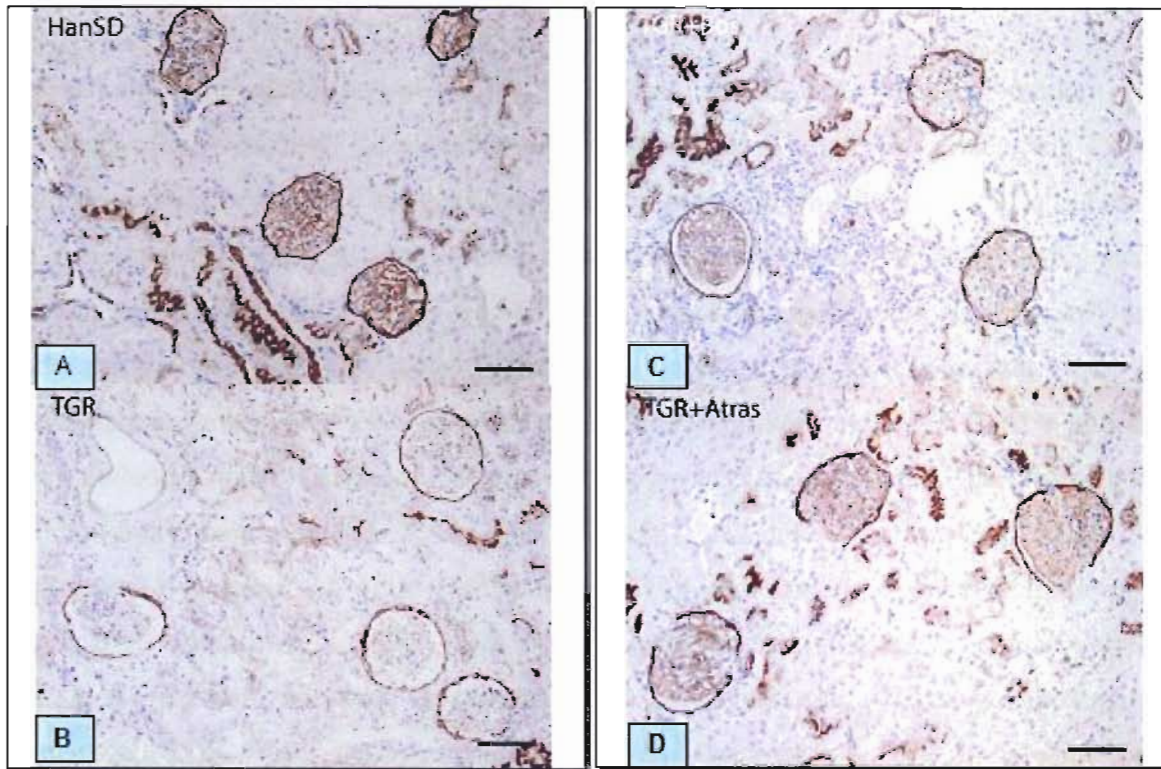
Obrázek 21

Glomerulosklerozní indexy u heterozygotních Ren-2 transgenických potkanů (TGR; +/-) na vysokoslané dietě (HS) na konci experimentu * $P < 0,1$ proti neoznačeným hodnotám, # $P < 0,01$ proti neléčeným TGR.



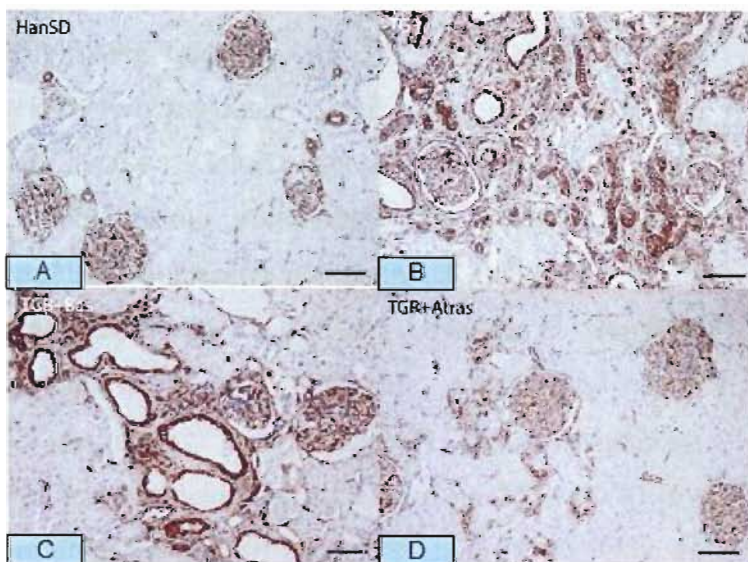
Obrázek 22

Snímek podocytů z elektronového mikroskopu léčených a neléčených samčích heterozygotních TGR. (A) HanSD samci na vysokoslané dietě (HS) s normální glomerulární kličkou (zvětšeno 28000x) (B) neléčení heterozygotní TGR samci na HS s fokálním splýváním výběžků a mikrovilózní transformací podocytů (zvětšeno 14000x) (C) Bosentanem léčení heterozygotní TGR samci na HS vykazují pouze minimální fúzi výběžků (zvětšeno 28000x) (D) atrasentanem léčení heterozygotní TGR samci na HS s normální podocytární architekturou (zvětšeno 28000x).



Obrázek 23

Podocytární poškození u heterozygotních TGR. Reprezentativní snímky z elektronového mikroskopu po barvení pro CD 10. (HanSD) HanSD krmení vysokoslanou dietou (A), (TGR) neléčení heterozygotní TGR na vysokoslané dietě (B), (TGR + Bos) heterozygotní TGR krmení vysokoslanou dietou léčení bosentanem (C), (TGR a Atras) heterozygotní TGR krmení vysokoslanou dietou a léčení atrasentanem (D) X-násobné zvětšení, jednotka na stupnici představuje 100 μm .



Obrázek 24

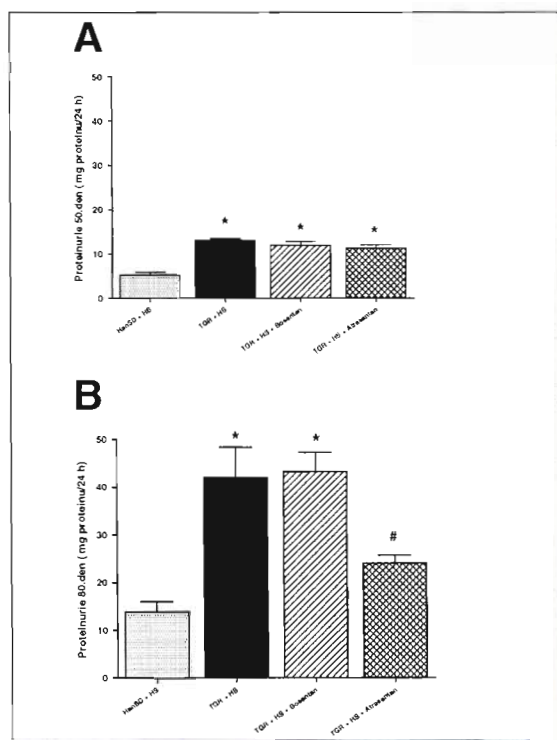
Hypertenzní poškození u heterozygotních TGR. Reprezentativní mikrofotografie imunobarvení na vimentin. (HanSD) Han SD potkani krmení vysokoslanou dietou (A), (TGR) neléčení heterozygotní TGR na vysokoslané dietě (B), (TGR + bos) heterozygotní TGR krmení vysokoslanou dietou léčení bosentanem (C), (TGR a Atras) heterozygotní TGR krmení vysokoslanou dietou a léčení atrasentanem (D) X-násobné zvětšení, jednotka na stupnici představuje 100 μm .

Histochemie

Histochemická analýza podocytárního poškození odhalila, že desmin, marker časného podocytárního poškození, byl vyjádřen u velkého množství glomerulů neléčených TGR. Jeho přítomnost byla zvýšena i v oblastech segmentální glomerulární sklerózy. Léčba oběma druhy ET receptorové blokády omezila indukci desminu v podocytech. Alfaaktin hladké svaloviny nebyl nalezen u žádného z glomerulů vyšetřovaných skupin zvířat. CD 10 pozitivní barvení v podocytech bylo sníženo nebo potlačeno u neléčených TGR (obrázek 23). Léčba atrasentanem ve srovnání s bosentanem téměř úplně obnovila expresi CD 10 v podocytech, který způsobil pouze omezený vzestup CD 10 pozitivního barvení. U kontrolních HanSD potkanů byl vimentin nalezen pouze v glomerulech a to zvláště v podocytech (obrázek 24). U neléčených hypertenzních TGR byly podobné lokalizační změny v podocytech, ale pozitivní barvení na vimentin se objevilo rovněž v peritubulárních kapilárách a uvnitř intersticia (v oblastech tubulární atrofie). Tubulární neoexprese vimentinu byla zaznamenána i u neléčených TGR. Výše jmenované tubulointerstickální změny v barvení na vimentin byly významně sníženy bosentanem a prakticky úplně odstraněny atrasentanem.

Proteinurie

Proteinurie v 50. den věku u všech skupin TGR významně převyšovala její stupeň u HanSD (Obrázek 25A). Mezi jednotlivými TGR skupinami 50. den věku nebyly prokázány rozdíly v exkreci proteinu. 80. den měly HanSD velmi malou proteinurii ($13,75 \pm 2,22$ mg proteinu/den). Na rozdíl od toho se proteinurie, která byla podobná u neléčených a bosentanem léčených TGR, významně převýšila proteinurii HanSD potkanů ($42,07 \pm 6,30$ resp $43,32 \pm 4,0$ mg proteinu/den). Léčba atrasentanem významně redukovala proteinurii na $24,06 \pm 1,70$ mg proteinu/den ($P < 0,01$ proti neléčeným TGR).



Obrázek 25

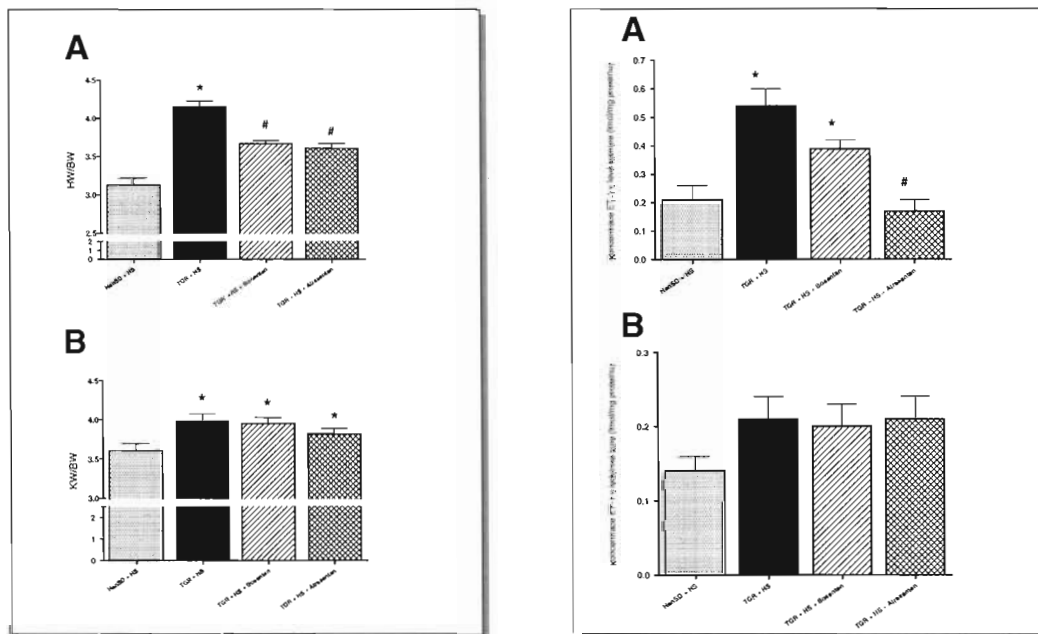
Proteinurie 50. den (A) a 80. den (B) věku u heterozygotních Ren-2 transgenních samců (TGR; +/-) na vysokoslané dietě (HS). * $P < 0,01$ proti neoznačeným kontrolám, # $P < 0,01$ oproti neléčeným a bosentanem léčeným TGR.

Hmotnosti těla a orgánů

Nebyly prokázány rozdíly ani v přírůstcích hmotnosti během experimentu, ani v konečné tělesné hmotnosti mezi všemi vyšetřovanými skupinami potkanů (data neprezentována). Neléčení TGR prokazovali ve srovnání s kontrolními HanSD potkany progresivní srdeční hypertrofii (HW/BW $4,15 \pm 0,08$ vs. $3,13 \pm 0,09$, $P < 0,01$) (Obrázek 26A). Jak bosentan, tak i atrasentan vedly k významnému poklesu poměru HW/BW na $3,67 \pm 0,04$ resp. $3,61 \pm 0,06$ ($P < 0,01$ proti neléčeným TGR). KW/BW poměry u všech skupin byly významně vyšší než u HanSD potkanů (obrázek 26B).

ET-1 tkáňové koncentrace

Jak je ukázáno na obrázku 27A, koncentrace ET-1 v levé komoře u neléčených TGR 2,5x převýšily koncentrace ET-1 u HanSD potkanů ($0,54 \pm 0,06$ proti $0,21 \pm 0,05$ fmol/mg proteinu, $p < 0,05$). Bosentan částečně snížil, zatímco atrasentan plně normalizoval tuto hodnotu na $0,39 \pm 0,03$ resp. $0,17 \pm 0,04$ fmol/mg proteinu ($P < 0,05$). Obsah ET-1 v kůře ledviny byl lehce, ale nevýznamně vyšší u neléčených TGR ($0,21 \pm 0,03$ fmol/mg proteinu) než u HanSD potkanů ($0,14 \pm 0,02$ fmol/mg proteinu). Nebyly zjištěny rozdíly mezi hladinou ET-1 v ledvinné kůře u neléčených a bosentanem ($0,20 \pm 0,03$ fmol/mg proteinu) nebo atrasentanem léčenými TGR ($0,21 \pm 0,03$ fmol/mg proteinu) (obrázek 27B).



Obrázek 26 (vlevo)

Indexy HW/BW (A) a KW/BW (B) u heterozygotních Ren-2 transgenních samců, (TGR; +/-) na vysokoslané dietě. * $P < 0,01$ proti neoznačeným kontrolám, # $P < 0,01$ oproti neléčeným TGR.

Obrázek 27 (vpravo) Koncentrace endotelinu-1 v levé komoře (A) a kůře ledviny (B) u HanSD (-/-) a u heterozygotních Ren-2 transgenních potkanů (TGR; +/-) na vysokoslané (HS) dietě. * $P < 0,01$ proti neoznačeným kontrolám, # $P < 0,01$ oproti neléčeným TGR.

E. Diskuse

Tato studie navazuje a rozšiřuje naše předchozí práce u homozygotních (Opočenský et al., 2006, Vaněčková et al., 2005) a u heterozygotních (Vaněčková et al., 2006) Ren-2 transgenních potkanů (TGR). Současná data ukazují, že na rozdíl od homozygotních TGR, ET receptorová blokáda u heterozygotních TGR má podobné účinky pokud je použita jak u potkanů s již fixovanou hypertenzí (regresní protokol), tak u mladých zvířat (preventivní) protokol. Tento rozdíl lze vysvětlit buď tím, že u homozygotních zvířat je více aktivovaný ET systém, a tak se u nich rozvine závažnější hypertenze, jak bylo prokázáno Whitworthem et al. (1995), nebo menším účinkem sodíku v potravě na aktivaci ET systému. Je dobře známo, že v potravě přijímaný sodík vyvolává hypertenzi a TGR je kmen s významnou sůl-senzitivní složkou a vyvolává endotelovou dysfunkci díky zvýšené produkci ET-1, která může být stimulována ANG II. V našich předchozích studiích jsme prokázali, že zvýšený příjem sodíku nesnižuje souběžně hladinu plazmatických a ledvinných ANG II koncentrací u bdělých TGR samců, což nás vedlo k hypotéze, že zvýšený plazmatický a ledvinný ANG II díky zvýšené ET-1 produkci přispívá k rozvoji hypertenze a orgánového poškození u TGR (Husková et al., 2006). Navíc jsme u heterozygotních TGR prokázali, že vysokoslaná dieta významně zrychluje rozvoj hypertenze, zvyšuje úmrtnost a zhoršuje ledvinné a srdeční postižení, pokud je podána mladým zvířatům (Vaněčková et al., 2006). V souhlasu s výše uvedenou hypotézou jsou na jedné straně podobné nálezy u současných heterozygotních a v předešlých studiích i u homozygotních TGR s časným i pozdním začátkem léčby pomocí ET_A receptorové blokády, to jest pokles BP pozorovaný již týden po zahájení léčby a téměř podobné změny v míře přežívání a v proteinurii. Na druhé straně srdeční a ledvinná hypertrofie byla mírně vyšší, což bylo provázáno i vyšší tkáňovou ET-1 koncentrací v našich předchozích pracích s časným začátkem ET receptorové blokády (preventivní protokol). To pravděpodobně odráží časnější vystavení těchto potkanů vysokoslané dietě, což vede ke zřetelnější akceleraci hypertenze ve srovnání s regresním protokolem.

Důležitým zjištěním je skutečnost, že léčba atrasentanem snižuje TK dokonce i ve fázi fixované hypertenze u heterozygotních TGR. Opakovaně jsme potvrdili větší účinnost selektivní ET_A receptorové blokády nad neselektivní blokádou u Ren-2 potkanů (Vaněčková et al., 2006, Opočenský et al., 2006, Vaněčková et al., 2005), která je pravděpodobně dána skutečností, že neselektivní receptorové blokátory inhibují zároveň nejenom vazokonstrikční ET_A receptory (Kohan, 2006), ale rovněž vazodilatační ET_B receptory

zprostředkující vazodilataci a natriurézu (Ge et al., 2006). Účinnost ET_A receptorových blokátorů na snížení TK byla prokázána i u několika jiných kmenů potkanů a byla obvykle provázena antiproteinurickým působením (Matsumura et al., 1999), což bylo vysvětleno jejich účinkem na zachování integrity podocytů, filtrační bariéry glomerulů (Pavenstadt et al., 2003). Prokázali jsme, že léčba atrasentanem normalizuje tloušťku glomerulární bazální membrány a omezuje rozsah podocytárních změn u mladých homozygotních TGR. Toto bylo provázeno významnou korelací mezi stupněm podocytárního poškození a přežívání za podmínek těžké hypertenze (Opočenský et al., 2006). V této studii byly ultrastrukturální změny podocytů u TGR pouze lehké. Tento nálezn může na jedné straně odrážet postupný nárůst TK s možnou aktivací adaptačních mechanismů a na druhé straně krátké trvání experimentu.

Četné strukturální změny pozorované u hypertenzní glomerulopatie jsou přítomny i u ostatních chronických nefropatií (jako např. diabetická nefropatie, fokální segmentální glomeruloskleróza). U těchto onemocnění ledvin je proliferace/aktivace mezangiálních buněk, tubulární poškození/regenerace, stejně tak i intersticiální fibróza spojená s neoexpresí cytoskeletálních proteinů a intermediálních vláken. Neoexprese vimentinu u některých tubulárních buněk hypertenzních potkanů není neočekávaná, stejně tak jako, že protein intermediálních vláken byl spojen s širokou škálou tubulárních poškození (Nouwen et al., 1994, Sanai et al., 2000). Je možné, že tyto změny odrážejí prvek dediferenciace tubulárních buněk během procesu poškození/oprava (hypertenzní nebo hyperglykemické). Předpokládalo se, že exprese vimentinu v tubulárních buňkách představuje transdiferenciaci ve fibroblastový druh buněk (Strutz and Muller, 2000), a tímto způsobem mohou buňky přispívat k intersticiální fibróze.

Bylo dokumentováno, že ET-1 cestou ET_A receptorů působí poškození cytoskeletu podocytu a jeho aktinových vláken (Morigi et al., 2006). Protože se zdá, že se jedná o reverzibilní proces, jejich blokáda by mohla být prospěšná tím, že podocyty by podporovaly růst endoteliálních buněk. Neproklázali jsme aktinová vlákna hladké svaloviny v glomerulu. Jedno z možných vysvětlení může být krátké trvání experimentu po dobu pouze 13 týdnů. Remuzzi et al., 2006 proklázali zvýšenou expresi aktinu u potkanů Munich Wistar Fromter až v 50. a 60. týdnu věku. Podocytární poškození může být prokázáno přítomností různých markerů. Jeden z nich je CD 10 (neprilysin, enkephalináza), 90-110 kd zinek-dependentní metallopeptidáza, přítomná v ledvinách na podocytech, kartáčovém lemu a hladké svalovině cév (Debiec et al.,

2003). V této práci bylo zřetelné snížení CD 10 nalezeno u neléčených hypertenzních potkanů. Léčba bosentanem částečně a atrasentanem plně obnovila jeho pozitivní lokalizaci v podocytech. Desmin, marker podocytárního poškození (Floege et al., 1995), byl zvýšen pouze v poškozených podocytech neléčených TGR. ET receptorová blokáda chránila podocyty před závažnějším poškozením, pokud posuzujeme tento marker jejich poškození.

F. Závěr

V této práci jsme prokázali, že na rozdíl od homozygotních TGR má pozdní léčba dospělých potkanů ET receptorovou blokádou podobné účinky na hypertenzi a poškození cílových orgánů u heterozygotních potkanů jako má časná léčba, to jest léčba mladých potkanů. Nejpravděpodobnějším vysvětlením těchto nálezů je menší aktivace ET systému u heterozygotních zvířat krmených vysokoslanou dietou ve srovnání s homozygotními TGR, jak ukázaly výsledky našich předchozích prací. Zdá se však, že podocytární poškození hraje klíčovou roli v zapojení ledvin u heterozygotních TGR za těchto experimentálních podmínek a je významně zmenšeno léčbou blokátory ET_A receptorů.

11. Závěrečné shrnutí výsledků

1. U dospělých transgenních potkanů pro Ren-2 gen (TGR) byly TK, proteinurie, glomerulosklerózní index, HW a tkáňový ET-1 obsah nižší než u mladých TGR. Mladá zvířata jsou citlivější na hypertenzní podněty (např. vysokoslanou dietu).
2. Ultrastrukturální změny podocytů předcházejí histologickým odchylkám popsitelným světelnou mikroskopií a zřetelně odpovídají i míře přežívání. Mohou tedy sloužit jako marker budoucího poškození ledvin dlouho před manifestací proteinurie.
3. Vysokoslaná dieta akceleruje hypertenzi a doprovodné postižení cílových orgánů u mladých heterozygotních TGR léčených od odstavu.
4. Chronická selektivní ET_A blokáda zahájená až v čase rozvinuté hypertenze u homozygotních TGR na vysokoslané dietě prokázala podstatný protektivní účinek na míru přežívání a na růst, s přechodným zbržděním vzestupu TK.
5. Selektivní blokáda ET_A receptorů převyšuje neselektivní ET_A/ET_B receptorovou blokádu ve svých účincích na zmírnění hypertenze, hypertenzního orgánového poškození a míry přežívání.
6. ET systém může být aktivován druhotně po aktivaci renin-angiotenzinového systému. ET-1 hraje zřejmě hlavní roli v kardiovaskulárním a ledvinném poškození pouze za podmínek těžké hypertenze nebo zevně podmíněným zvýšením ANG II.
7. Pozdní léčba dospělých potkanů ET receptorovou blokádou má podobné účinky na hypertenzi a poškození cílových orgánů u heterozygotních potkanů jako má časná léčba.
8. Podocytární poškození hraje klíčovou roli v narušení funkce ledvin u heterozygotních TGR za těchto experimentálních podmínek a je významně zmenšeno léčbou blokátory ET_A receptorů.

Literatura

1. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 20: 89-95, 1992.
2. Amiri F, Viridis A and Neves MF Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 110: 2233-2240, 2004.
3. Ammarguellat F, Larouche I and Schiffrin E Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation* 103: 319-324, 2001.
4. Anngard E, Galton, Rae G, Thomas R, McLoughlin L, DeNucc G et al The fate of radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: S46-49, 1989.
5. Allcock GH, Venema RC and Pollock DM ETA receptor blockade attenuates the hypertension but not renal dysfunction in DOCA-salt rats. *Am J Physiol* 275: R245-R252, 1988.
6. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S Cloning and expression of a cDNA-encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-732, 1990.
7. Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D and Mullins J Transgenic rats carrying the mouse renin-gene-morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int* 41: 24-36, 1992.
8. Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagisawa M Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* 48: 286-293, 2006.
9. Ballew JR and Fink GD Role of ET (A) receptors in experimental ANG II-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R150-R154, 2001.
10. Banes-Berceli AKL, Ketsawatsomkron P, Ogbi S, Patel B, Pollock DM and Marrero MB Angiotensin II and endothelin-1 augment the vascular complications of diabetes via JAK2 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1 291H1299, 2007.
11. Barnes K, Brown C, Turner AJ Endothelin-converting enzyme - ultrastructural localization and its recycling from cell surface. *Hypertension* 31: 3-9, 1998.
12. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau PP and Luscher TF ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 31: 499-504, 1998.
13. Barton M, Mullins JJ, Bailey MA and Kretzler M Role of endothelin receptors for renal protection and survival in hypertension: waiting for clinical trials. *Hypertension* 48: 834-837, 2006.
14. Blais V, Fugere M, Denault J B, Klarskov K, Day R and Leduc R Processing of proendothelin-1 by members of subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.* 524: 43-48, 2002.
15. Blezer EL, Nicolay K, Goldschmeding R, Jansen GH, Koomans HA, Rabelink TJ and Joles JA Early-onset but not late-onset endothelin-A receptor blockade can modulate hypertension, cerebral edema and proteinuria in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 33: 137-144, 1999.
16. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC and Chatziantoniou C Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 14: 1132-1144, 2003.
17. Bohlender JJ, Gerbaulet S, Kramer J, Gross M, Kirchengast M and Dietz R Synergistic effects of AT(1) and ET(A) receptor blockade in a transgenic, angiotensin II-dependent, rat model. *Hypertension* 35: 992-997, 2000
18. Bouallegue A, Daou GB and Srivastava AK Endothelin-1 induced signalling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol* 5: 45-52, 2007.
19. Bouriquet N, Dupont M, Herizi A, Mimran A and Casselas D Preglomerular sudanophilia in L-NAME-hypertensive rats: Involvement of endothelin. *Hypertension* 27 (part 1): 382-391, 1996.
20. Brenner BM (eds) in Laragh : *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, ed 2 New York, Raven Press: 713-723, 1311-1349, 1995.
21. Brooks DP, dePalma PD, Pullen M and Nambi P Characterization of canine renal endothelin receptor subtypes and their function. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1091-1097, 1994.
22. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS and Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: Essentials regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111: 508-531, 2006.
23. Callahan MF, Li P, Ferrario CM, Ganten D, Morris M Salt-sensitive hypertension in (mRen-2)27 transgenic rats. *Hypertension* 27: 573-577, 1996.
24. Campbell DJ Bioactive angiotensin peptides other than angiotensin II, in: Epstein M and Brunner HR *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Henley and Belfus Inc., Philadelphia: 9-27, 2001.
25. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon III RO, Panza JA Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 33: 753-758, 1999.
26. Cirino M, Martin E, Yano M and Roger IW Cardiovascular and renal actions of the endothelin(B)

- receptor in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 29: 704-712, 1997.
27. Červenka L, Wang CT, Mitchell KD and Navar LG Proximal tubular angiotensin II levels and renal functional responses to AT1 receptor blockade in nonclipped kidneys of Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 33: 102-107, 1999.
 28. Červenka L, Šímová M, Malý J and Heller J. Úloha ledvin v dlouhodobé regulaci krevního tlaku a rozvoji hypertenze. *Čs Fyziol* 49: 116-133, 2000.
 29. Dahl LK, Knudsen KD, Heine MA and Leitl GJ Effects of chronic excess salt ingestion. Modification of experimental hypertension in the rat by variations in the diet. *Circ Res* 22: 11-18, 1968.
 30. Dashwood MR, Tui JC Endothelin-1 and atherosclerosis: potential complications associated with endothelin-receptor blockade. *Atherosclerosis* 160: 297-304, 2002.
 31. Davenport AP International union of pharmacology XXIX. Update of endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54: 219-226, 2002.
 32. Davenport AP and Maguire JJ Endothelin. *Handb Exp Pharmacol*: 295-329, 2006.
 33. Debiec H, Guignon V, Mougnot B, Haymann JP, Bensman A, Deschenes G, Ronco PM Antenatal membranous glomerulonephritis with vascular injury induced by anti-neutral endopeptidase antibodies: toward new concepts in the pathogenesis of glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 14 (Suppl 1): S27-S32, 2003
 34. de Nucci G, Gryglewski RJ, Warner TD and Vane JR Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2334-2338, 1988.
 35. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 943-955, 2006.
 36. D'Angelo G, Pollock JS and Pollock DM Endogenous endothelin attenuates the pressor response to acute environmental stress via ETA receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1829-H1835, 2005.
 37. D'Orleans-Juste P, Labonte JB, Kaily G, Choufani S, Planta M, Honore JC Function of the endothelin (B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther* 95: 221-238, 2002.
 38. Dobešová Z, Kuneš J and Zicha J Less important role of endothelin in salt hypertension of young than adult Dahl rats. *Physiol Res* 52: 49P, 2003.
 39. Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P Importance of local production of endothelin-1 and of pulmonary vascular tone. *Pulm Pharmacol Ther* 13: 135-140, 2000.
 40. Dvořák P, Kramer HJ, Bäcker A, Malý J, Kopkan L, Vaněčková I, Vernerová Z, Opočenský M, Tesař V, Bader M, Ganten D, Janda J and Červenka L Blockade of endothelin receptors attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive ren-2 transgenic rats. *Kidney Blood Press Research* 27: 248-258, 2004.
 41. Ehmke H, Faulhaber J, Munter K, Kirchengast M and Wiesner RJ Chronic ETA receptor blockade attenuates end-organ damage in homozygous hypertensive ren-2 transgenic rats. *Hypertension* 33: 954-960, 1999
 42. Engler S, Paul M and Pinto ZM The TGR(mRen2)27 transgenic rat model of hypertension. *Regul Pept* 77: 3-8, 1998.
 43. Elmarakby AA, Dabbs LE, Pollock JS and Pollock DM ETA receptor blockade attenuates hypertension and decreases reactive oxygen species in ETB receptor-deficient rats. *J Cardiovascular Pharmacol* 44: S7-S10, 2004.
 44. Félétou M, Vanhoutte MP Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H985-H1002, 2006.
 45. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 85: 906-911, 1999.
 46. Fink G, Li M, Lau Y, Osborn J, Watts S Chronic activation of endothelin B receptors: new model of experimental hypertension. *Hypertension* 50: 512-518., 2007.
 47. Firth JD and Ratcliffe PJ Organ distribution of the 3 rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 90: 1023-1031, 1992.
 48. Floege J, Kriz W, Schulze M, Susani M, Kerjaschki D, Mooney A, Couser WG, Koch KM Basic fibroblast growth factor augments podocyte injury and induces glomerulosclerosis in rats with experimental membranous nephropathy. *J Clin Invest* 96: 2809-2819, 1995.
 49. Gardiner SM, March JE, Kemp PA and Bennett T Cardiovascular effects of endothelin-1 and endothelin antagonists in conscious, hypertensive ((mRen-2)27) rats. *Br J Pharmacol* 131: 1732-1738, 2000.
 50. Garipey CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M Salt sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest* 105: 925-933, 2000.
 51. Ge YQ, Bagnall A, Stricklett PK, Strait K, Webb DJ, Kotevlev Y et al Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention. *Am J Physiol Renal*

- Physiol 291: F1274-F1280, 2006.
52. Gellai M, Fletcher T, Pullen M and Nambi P Evidence for the existence of endothelin-B receptor subtypes and their physiological roles in the rat. *Am J Physiol* 271: R 254-R261, 1996.
 53. Gray GA, Webb DJ The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 72: 109-148, 1996.
 54. Guarda E, Myers PR, Brilla CG et al Endothelial cell induced modulation of cardiac fibroblast collagen metabolism. *Cardiovasc Res* 27: 1004-1008, 1993.
 55. Guyton AC The Surprising kidney-fluid mechanism for pressure control – its infinite gain! *Hypertension* 16: 725-730, 1990.
 56. Guyton AC, Hall JE and Coleman TG The dominant role of the kidneys in long-term arterial pressure regulation in normal and hypertensive states. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, edn 2. Edited by Laragh JH, Brenner BM. New York Raven Press 78: 1311–1326, 1995.
 57. Guyton AC *Textbook of medical physiology*, W.B. Saunders Company, 1976
 58. Harrison VJ, Corder R, Aggard EE, Vane JR Evidence for vesicles that transport endothelin-1 in bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: S57-S60, 1993.
 59. Hayden MR, Whaley-Connel A and Sowers JR Renal redox stress and remodelling in metabolite syndrome, type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy: paying homage to the podocyte. *Am J Nephrol* 25: 553-569, 2005.
 60. Haynes WG, Ferro CJ, O’Kane KPJ, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 93: 1860-1870, 1996.
 61. Heller J, Schubert G, Havlíčková J and Thurau K. The role of the kidney in the development of hypertension „A transplant study in the Prague hypertensive rat“. *Pflugers Arch*: 208-212, 1993.
 62. Heller J and Hellerová S Long-term effect on blood pressure of early brief treatment by different antihypertensive agents: a study in the Prague hypertensive rat. *Kidney Blood Press Res* 21: 445-451, 1998.
 63. Herizi A, Jover B, Bouriquet N and Mimran A Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. *Hypertension*. 31: 10-14, 1997.
 64. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y and Marumo F Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78: 225-228, 1989.
 65. Honore JC, Fecteau MH, Brochu I, Labonte J, Bkaily G and D’Orleans-Juste P Concomitant antagonism of endothelial and vascular smooth muscle cell ETB receptors for endothelin induces hypertension in the hamster. *Am J Physiol* 289: H1258-H1264, 2005.
 66. Huskova Z, Kramer HJ, Vanourkova Z, Cervenka L Effects of changes in sodium balance on plasma and kidney angiotensin II levels in anesthetized and conscious Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens* 24: 517-527, 2006.
 67. Chiou Wj, Wessale JL, von Geldern T, Opgenorth and Wu-wong JR Irreversible endothelin-1 binding does not prohibit ABT-627 from reversing endothelin-1 induced effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: S48-S52, 2000.
 68. Iglarz M and Clozel M Mechanism of ET-1 induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: 621-628, 2007.
 69. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y and Miyauchi T The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863-2867, 1989.
 70. Inscho EW, Imig JD, Cook AK and Pollock DM ET(A) and ET(B) receptors differentially modulate afferent and efferent arteriolar responses to endothelin. *Br J Pharmacol* 146: 1019-1026, 2005.
 71. Intengan HD, Schiffrin EL Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension. Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36: 312-318, 2000.
 72. Itoh S, Carretero OA, Muray RD Possible role of adenosine in the macula densa mechanism of renin release in rabbits. *J Clin Invest* 76: 1412-1417, 1985.
 73. Johnson GD, Stevenson K and Ahn K Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem* 274: 4053-4058, 1999.
 74. Just A, Olson AJ and Arendshorst WJ Dual constrictor and dilator actions of ET(B) receptors in the rat renal microcirculation: interactions with ET(A) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F660-F668, 2004.
 75. Kamoun WS, Karaa A, Kresge N, Merkel SM, Korneszczuk K and Clemens MG LPS inhibits endothelin-1 induced endothelial NOS activation in hepatic sinusoidal cells through a negative feedback involving caveolin-1. *Hepatology* 43:182-190, 2006.
 76. Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales MF, Loffler BM, Clozel M and Clozel JP Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats: comparison with angiotensin-

- converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension* 28: 379-385, 1996.
77. Karet FE, Davenport AP Localization of endothelin peptides in human kidney. *Kidney Int* 49: 382-387, 1996.
 78. Kasper SO, Carter CS, Ferrario CM, Ganten D, Ferder LF, Sonntag WE, Gallagher PE and Diz DI Growth, metabolism and blood pressure disturbances during aging in transgenic rats with altered brain renin-angiotensin systems. *Physiol Genomics* 23: 311-317, 2005.
 79. Kenyon KKW and Nappi JM Bosentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Am J Hypertens* 16: 1055-1062, 2003.
 80. Kim NN, Dhir V, Azadzi KM, Taish AM, Flaherty E, Goldstein I Pilot study of the endothelin-A receptor selective antagonist BMS-193884 for the treatment of erectile dysfunction. *J Androl* 23: 76-83, 2002.
 81. Kirkby NS, Hadoke PWF, Bagnall AJ and Webb DJ The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *British Journal of Pharmacol* 153: 1105-1119, 2008.
 82. Kohan DE The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Current Opinion in Nephrol and Hyperten* 15: 34-40, 2006.
 83. Kohan DE Endothelins in the normal and diseased kidney 29: 2-26, 1997.
 84. Konishi F, Okada Y, Takaoka M, Garipey CE, Yanagisawa M and Matsumura Y Role of endothelin ET(B) receptors in the renal hemodynamic and excretory responses to big endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 451: 177-184, 2002.
 85. Kunes J, Zicha J Developmental windows and environment as important factors in the expression of genetic information: a cardiovascular physiologist's view. *Clin Sci (Lond)* 344: 541-544, 1990.
 86. Langheinrich M, Lee MA, Böhm M, Pinto YM, Ganten D and Paul M The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2) 27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 9: 506-512, 1996.
 87. Lariviere R, Thibault G and Schiffrin EL Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21: 294-300, 1993.
 88. Lee MA, Böhm M, Kim S, Bachmann S, Bachmann J, Bader M, Ganten U and Ganten D Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mRen2)27. *Am J Physiol* 270: E919-929, 1996.
 89. Levine D, Burns K., Jaffey J and Iacovitti M Short-term modulation of distal tubule fluid nitric oxide in vivo by loop NaCl reabsorption. *Kidney International* 65: 184-189, 2004.
 90. Li JS, Knafo L, Turgeon A, Garcia R and Schiffrin EL Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 40: H88-H93, 1996.
 91. Liu R, Ren Y, Garvin JL, Carretero O Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole. *Kidney International* 66: 268-274, 2004.
 92. Luscher TF, Barton M Endothelin system: Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102: 2434-2440, 2000.
 93. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, Remuzzi G and Remuzzi A Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 477-489, 2000.
 94. Maguire JJ, Davenport AP Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol* 137: 579-588, 2002.
 95. Masaki T Historical review: endothelin trends. *Pharmacol Sci* 25: 219-224, 2004.
 96. Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, Kuro T, Kitano R, Ohkita M, Opgenorth TJ and Takaoka M Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt induced hypertension in rats. *Hypertension* 33: 759-765, 1999.
 97. Mizuguchi T, Nishiyama M, Moroi K, Tanaka H, Saito T, Masuda Y et al Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptors subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br J Pharmacol* 120: 1427-1430, 1997.
 98. Mohacsi A, Magyar J, Banyasz Z and Nanasi PP Effects of endothelins on cardiac and vascular cells: new therapeutic target for the future? *Curr Vasc Pharmacol* 2: 53-63, 2004.
 99. Moreau P and Schiffrin EL Role of endothelins in animal model of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 511-521, 2003.
 100. Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG and Hunt JT Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 100-106, 1992.
 101. Morita S, Kitamura K, Yamamoto Y, Eto T, Osada Y, Sumiyoshi A Immunoreactive endothelin in human kidney. *Ann Clin Biochem* 28: 267-271, 1991.
 102. Morigi M, Buelli S, Zanchi C, Longaretti L, Macconi D, Benigni A, Muioli D, Remuzzi G, Zoja C Shigatoxin-1 induced endothelin-1 expression in cultured podocytes autocrinally mediates actin remodelling. *Am J Pathol* 169:1965-1975, 2006.

103. Mulder P, Boujedaini H, Richard V, Derumeaux G, Henry JP, Renet S, Wessale J, Opgenorth T and Thuillez C Selective endothelin-A versus combined endothelin-A/endothelin-B receptor blockade in rat chronic heart failure. *Circulation* 102: 491-493, 2000.
104. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E, Breu V, Löffler BM, Ganten D, Schneider W, Haller H and Luft FC Effect of bosentan on NF-kappa B, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension* 36: 282-290, 2000.
105. Mullins JJ, Peters J and Ganten D Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344: 541-544, 1990.
106. Nagasse M, Shibata S, Yoshida S, Nagasse T, Godota T and Fujita T Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 47: 1084-1093, 2006.
107. Nakano A, F Kishi, K Minami, H Wakabayashi, Y Nakaya and H Kido Selective conversion of big endothelin to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol*. 159: 1987-1992, 1997.
108. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, Remuzzi G, Remuzzi A Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 477-489, 2000.
109. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C et al Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 72: 526-538, 1993.
110. Mulvany MJ Small artery remodeling and significance in the development of Hypertension. *News Physiol Sci* 7: 105-109, 2002.
111. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T, Fujita T Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-sensitive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 47: 1084-1093, 2006.
112. Navar LG Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics. *Am J Physiol* 274: 433-444, 1988.
113. Navar LG The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am* 81:1165-1198, 1997.
114. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarnag Wang Ch, Imig JD and Mitchell KD Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. *News Physiol Sci* 13: 170-176, 1998.
115. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD Concentrations and actions of intraluminal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 10 Supplement 11: 189-195, 1999.
116. Nelson JB Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. *J Urol* 170: S65-S67, 2003.
117. Nouwen EJ, Verstrepen WA, Buysens N, Zhu MQ, De Broe ME Hyperplasia, hypertrophy, and phenotypic alterations in the distal nephron after acute proximal tubular injury in the rat. *Lab Invest* 70: 479-493, 1994
118. Nunez DJR, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wyse RK Endothelin-1 messenger-RNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest* 85: 1537-1541, 1990.
119. Ohkita M, Wang Y, Nguyen ND, Tsai YH, Williams SC, Wiseman RC, Killen PD, Li S, Yanagisawa M and Garipey CE Extrarenal ETB plays a significant role in controlling cardiovascular response to high dietary sodium in rats. *Hypertension* 45: 940-946, 2005.
120. Okada M, Kobayashi M, Maruyama H, Takahashi R, Ikemoto F, Yano M and Nishikibe M Effects of a selective endothelins A-receptor antagonist, BQ-123, in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 763-768, 1995.
121. Okishima N, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Cui P, Kitamura H, Tamaki K and Kido H Determination of the levels of novel 31-amino-acid endothelins and endothelins in human lungs. *Life Sci* 68: 2073-2080, 2001.
122. Oparil S, Chen Y-F, Berecek KH The role of the central nervous system in hypertension. In Laragh J.H. and Brenner B.M. (eds): *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, ed 2, New York: Raven Press, pp. 713-740, 1995.
123. Opgenorth TJ, Adler AL, Calzadilla SV, Chiou Wj, Dayton BD, Dixon DB, Gehrke LJ, Hernandez L, Magnuson SR, Marsh KC, Novosad EI, von Geldern TW, Wessale JL, Winn M and Wu-Wong JR Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 473-481, 1996.
124. Opočenský M, Kramer HJ, Bäcker A, Vernerová Z, Eis V, Červenka L, Čertíková-Čihobá V, Tesář and Vaněčková I Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension. *Hypertension* 48: 965-971, 2006.
125. Opočenský M, Dvořák P, Malý J, Kramer HJ, Bäcker A, Kopkan L, Vernerová Z, Tesář V, Zima T, Bader M, Ganten D, Janda J and Vaněčková I 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, 2004.
126. Orth SR, Esslinger JP, Amann K, Schwarz U, Raschack M and Ritz E Nephroprotection of an ET(A) receptor blocker (LU 135252) in salt-loaded uninephrectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31: 995-1001, 1998.
 127. Ortmann J, Amann K, Brandes RP, Kretzler M, Munter K, Parekh N, Traupe T, Lange M, Lattmann T, Barton M Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition. *Hypertension* 44: 974-981, 2004.
 128. Paul M, Wagner J, Hoffmann S, Urata H and Ganten D Transgenic rats: new experimental models for the study of candidate genes in hypertension research. *Annu Rev Physiol* 56: 811-829, 1994.
 129. Pavenstadt H, Kriz W and Kretzler M Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253-307, 2003.
 130. P D'Orléans-Juste, Plante M, Honoré J C, Carrier E and J.Labonté Synthesis and degradation of endothelin-1, *Can J Physiol Pharmacol* 81: 503-510, 2003.
 131. Pollock DM, Portik-Dobos V, Procter C, Garipey CE, Yanagisawa M Arterial pressure response to endothelin-1 and sarafotoxin 6c in rescued endothelin-B-deficient rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: S82-S85, 2000.
 132. Pollock DM and Pollock JS Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F144-F150, 2001.
 133. Properzi G, Terenghi G, GU XH, Poccia G, Pasqua R, Francavilla S Early increase precedes a depletion of endothelin-1 but not of von Willebrand factor in cutaneous microvessels of diabetic patients, a quantitative immunohistochemical study. *J Pathol* 175: 243-252, 1995.
 134. Pernow J, Bohm F, Johansson BL, Hedin U, Ryden L Enhanced vasoconstrictor response to endothelin-B-receptor stimulation in patient with atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: S418-420, 2006.
 135. Rebibou JM, He CJ, DElarue F, Peraldi Mn, Adida C, Rondeau E and Sraer JD Functional endothelin-1 receptors on human glomerular podocytes and mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 7: 288-292, 1992.
 136. Reckelhoff JF Gender Differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 37: 1199-1208, 2001.
 137. Reinhart GA, Preusser LC, Burke SE, Wessale JL, Wegner CD, Opgenorth TJ and Cox BF. Hypertension induced by blockade of ET(B) receptors in conscious nonhuman primates: role of ET(A) receptors. *Am J Physiol* 283: H1555-H1561, 2002.
 138. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A Mechanism of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116: 288-296, 2006.
 139. Resink TJ, Han AWA, Scott-Burden T, Powell J, Weber E, Buhler FR Inducible endothelin messenger RNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 1303-1310, 1990.
 140. Rettig R, Stauss H, Folberth C, Ganten D, Waldherr B and Unger T Hypertension transmitted by kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiology* 257: 197-F203, 1996.
 141. Ross P Atherosclerosis-an inflammatory disease. *NEJM* 340: 115-126, 1999.
 142. Rossi GP, Sacchetto A, Rizzoni D, Bova S, Porteri E, Mazzocchi G, Belloni AS, Bahcelioglu M, Nussdorfer GG and Pessina AC Blockade of angiotensin II type 1 receptor and not of endothelin receptor prevents hypertension and cardiovascular disease in transgenic (mREN2)27 rats via adrenocortical steroid-independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 949-956, 2000.
 143. Rothermund L, Kossmehl P, Neumayer HH, Paul M and Kreutz R Renal damage is not improved by blockade of endothelin receptors in primary renin-dependent hypertension. *J Hypertens* 21: 2389-2397, 2003.
 144. Rothermund L, Traupe T, Dieterich M, Kossmehl P, Yagil C, Yagil Y and Kreutz R Nephroprotective effects of the endothelin ET(A) receptor antagonist darusentan in salt-sensitive genetic hypertension. *Eur J Pharmacol* 468: 209-216, 2003.
 145. Roux S, Breu V, Ertel SI and Clozel M Endothelin antagonism with bosentan: a review of potential application. *J Mol Med* 77: 364-376, 1999.
 146. Rubinstein I, Gurbanov K, Hoffman A, Better OS, Winaver J Differential effect of endothelin-1 on renal regional blood-flow - role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: S-208-210, 1995.
 147. Russell FD, Davenport AP Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 126: 391-398, 1999.
 148. Saam T, Ehmke H, Haas C, Ritz E and Amann K Effect of endothelin blockade on early cardiovascular remodeling in the one-clip-two-kidney hypertension of the rat. *Kidney Blood Press Res* 26: 325-332, 2003.
 149. Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int* 32: 691-699, 1987.

150. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takawa Y, Yanagisawa H, Masaki T Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 656-663, 1991.
151. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K and Sugishita Y Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384: 353-355, 1996.
152. Salani D, Rosana Di L, Spinella V, Venuti F, Padley A, Nicotra RJ, Natali MR and Bagnato PG ABT-627, a potent endothelin receptor A antagonist, inhibit ovarian carcinoma growth in vitro. *Clin Sci (London)* 103 (suppl 48): 318S-321S, 2002.
153. Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben GO, el. OS, Nahas AM Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 43: 91-100, 2000.
154. Santos RA, Campagnole-Santos MJ and Andrade SP Angiotensin (1-7): an update. *Regul pept* 91: 45-62, 2000
155. Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, Paul M, Nussdorfer GG, Pessina AC and Rossi GP Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol* 41: 666-673, 2003.
156. Shemyakin A Enhanced endothelium-dependent vasodilatation by dual endothelin receptor blockade in individual with insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol* 47: 385-390, 2006.
157. Shi SJ, Rakugi H, Higashimori K, Jiang BB, Higaki J and Mikami H Augmentation by converting-enzyme inhibition of accelerated endothelin release from rat mesenteric-arteries following nephrectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 246-251, 1994.
158. Schiffrin EL Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 34(Part2): 876-881, 1999.
159. Schiffrin EL Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* 15: 115S-122S, 2002.
160. Schiffrin EL Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmacology* 43: 19-29, 2005.
161. Schiffrin EL The angiotensin-endothelin relationship: does it play a role in cardiovascular and renal pathophysiology? *Hypertension* 21: 224S-224T, 2003.
162. Schiffrin EL Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 14: 83-89, 2001.
163. Sharifi AM and Schiffrin EL Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 18: 885-891, 2000.
164. Shimada K, Takahashi M and Tanzawa K Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 269: 18275-18278, 1994.
165. Schnermann J Cyclooxygenase-2 and macula densa control of renin secretion. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1735-1738, 2001.
166. Simonson MS Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* 73: 375-411, 1993.
167. Springate JE, Feld LG and Ganten D Renal function in hypertensive rats transgenic for mouse renin gene. *Am J Physiol* 266: F73-F737, 1994.
168. Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray GA, Webb DJ Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension* 33: 581-585, 1999.
169. Stauffer BL, Westby CM, DeSouza CA Endothelin-1, aging and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 23: 350-355, 2008.
170. Strutz F, Muller GA Transdifferentiation comes of age. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1729-1731, 2000.
171. Tokita Y, Franco-Saenz R, Mulrow PJ and Ganten D Effects of nephrectomy and adrenalectomy on the renin-angiotensin system of transgenic rats TGR(mRen2)27. *Endocrinology* 134: 253-257, 1994.
172. Tostes RCA, Touyz RM, Gang H, Ammarguelat F and Schiffrin EL Endothelin A receptor blockade decreases expression of growth factors and collagen and improves matrix metalloproteinase-2 activity in kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 892-900, 2002.
173. Tschudi MR, Lusher TF Characterization of contractile endothelin and angiotensin receptors in human resistance arterie-evidence for 2 endothelins and one angiotensin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 685-690, 1994.
174. Tucker DC Contribution of the sympathetic nervous system to the development of hypertension. In *Handbook of Hypertension, Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies*, Mc Carthy R, Blizard DA, Chevalier RL (eds), Vol 19: 287-304, 1999.
175. Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S, Raabe A, Thome C and Ringel F Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study. *J Neurosurg* 103: 9-17, 2005.
176. Vander AJ Thirst and salt appetite, in *Renal Physiology*, McGraw-Hill: 139-142,

1995.

177. Vaněčková I, Kramer HJ, Bäcker A, Schejbalová S, Vernerová Z, Eis V, Opočenský M, Dvořák P and Červenka L Early-onset endothelin receptor blockade in hypertensive heterozygous Ren-2 rats. *Vascular Pharmacology* 45: 163-170, 2006.
178. Vaněčková I, Kramer HJ, Bäcker A, Vernerová Z, Opočenský M and Červenka L Early endothelin-A receptor blockade decreases blood pressure and ameliorates end-organ damage in homozygous Ren-2 rats. *Hypertension* 46: 969-974, 2005.
179. Van Guilder GP, Westby CM, Greiner JJ Endothelin I Vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. *Hypertension* 50: 403-409, 2007.
180. Vassileva I, Mountain C and Pollock DM. Functional role of ET_B receptors in the renal medulla. *Hypertension* 41: 1359-1363, 2003.
181. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans Ha, Rabelink TJ and Webb DJ Endothelin-A receptor antagonist mediated vasodilation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 97: 752-756, 1998.
182. Vernerová Z Morfologický obraz renálního poškození u hypertenzního modelu transgenních potkanů (TGR[mRen2]27) pro myši Ren-2 reninový gen. *Českosl fyziologie* 56: 79-84, 2007.
183. Veselý J Tlaková diureza a arteriální hypertenze. *Naklad Epava*: 35-37, 2002.
184. Weinberger MH Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 205-208, 1996.
185. White KE and Bilous RW Structural alterations to the podocyte are related to proteinuria in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1437-1440, 2004.
186. Whitworth CE, Veniant MM, Firth JD, Cumming AD and Mullins JJ Endothelin in the kidney in malignant phase hypertension. *Hypertension* 26: 925-931, 1995.
187. Williams JM, Pollock JS and Pollock DM Arterial pressure response to the antioxidant tempol and ETB receptor blockade in rats on a high-salt diet. *Hypertension* 44: 770-775, 2004.
188. Wu-Wong JR, Chiou WJ, Hoffman DJ, Winn M, von Geldern TW and Opgenorth TJ Endothelins and endothelin receptor antagonists: binding to plasma proteins. *Life Sci* 58: 1839-1847, 1996.
189. Wu-Wong JR, Dixon DB, Chiou WJ and Opgenorth TJ Endothelin receptor antagonists: effect of serum albumin on potency and comparison of pharmacological characteristics. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 791-798, 1997.
190. Yagil C, Sapojnikov M, Katni G, Ilan Z, Zangen SW, Rosenmann E and Yagil Y Proteinuria and glomerulosclerosis in the Sabra genetic rat model of salt susceptibility. *Physiol Genomics* 9: 167-178, 2002.
191. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322: 411-415, 1988.
192. Zicha J and Kunes J Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the Rat. *Physiol Rev* 79(4): 1227-1282, 1999.